

TTÜ Materjali- ja keskkonnatehnoloogia instituut

**HÕBEDA-KITOSAANI NANOKOMPOSIITIDE SÜNTEES, FÜÜSIKALIS-
KEEMILINE ISELOOMUSTAMINE JA TOKSILISUS BAKTERILE *ESCHERICHIA
COLI***
**SILVER-CHITOSAN NANOCOMPOSITE SYNTHESIS, PHYSICOCHEMICAL
CHARACTERIZATION AND TOXICITY TO BACTERIA *ESCHERICHIA COLI***

MAGISTRITÖÖ

Üliõpilane: Kristofer Reinholm

Üliõpilaskood: 201661KAKM

Juhendajad: Kaja Kasemets *PhD* Keemilise ja Bioloogilise
Füüsika Instituut, vanemteadur
Heiki Vija, *MSc* Keemilise ja Bioloogilise
Füüsika Instituut teadur

Tallinn 2024

(Tiitellehe pöördel)

AUTORIDEKLARATSIOON

Olen koostanud lõputöö iseseisvalt.

Lõputöö alusel ei ole varem kutse- või teaduskraadi või inseneridiplomit taotletud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on viidatud.

"8." jaanuar 2024.

Autor: Kristofer Reinholm.

/ allkiri /

Töö vastab bakalaureusetöö/magistritööle esitatud nõuetele

"8." jaanuar 2024.

Juhendaja: Kaja Kasemets PhD.

/ allkiri /

Kaitsmisele lubatud

"....." jaanuar 2024 .

Kaitsmiskomisjoni esimees

/ nimi ja allkiri /

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina Kristofer Reinholm

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud magistritöö „Hõbedakitosaani nanokomposiitide süntees, füüsikalise-keemiline iseloomustamine ja toksilisus bakterile *Escherichia coli*“, mille juhendajad on KBFI vanemteadur Kaja Kasemets, *PhD* ja teadur Heiki Vija, *MSc*.

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

8. jaanuar 2024 a

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud üks või enam isikut oma ühise loomingu tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.

LÕPUTÖÖ ÜLESANNE

Üliõpilane: Kristofer Reinholm 201661KAKM
Õppekava, peeriala: Keemia- ja keskkonnakaitse tehnoloogia KAKM
Juhendaja(d): Vanemteadur Kaja Kasemets, PhD 56647052
Teadur Heiki Vija, MSc 55547535

Lõputöö teema:

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide süntees, füüsikalis-keemiline iseloomustamine ja toksilisus bakterile *Escherichia coli*

Silver-chitosan nanocomposite synthesis, physicochemical characterization and toxicity to bacteria *Escherichia coli*

Lõputöö põhieesmärgid:

1. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (Ag-CS-NK) sünteesitingimuste optimeerimine ja süntees.
2. Nanokomposiitide füüsikalis-keemiline iseloomustamine (hüdrodünaamiline suurus, pinnalaeng, ultravioletne-nähtav spekter).
3. Nanokomposiitide antibakteriaalsuse testimine erinevates testikeskkondades, et välja selgitada seos nanokomposiitide omaduste ja antibakteriaalsuse vahel.

Lõputöö etapid ja ajakava:

Nr	Ülesande kirjeldus	Tähtaeg
1.	Kirjandusega tutvumine	15.04.2022
2.	Sünteeside ja mõõtmiste läbiviimine ja analüüs	28.02.2022
3.	Antibakteriaalsuse testide läbiviimine ja analüüs	15.04.2022

Töö keel: eesti keel **Lõputöö esitamise tähtaeg:** "8." jaanuar 2024a

Üliõpilane: Kristofer Reinholm "8." jaanuar 2024a
/allkiri/

Juhendaja: Kaja Kasemets *PhD* "8." jaanuar 2024a
/allkiri/

Juhendaja: Heiki Vija, *MSc* "8." jaanuar 2024a
/allkiri/

Programmijuht: ".....".....2024a
/allkiri/

SISUKORD

Eessõna	7
Lühendite ja tähiste loetelu.....	8
SISSEJUHATUS	9
1. Kirjanduse ülevaade.....	10
1.1 Nanoosakeste üldisloomustus	10
1.2 Hõbeda nanoosakesed.....	10
1.3 Hõbeda nanoosakeste süntees.....	11
1.3.1 Trinaatriumtsitraadiga.....	12
1.3.2 Naatriumboorhüdriidiga.....	13
1.4 Hõbeda nanoosakeste toksilisus bakteritele.....	13
1.5 Hõbeda-kitosaani nanokomposiidid	15
1.5.1 Kitosaan, klassifikatsioon ja omadused	15
1.5.2 Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide süntees	16
1.5.3 Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide toksilisus bakteritele	17
2. Magistritöö eesmärk.....	18
3. Materjal ja meetodika.....	19
3.1 Madala ja kõrge molekulmassiga kitosaani viskoossuse mõõtmine	19
3.2 Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide süntees	20
3.2.1 Trinaatriumtsitraadiga.....	20
3.2.2 Naatriumboorhüdriidiga.....	22
3.3 Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide füüsikalise-keemilise iseloomustamine	24
3.3.1 Ultravioletne-nähtav spektroskoopia	24
3.2.2 Hüdrodünaamiline suurus ja pinnalaeng	25
3.4. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide toksilisus bakterile Escherichia coli	26
3.4.1 Testtüvi ja kultiveerimise tingimused	26
3.4.2. Elulemuse test (Spot test)	26
4. Tulemused ja diskussioon	29
4.1 Madala ja kõrge molekulmassiga kitosaani viskoossus	29
4.2 Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide süntees trinaatriumtsitraadiga	29
4.2.1 Madala molekulmassiga kitosaan	30
4.2.2 Kõrge molekulmassiga kitosaan	33
4.3 Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide süntees naatriumboorhüdriidiga.....	36
4.3.1 Madala molekulmassiga kitosaan	36
4.3.2 Kõrge molekulmassiga kitosaan	40
4.4 Dialüüsitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide füüsikalise-keemilised omadused dieoniseeritud vees ja kunstlikus haavavedelikus	41

4.5 Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide toksilisus bakterile <i>Escherichia coli</i>	43
4.5.1 Deioniseeritud vees	44
4.5.2 Kunstlikus haavavedelikus	47
5. Järeldused	49
6. Kokkuvõte	51
7. Summary	53
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	55
Lisa 1	60
Lisa 2	61
Lisa 3	62

Eessõna

Antud magistritöö eesmärgiks oli optimeerida hõbeda-kitosaani nanokomposiitide sünteesitingimusi ja uurida nende tingimuste mõju nanokomposiitide füüsikaliskemilistele omadustele ja antibakteriaalsusele. Sünteesi optimeerimise eesmärgiks oli suurendada nanokomposiitide stabiilsust. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide sünteesil kasutati madala ja kõrge molekulmassiga kitosaani ning kahte erinevat redutseerijat – trinaatriumtsitraati ja naatriumboorhüdriidi. Trinaatriumtsitraadiga sünteesiti esmalt hõbeda nanoosakesed, määrati ja muudeti suspensiooni pH vahemikus 7.0–4.0 ning lisati kitosaan hõbeda-kitosaani nanokomposiitide tekkeks. Naatriumboorhüdriidiga sünteesides uuriti hõbeda ja naatriumboorhüdriidi moolsuhte ning reagentide lisamismeetodite mõju hõbeda-kitosaani nanokomposiitide omadustele. Sünteesitud nanokomposiitides oli erinev hõbeda ja kitosaani massisuhe: 1:0.3, 1:1 ja 1:3. Kokku kasutati 42 erinevat sünteesitingimust trinaatriumtsitraadiga ja 15 naatriumboorhüdriidiga sünteesides.

Määrati sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide füüsikaliskemilised omadused: hüdrodünaamiline suurus, pinnalaeng (Z-potentsiaal) ja ultravioletse nähtava valguse neeldumisespekter. Tulemuste põhjal valiti välja üks sünteesi meetod redutseerija kohta, mida korraldati nanokomposiitide antibakteriaalsete omaduste määramiseks.

Nanokomposiitide antibakteriaalsust testiti Gram-negatiivsele bakterile *Escherichia coli* MG1655 deioniseeritud vees ja kunstlikus haavavedelikus ning määrati minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon. Võrdlevalt uuriti ka AgNO_3 ning madala ja kõrge molekulmassiga kitosaani toksilisust bakteritele.

Soovin väljendada oma siirast tänu oma juhendajatele Kaja Kasemetsale ja Heiki Vijale, kelle algatusel sõnastati käesoleva lõputöö teema ning kes abistasid mind katsetega, konsultatsioonidega ja muul viisil. Antud magistritöö tehti Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudi Keskkonnatoksikoloogia laboratooriumis.

Märksõnad: Hõbeda-kitosaani nanokomposiidid, madala ja kõrge molekulmassiga kitosaan, nanokomposiitide süntees, Gram-negatiivne bakter *Escherichia coli*, magistritöö

Lühendite ja tähiste loetelu

- TSC – trinaatriumtsitraat
- LMW – madal molekulmass (*low molecular weight* inglise keeles)
- HMW – kõrge molekulmass (*high molecular weight* inglise keeles)
- UV-Vis – ultravioletse-nähtava valguse neeldumisspekter
- nm – nanomeeter (10^{-9} meetrit)
- kDa – kilo dalton või aatommassiühik, kg/mol
- cP – sentipuaas, $m^2 \cdot s^{-1}$
- nAgCS – hõbeda-kitosaani nanokomposiidid
- MQ – deioniseeritud vesi
- AWF – kunstlik haavavedelik (*artificial wound fluid* inglise keeles)
- d_H – hüdrodünaamiline suurus
- MBK – minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon

SISSEJUHATUS

Tänapäeva meditsiinis on üheks suurimaks probleemiks haiglainfektsioonide esinemine ja antibiootikumiresistentsete tüvede teke. Et ravida antibiootikumiresistentsete bakterite poolt põhjustatud infektsioone, on vaja järjest välja töötada uusi antibiootikume, kuid ajapikku tekib ka nendele antibiootikumidele resistentsed bakteritüved.

Üheks lahenduseks haiglainfektsioonide sh antibiootikumiresistentsete tüvede poolt põhjustatud nakkuste ärahoidmiseks ja raviks on antimikroobsete nanoosakeste (Ag, CuO ja ZnO jt) kasutamine (näiteks haavaravis). Nanoosakesed on osakesed, mille vähemalt üks mõõde on 1-100 nm. Nanosuurus materjalidel on teistsugused omadused võrreldes nende makro skaala osakestega, näiteks väärismetallidel nagu hõbe ja kuld esineb tugevamad neeldumisspektrid tänu plasmonresonantsile ning nanoosakeste suspensioonid võivad olla läbipaistvad, kui nanoosakesed on väiksemad kui nähtava valguse lainepikkus (400-700 nm).

Üheks perspektiivseks uurimisvaldkonnaks biomeditsiinis on metallilised nanoosakesed, eelkõige nanohõbe, mille antimikroobsed omadused on tuntud juba antiikajast peale. Hõbe on olnud kasutuses desinfitseeriva materjalina juba sajandeid ning nanotehnoloogia üheks uurimisvaldkonnaks on, kuidas hõbeda nanoosakeste antibakteriaalsed omadused sõltuvad osakeste suurusest, kujust ja keskkonnast ning kuidas nende sünteesi ja tootmist optimeerida. Hõbeda nanoosakesi toodetakse tavaliselt keemilise sünteesiga, kuid on ka füüsikalisi ja bioloogilisi meetodeid. Sünteesi käigus on võimalik vastavalt tingimustele muuta nanoosakeste omadusi, nagu kuju, suurus ja pinnalaeng. Erinevate stabiliseerivate ainete kasutamisega on võimalik muuta nanoosakesi stabiilsemaks ja mõjutada ka nende bioloogilisi omadusi. Üheks uuritavaks biopolümeeriks, mida saaks kasutada nanoosakeste sünteesil ja stabiliseerimisel, on kitosaan (polüsahhariid), mis on biolagunev, mittetoksiline inimesele ja bakteritsiidse toimega. Kitosaani toodetakse kitiinist, mida leidub vähilaadsete ja seente kestades ja seega on kitosaan laialdaselt kättesaadav tooraine.

Magistritöö eesmärgiks oli (i) optimeerida hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAgCS) sünteesi tingimusi, et saada erineva suurusega (~10 ja 50 nm) stabiilseid nanokomposiite ning (ii) optimeeritud sünteesidest saadud hõbeda-kitosaan nanokomposiitide antibakteriaalse toime määramine Gram-negatiivsele bakterile *Escherichia coli* deioniseeritud vees ja kunstlikus haavavedelikus. nAgCS sünteesiti redutseerides hõbenitraati trinaatriumtsitraadiga või naatriumboorhüdriidiga.

1. Kirjanduse ülevaade

Kirjanduse ülevaade on koostatud erialase kirjanduse ja artiklite põhjal kasutades ScienceDirect, Mendeley ja American Chemical Society andmebaase ning Google Scholar otsingumootorit. Kirjanduse otsingul kasutati järgmisi märksõnu ja nende kombinatsioone: *silver nanoparticles, chitosan, silver-chitosan nanocomposites, synthesis, sodium borohydride, trisodium citrate, E. coli, (material) properties* jne.

1.1 Nanoosakeste üldiseloostus

Nanoosakesteks (NP) loetakse osakesi, millel vähemalt üks dimensioon on 1–100 nm. Osakestel, mille suurus on väiksem kui 100 nm esinevad selliseid keemilisi ja füüsikalisi omadusi, mis esinevad ainult nanosuurusel osakestel: (i) osakesed on vabas olekus väga liikuvad ja seetõttu on nende sadenemise kiirus väga aeglane, (ii) osakestel on väga suur eripind ja umbes 20% aatomitest asuvad osakeste pinnal ning (iii) osakestel esinevad erinevad kvantefektid.[1], [2] Nende omaduste tõttu käituvad nanoosakesed erinevalt võrreldes nende mikro- ja makroskaalal olevate osakestega, omades näiteks kõrgemat reaktiivsust tänu suurele eripinnale. Lisaks materjali enda omadustele, sõltuvad nanoosakeste füüsikalised-keemilised omadused nende suurusest ja kujust, näiteks nanoosakeste neeldumisspekter sõltub osakeste suurusest [1], [3].

Nanoosakesi kasutatakse tänapäeval aina rohkem tarbekaupades ja tööstuses, kuna nanoosakesed võimaldavad muuta tootmisprotsesse efektiivsemaks ning parandavad toodete omadusi. Näiteks nanoosakesi sisalduvad klaasid on tugevamad pragunemise vastu [4], patareides kasutatakse erinevaid süsinik nanomaterjale, et parandada nende mahtuvust ja pikendada eluiga [5] ja toiduainetööstuses kasutatakse nanomaterjale tootmismasinatelt lõpp-produktideni välja, et parandada toidu maitset, tekstuuri ja säilivust.[6]

Erinevalt tarbekaupadest, kus nanoosakesed ainult parandavad toodete omadusi, võib nanoosakesi kasutada meditsiinis ka ravi eesmärgil. Enim perspektiivne valdkond on antimikroobsete nanoosakeste (Ag, CuO, ZnO jt) kasutamine biomeditsiinis (antimikroobsed pinnad, haavaplaastrid, implantaadid jt). Nanoosakesed võivad seonduda rakkudega, kahjustada raku membraani, seonduda valkude ja DNA-ga, muuta rakutsükli ning metabolismi.[7]

1.2 Hõbeda nanoosakesed

Hõbedat (Ag) on tänu tema tugevale mikroobivastasele toimele juba kaua aega kasutatud meditsiinis ja seda omadust põhjustab oligodünaamiline efekt.

Oligodünaamiline efekt on metallide, eriti raskemetalli ionide (Ag^+ , Cu^+ , Hg^+ jne) keemiline omadus reageerida valkude tiol- ja aminorühmadega, häirides seeläbi mikroobide elutegevust [8], [9]. Hõbe on stabiilne metall, mis tavatingimustel reageerib vähete ainetega, põhiliselt reageerides ainult hapniku ja väävli ühenditega. Hõbedaioonid on bakteritele toksilised alates kontsentratsioonist 0.01 mg/l, mis tähendab, et isegi halvasti lahustuvatel hõbedaühenditel esinevad antibakteriaalsed omadused (viide). Inimestele pole hõbe ega hõbeda ühendid lühiajalisel kokkupuutel ohtlikud, kuna organismi sattudes tekivad metabolismi käigus raskesti lahustuvad hõbeda ühendid, mis ei ole inimesele toksilised.[10] Hõbeda nanoosakesi kasutatakse tänapäeval ka meditsiinis, näiteks implantaatides, näomaskides ja kateetrites ning dermatiidi ja akne ravis.[11]

1.3 Hõbeda nanoosakeste süntees

Kuna hõbeda nanoosakeste (AgNPs) optilised, antimikroobsed, keemilised ja füüsikalised omadused sõltuvad nende suurusest, kujust ja pinna morfoloogiast, kasutatakse erinevaid meetodeid erisuguste nanoosakeste sünteesiks. Hõbeda nanoosakeste sünteesimeetodid jagatakse üldiselt kolmeks: füüsikalised, keemilised ja bioloogilised meetodid.[11]

Füüsikalised meetodid kasutavad nanoosakeste sünteesimiseks kas kuumust, valgust või radiatsiooni. Siia kuuluvad järgmised meetodid nagu termiline lagunemine, laserablatsioon ja ionide implanteerimine. Nende meetodite eeliseks on kontroll nanoosakeste suuruse ja kuju üle. [11]

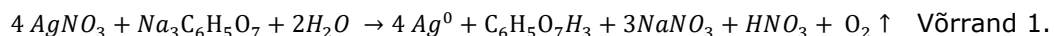
Keemilised meetodid hõlmavad erinevate redutseerijate, stabilisaatorite ja lahustite kasutamist hõbeda nanoosakeste sünteesiks. Mõned enamlevinud redutseerijad on naatriumboorhüdriid, trinaatriumtsitraat, hüdrasiin ja polüoolid.[11] Nanoosakeste agregatsiooni takistamiseks kasutatakse erinevaid stabilisaatoreid nagu polüvinüülpirrolidoon (PVP), polüetüleenglükool (PEG) ja sidrunhape. Keemiliselt sünteesitud nanoosakeste suurus ja morfoloogia sõltub lähteainetest ja nende kontsentratsioonist ning reaktsiooni keskkonna tingimustest, nagu näiteks temperatuur ja segamiskiirus. [12]–[15] Kõrgem temperatuur tõstab reaktsiooni kiirust, kuid vähendab suspensiooni stabiilsust ja suurendab nanoosakeste agregatsiooni. Suurem reaktsiooni kiirus soodustab suuremate nanoosakeste teket, kuna sünteesi käigus tekib rohkem nukleatsiooni punkte ning nanoosakesed kasvavad kiiremini.[15]–[17] Kõrgem segamiskiirus soodustab aga väiksemate nanoosakeste teket võrreldes madalama segamiskiirusega. [14],[18] Lähteainete kontsentratsioonide mõju sõltub suuresti lähteainetest endist, kuid üldiselt mida rohkem hõbeda ioone ning aeglasemalt hõbeda ioonid reageerivad, seda suuremad

nanoosakesed tekivad. [3], [11], [15], [19] Keemiline sünteesireaktsioon koosneb kolmest osast: (i) ioonhõbeda taandamine atomaarseks hõbedaks, (ii) atomaarne hõbe käitub kui nukleatsiooni punkt ning kasvab edasi hõbeda nanoosakesteks ja (iii) hõbeda nanoosakeste agregatsioon ja sadestumine. Selleks, et takistada nanoosakeste agregatsiooni, lisatakse sünteesikeskkonda stabilisaatoreid, mis seonduvad nanoosakeste pinnale.

Bioloogilised meetodid hõlmavad mikroorganismide või taimeekstraktide kasutamist AgNPs-de sünteesimiseks, kus mikroorganismid, nagu bakterid, seened ja vetikad, või taime-ekstraktid on nii hõbeda ionide redutseerijad kui ka stabilisaatorid. Bioloogilised meetodid on keskkonna sõbralikumad võrreldes teiste sünteesi meetoditega. [11], [12]

1.3.1 Trinaatriumtsitraadiga

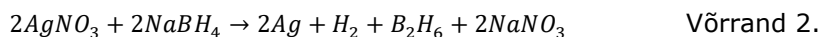
Hõbeda nanoosakeste sünteesiks kasutatakse ühe variandina trinaatriumtsitraati ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), mis toimib nõrga taandajana. Hõbenitraat on tavaliselt hõbeda ionide allikas ja sünteesi käigus tekkinud sidrunhappe stabiliseerib hõbeda nanoosakesi, kuid suspensioonile võib lisada ka teisi stabilisaatoreid nagu polüvinüülpürrolidoon (PVP), kitosaan (CS), askorbiinhape (mis on ühtlasi ka taandaja) või polüvinüülalkohol (PVA). Kuna trinaatriumtsitraat on nõrk taandaja, siis reaktsioon toimub alles 100 °C juures. Trinaatriumtsitraadiga sünteesile on iseloomulik, et reaktsiooni tulemusel muutub lahuse värvus alguses kollakaks ning sealt edasi hallikas kollaseks, täpsed ajastused sõltuvad temperatuurist ning reagentide kontsentratsioonidest ja moolsuhetest.[11], [14]–[23] Redoksreaktsiooni valem on järgmine [24]:



Trinaatriumtsitraadiga redutseerimisel on probleemiks see, et tsitraadi molekulid peavad täitma mitut rolli, käitudes samaaegselt redutseerijana ja sünteesi käigus tekkivate komplekside ja nanoosakeste stabilisaatorina, mis omakorda aeglustab reaktsioonikiirust. Trinaatriumtsitraat moodustab suhteliselt stabiilsed kompleksühendid Ag^+ ja Ag^{2+} ionidega ning aeglustab Ag_4^{2+} ühendite teket, mis käituvad nanoosakeste nukleatsioonitsentritena. [25] Sünteesitud nanoosakeste suurus jäävad vahemikku 10-90 nm ning on kujult peamiselt sfäärid. Suurem hõbenitraadi kontsentratsioon soodustab sfääriliste ja suuremate nanoosakeste teket, vastupidiselt kõrgem trinaatriumtsitraadi kontsentratsioon soodustab väiksemate nanoosakeste teket, lisaks käitub reaktsiooni käigus vabanev sidrunhappe stabilisaatorina.[14], [15], [18], [19]

1.3.2 Naatriumboorhüdriidiga

Veel ühe variandina hõbeda ioonide taandamiseks kasutatakse naatriumboorhüdriidi (NaBH_4), mis on tugev redutseerija. Sarnaselt trinaatriumtsitraadiga kasutakse hõbeda allikana hõbenitraati, kuid süntees toimub 1-4°C juures, et vähendada kõrval reaktsioonide kiirusi. Sünteesitud hõbeda nanoosakeste stabiliseerimiseks lisatakse erinevaid stabilisaatoreid nagu naatriumdodetsüülsulfaati [27], kitosaani [15], polüvinüülpürrolidooni [28], trinaatriumtsitraati [29] või kasutatakse suures liias reagenti naatriumboorhüdriidi. [28][30] Stabilisaatoriteta sünteesides lisatakse jahutatud naatriumboorhüdriidi lahusele hõbenitraati, vastupidisel lisamisel tekib hõbeda sade. [15], [27], [30]–[32] Redoksreaktsiooni valem on järgmine:



Naatriumboorhüdriidi lahust on vaja hoida madalal temperatuuril, et aeglustada naatriumboorhüdriidi lagunemist.



Sarnaselt trinaatriumtsitraadiga on naatriumboorhüdriidil kaks rolli sünteesi protsessis, redutseerija ja stabilisaator. Sünteesikeskkonnas olev liigne naatriumboorhüdriid reageerib hõbeda nanoosakestega, tekitades osakeste pinnale BH_4^- kihi, mis käitub isoleeriva kaitsekihina, takistades nanoosakeste kasvu ja agregatsiooni. Seetõttu soodustab kõrgem naatriumboorhüdriidi kontsentratsioon ja väiksem hõbenitraadi ja naatriumboorhüdriidi moolsuhe väiksemate nanoosakeste teket ning suurusjaotust. Sünteesitud hõbeda nanoosakeste suurused on vahemikus 10-50 nm ning on kujult sfäärid. [27]–[30]

1.4 Hõbeda nanoosakeste toksilisus bakteritele

Hõbeda nanoosakeste antibakteriaalne toime sõltub nanoosakeste füüsikaliskemilistest omadustest, keskkonnast ja bakterite ning osakeste interaktsioonidest. Üheks oluliseks toksilisust mõjutavaks teguriks on testikeskkond, kuna keskkonnas esinevad ained ja tingimused võivad põhjustada nanoosakeste pinna keemilist muutust, agregeerumist ja sadestumist lahusest, mis omakorda muudab nende biosaadavust ja toksilisust mikroorganismidele.[33], [34]

Hõbeda nanoosakeste antibakteriaalsed omadused tulenevad peamiselt vabanevatest hõbeda ionidest. [33] Hõbeda ionid eralduvad, kuna metalne hõbe hakkab aeglaselt hapniku toimel oksüdeeruma. Ioonide vabanemine sõltub temperatuurist, nanoosakeste pindala ja massi suhtest (suurusest), kujust ja ümbritsevast keskkonnast. Suurem temperatuur ning pindala ja massi suhe kiirendavad hõbeda ionide eraldumist. Keskkonna tingimused võivad hõbedaioonide eraldumist kiirendada või peatada, näiteks hapnikuvaeses keskkonnas aeglustub hõbedaioonide eraldumine. Ioonide eraldumist takistab ka raskesti lahustuvate hõbeda ühendite kattekihi teke nanoosakeste pinnale, mis põhjustab nanoosakeste toksilisuse vähenemist. Toksilisus väheneb ka siis kui keskkonnas on aineid (näiteks Cl ionid, sulfiidid), millega hõbe seondub. [35].

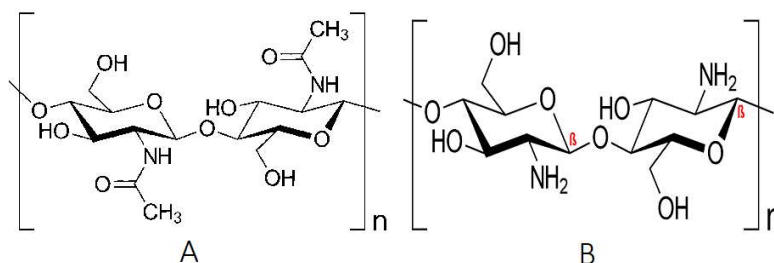
Hõbeda ionid käituvad kui Lewise happed, mis reageerivad Lewise alustega, näiteks biomolekulid, mis sisaldavad amino-, tiol- ja fosfori funktsionaalrühmi. Hõbeda ionid mõjutavad erinevaid bakterite funktsioone ja ei ole nii kitsa toimespektriga nagu on antibiootikumid. Hõbeda ionide ja nanoosakeste laia toimespektrit on üks põhjus, miks hõbe on efektiivne mitmetele erinevatele bakteritele ning ei tekita resistentsust. [34]

Hõbeda nanoosakeste suurus mõjutab osakeste toksilisust kahel põhjusel, esiteks on suurema eripindala tõttu väiksemad nanoosakesed lahustavamad ja teiseks võivad väiksemad nanoosakesed kergemini seonduda ja läbida bakterite membraane. Hõbeda nanoosakeste suuruse vähenemisega suureneb nende reaktiivsus ja toksilisus.[8], [33]

1.5 Hõbeda-kitosaani nanokomposiidid

1.5.1 Kitosaan, klassifikatsioon ja omadused

Kitosaanil on mitmeid tähtsaid bioloogilisi omadusi, nagu biosobivus ja biolagunevus, madal toksilisus inimestele ning antimikroobsed, antioksüdantsed ja vähivastased omadused. Nende omaduste tõttu kasutatakse kitosaani laialdaselt meditsiinis, toidu- ja põllumajandustööstuses ning samuti kosmeetikas ja jäätmekäitluses. [36]



Joonis 1. N-atsetüül-D-glükoosamiini (A) ja D-glükoosamiini (B) keemiline struktuur.[37]

Kitosaan on lineaarne polüsahhariid, mis koosneb D-glükoosamiini ja N-atsetüül-D-glükoosamiini jääkidest (Joonis 1). Kitosaani toodetakse kitiini töötlemisel aluselises keskkonnas, näiteks naatriumhüdrosiidiga. Kitiin on polüsahhariid, mis koosneb ainult N-atsetüül-D-glükoosamiinist, millest aluselise töötlemise käigus eemaldatakse osad atsetüülrühmad. Kui ~50% kitiinis olevatest N-atsetüül-D-glükoosamiini atsetüülrühmadest on deatsetüülitud, muutub polümeer happelises vesikeskkonnas lahustuvaks ning polümeeri nimetatakse kitosaaniks. Kitosaani võib edasi deatsetüüleerida kuni 100% atsetüülrühmade eemaldamiseni. Kitosaan lahustub happelises keskkonnas, kuna tema aminorühmad protoneeruvad (-NH₂ ->-NH₃⁺). Kitosaan pK väärtus on ~6.4, mistõttu kitosaan protoneerub pH 6.4 juures ning madalamatel pH väärtustel. [36], [38], [39] Kuna kitosaan on polümeer, siis tema molekulid on erineva polümerisatsiooniastmega ning selle järgi jaotatakse kitosaan kolme molekulmassi vahemikku: madala (10–190 kDa), keskmise (190–310 kDa) ja suure molekulmassiga (üle 310 kDa) kitosaan. Kuna need vahemikud ei ole rangelt defineeritud, siis erinevad kirjanduse allikad võivad erinevalt klassifitseerida sama molekulmassiga kitosaani. Alla 10 kDa molekulmassiga kitosaani nimetatakse oligokitosaanideks.

Kitosaanil on peamiselt kaks klassifikatsiooni, mille järgi tema omadusi hinnatakse, deatsetüülimise aste ja molekulmass, millest sõltuvad kitosaani füüsikalised-keemilised ja bioloogilised omadused. [36], [38], [39] Kitosaani lahustuvus sõltub deatsetüülimise astmest, molekulmassist ja atsetüülrühmade paigutusest molekulis,

lahuse pH-st ja kontsentratsioonist ning happe protoneerumise omadustest. Kõige rohkem mõjutab kitosaani lahustuvust aminorühmade protoneerumise aste, sest protoneerumata kitosaan on vähe lahustuv ja protoneerumise tase sõltub omakorda lahuse pH-st, deatsetüülimise astmest ja polümeeri struktuurist.[36], [39], [40]

Kitosaani lahuse viskoossus sõltub kitosaani kontsentratsioonist ja molekulmassist, olles viimasega tugevas positiivses korrelatsioonis. Viskoossust kasutatakse ka kitosaani molekulmassi määramiseks, kuid selleks tuleb arvestada ka kitosaani lahustuvust ning seda mõjutavaid faktoreid, mistõttu pole selline meetod kõige täpsem. [39]

Kitosaani antibakteriaalsed omadused tulenevad eelkõige tema võimest seonduda mikroobidega, mis omakorda sõltub kitosaani molekulmassist, deatsetüülimise ja aminorühmade protoneerumise astmest. [36], [39]

Kitosaani antibakteriaalsus sõltub ka molekulmassist. Kõrge molekulmassiga kitosaan seondub põhiliselt bakterite pinnaga, takistades ainevahetust ning kahjustades membraani. Madalama molekulmassiga kitosaan läbib aga paremini bakterite membraane ning seonduvad rakkudes DNA-ga.[36] Kitosaan kinnitub bakterite pinnale peamiselt läbi elektrostaatilise jõu, mis tekib negatiivselt laetud bakteri pinna ja positiivselt laetud kitosaani molekuli vahel. Positiivne laeng tekib kitosaani aminorühmade (-NH₂) protoneerudes (-NH₃⁺) happelises keskkonnas, kui pH väärtus on alla 6.4. Gram-positiivsete bakterite (*Staphylococcus aureus* jt) pinnal asetsevad teihhoiinhapped ning lipopolüsahhariidid gram-negatiivsete bakterite pinnal (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* jt) annavad mõlemale bakteri tüübile negatiivse pinnalaengu. Kitosaan on toksiline ka pärmseentele (näiteks *Candida* sp) ja viirustele. [36], [38] Kitosaan häirib bakterite kasvu peamiselt kahel viisil, lõhkudes rakumembraani või moodustades membraanile kattedekihi, mis takistab bakterite ainevahetust ja pooldumist. [36], [39] Kitosaani hüdroolüüsil tekkivad vaheühendid võivad seonduda ka DNA-ga, mõjutades seeläbi bakterite elutegevust ja häirides proteiinide sünteesi. See mehhanism eeldab, et kitosaani molekulid suudavad läbida bakterite membraani ja positiivselt laetud aminorühmad seonduvad nukleiinhapete negatiivselt laetud fosfaatrühmadega, mistõttu esineb see mehhanism tõenäolisemalt madalama molekulmassiga kitosaanil. [36]

1.5.2 Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide süntees

Sõltuvalt hõbeda nanoosakeste sünteesi meetodist, toimub hõbeda-kitosaani nanokomposiitide moodustumine, kas lisatuna stabilisaatorina hõbeda nanoosakeste sünteesikeskkonda või lisades kitosaani sünteesitud nanoosakeste suspensioonile.[1], [15], [22], [23], [36], [41]–[43] Levinum meetod on hõbeda nanoosakeste süntees ja

hilisem stabiliseerimine kitosaaniga, kuna see võimaldab suuremat kontrolli nanokomposiitide omaduste (näiteks suurus) üle. Eraldi sünteesitud hõbeda nanoosakeste ja kitosaani vahel toimub kelaatumine, kus hõbeda nanoosake reageerib kitosaani amino- ja hüdroksüülrühmadega, moodustades üksikud elektronpaarid hapniku ja lämmastiku vesiniksidemetega.

Kui kitosaan on hõbenitraadiga samas sünteesi keskkonnas, siis kitosaan võib käituda ka kui redutseerija, kus kitosaani aminorühmad reageerivad hõbeda ioonidega.[15], [41] Kitosaan takistab hõbeda nanoosakeste kasvu sünteesi käigus ja agregatsiooni ning aitab stabiliseerida nanokomposiitide suspensiooni. Üheks tähtsaks sünteesi parameetrik on sünteesi keskkonna pH, mida peaks hoidma happelisena, sest kitosaani lahustuvus langeb märgatavalt, kui pH tase on kõrgem kui 6.5.

1.5.3 Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide toksilisus bakteritele

Kitosaan stabiliseerib ja takistab hõbeda nanoosakeste agregeerumist ning annab positiivse laengu nanoosakeste pinnale, mis omakorda soodustab nanokomposiitide ja mikroorganismide interaktsioone.[1] Bakterite pinnale kinnitunud hõbeda-kitosaani nanokomposiidid võivad eraldada hõbeda ioone ja kitosaan võib samaaegselt mõjutada bakterite membraane [1]

Eraldunud hõbeda ioonid võivad põhjustada reaktiivsete hapniku ühendite teket, mis häirivad bakteri elutegevust, takistades DNA kopeerimist, rakkude jagunemist ja metabolismi. Sarnased omadused on ka kitosaanil, kuna sisenedes rakku võib ta seonduda DNA-ga ja inhibeerida valkude sünteesi. [1]

2. Magistritöö eesmärk

Magistritöö eesmärgiks oli:

1. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide süntees ning sünteesi tingimuste optimeerimine.
2. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide füüsikalise-keemilise iseloomustamine (hüdrodünaamiline suurus, Z-potentsiaal, UV-Vis spekter, osakeste stabiilsus).
3. Nanokomposiitide toksilisuse testimine Gram-negatiivsele bakterile *Escherichia coli* MG1655 erinevates testikeskkondades: deioniseeritud vesi ja sünteetiline haavavedelik.

3.Materjal ja metoodika

Kõik töös kasutatud kemikaalid olid analüütilise puhtusastmega ja neid kasutati edasise puhastuseta. Madala (LMW, 50–190 kDa) ja kõrge (HMW, 310–375 kDa) molekulmassiga kitosaanid, trinaatriumtsitraat, sidrunhape, naatriumboorhüdriid ja hõbenitraat olid ostetud firmast Sigma-Aldrich (Saksamaa). Kõikide lahuste tegemiseks kasutati deioniseeritud vett (Milli-Q, Millipore, Saksamaa).

3.1 Madala ja kõrge molekulmassiga kitosaani viskoossuse mõõtmine

Nanokomposiitide sünteesil kitosaani lahused (1000 mg/L) filtreeriti, et eemaldada mittelahustunud osakesed. Kuna filtreerimise tulemusena võib väheneda kitosaani kontsentratsioon, siis mõõdeti madala ja kõrge molekulmassiga kitosaani lahuste viskoossust enne ja peale filtreerimist, kasutades Höppleri viskosimeetrit BH 2 (MLW Saksamaa, Joonis 2). Höppleri viskosimeeter töötab põhimõttel, et kindla läbimõõdu ja tihedusega kuuli läbib teatud ajavahemiku jooksul uuritavas vedelikus kindla vahemaa. Teades kuuli koefitsienti, kuuli ja vedeliku tihedust ning vahemaa läbimise aega on võimalik arvutada vedeliku viskoossust.



Joonis 2. Langeva kuuli viskosimeeter e Höppleri viskosimeeter.

Mõõtmisel kasutati järgmisi kitosaani töölahused: 62.5, 125, 250, 500, 1000 mg/L. Lahused valmistati vähemalt pool tundi enne mõõtmist, et lahused stabiliseeruksid toatemperatuuril ja kitosaan oleks ühtlaselt lahustunud. Lahuste tegemiseks kasutati MQ vett ja 1%_{mass} kitosaani 1%_{maht} äädikhappe lahuses. Madala ja kõrge molekulmassiga kitosaani lahused (1000 mg/L) filtreeriti vastavalt läbi 0.45 µm ja 1.2 µm süstalfiltri (Sartorius). Igale töölahusele tehti vähemalt 3 kordusmõõtmist.

3.2 Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide süntees

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide sünteesil kasutati kahte meetodit: hõbenitraadi redutseerimist (i) trinaatriumtsitraadiga või (ii) naatriumboorhüdriidiga.

3.2.1 Trinaatriumtsitraadiga

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAgCS) süntees trinaatriumtsitraadiga koosnes kahes etapist:

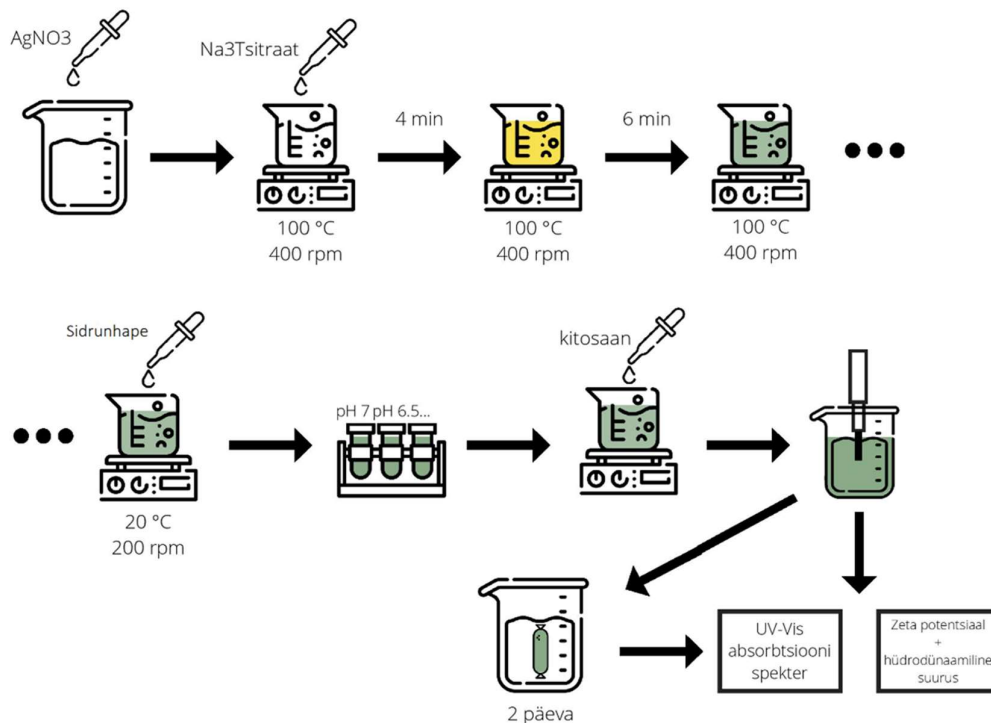
- (i) Hõbeda nanoosakeste (AgNPs) süntees keemilise redutseerimise meetodil hõbenitraadist (AgNO_3), kus redutseerijaks oli trinaatriumtsitraat (TSC) ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (võrrand 1).
- (ii) Sünteesitud AgNPs suspensioon segati kokku kitosaani lahusega (CS), sonikeeriti ja dialüüsiti.

Lahuste valmistamine: ~30–60 min enne nAgCS sünteesi valmistati AgNO_3 (1 g Ag/L), TSC (10 g/L), sidrunhappe ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) (10 g/L) ja kitosaani lahus (1 g/L). Kõik töolahused filtreeriti läbi 0.2 μm süstalfiltri (Sartorius) ja kitosaani lahused läbi 0.45 μm (LMW CS) või 1.2 μm (HMW CS) süstalfiltri (Sartorius).

Hõbeda nanoosakeste süntees trinaatriumtsitraadiga viidi läbi järgmiselt (Joonis 3):

1. 200 mL keeduklaasi lisati 56 mL MQ vett ja 10 mL AgNO_3 (1 g Ag/L) lahust, keeduklaas asetati termostateeritavale magnetsegajale (Heidolph, Saksamaa), kuumutati keemiseni ja segamise kiiruseks määrati 400 rpm (pööret/min).
2. Keevasse AgNO_3 lahusesse lisati kiiresti 4 ml 1%_{mass} TSC lahust (Ag ja TSC molaarne suhe oli ~1.0).
3. Reaktsiooni (võrrand 1) tulemusel muutus lahuse värvus umbes 3–4 minuti jooksul kollaseks ning peale 10 minutit oli reaktsioon lõppenud ja lahus oli värvilt rohekas pruun.
4. Saadud suspensioon jahutati toa temperatuurile, mõõdeti maht ja lisati keemisel aurunud vee hulk.
5. Mõõdeti AgNPs suspensiooni pH (~7.0) ja reguleeriti sidrunhappega väärtuseni 7.0–4.0. (vt. 3.2.1.1).

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide valmistamiseks segati kokku magnetsegajal (200 rpm) vastavalt Tabelis 1. toodud AgNPs suspensiooni, MQ vee ja kitosaani lahuse kogused. Saadud hõbeda-kitosaan nanokomposiidid sonikeeriti parema dispersiooni saamiseks 30 sek Branson 450 pulksonikaatoriga (Branson Ultrasonics, USA) 10% võimsuse juures.



Joonis 3. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide trinaatriumtsitraadiga sünteesi illustratiivne skeem.

Tabel 1. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAgCS) sünteesil trinaatriumtsitraadiga kasutatud lahuste ja hõbeda nanoosakeste (AgNPs) suspensiooni kogused ja hõbeda-kitosaan massisuhe (Ag:CS).

nAgCS	AgNPs, mL	MQ vesi, mL	CS, mL	Ag:CS, mg/L
nAgCS_0.3	21	8.1	0.9	100/30
nAgCS_1	21	6.0	3.0	100/100
nAgCS_3	21	0	9.0	100/300

Sünteesikeskkonna pH mõju nanokomposiitide füüsikalise-keemilistele omadustele

Selleks, et selgitada, kuidas mõjutab hõbeda nanoosakeste suspensiooni pH nAgCS füüsikalise-keemilisi omadusi ja stabiilsust, reguleeriti sidrunhappe lisamisega AgNPs suspensiooni pH väärtusi vahemikus 7.0–4.0 (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 ja 7.0). Peale AgNPs suspensiooni pH reguleerimist valmistati nAgCS nagu on kirjeldatud peatükis 3.2.1 ja mõõdeti veelkord suspensiooni pH. Sünteesitud nanokomposiitide stabiilsuse uuringuteks määrati osakeste hüdrodünaamiline suurus, Z-potentsiaal ja UV-Vis spekter koheselt peale (0 t) nAgCS sünteesi ja üks nädal pärast toatemperatuuril seismist.

3.2.2 Naatriumboorhüdriidiga

Hõbeda kitosaani nanokomposiitide sünteesil naatriumboorhüdriidiga (NaBH_4) toimus hõbeda ionide (AgNO_3) redutseerimine kitosaani juuresolekul. Süntees viidi läbi jäävannil $\sim 4^\circ\text{C}$ juures.

Lahuste valmistamine: ~ 30 – 60 min enne $n\text{AgCS}$ sünteesi jahutati jäävannis $\sim 4^\circ\text{C}$ -ni sünteesil kasutatav MQ vesi ja valmistati AgNO_3 lahus (1 g Ag/L). Kasutades jahutatud MQ vett valmistati kolm erineva Ag ja kitosaani massisuhtega lahust ($1:0.3$, $1:1$ ja $1:3$), mis filtreeriti läbi $0.45 \mu\text{m}$ (LMW CS) või $1.2 \mu\text{m}$ (HMW CS) süstalfiltri (Sartorius). NaBH_4 lahus (1.45 mg/mL) tehti vahetult enne nanokomposiitide sünteesi. Kõiki lahuseid hoiti jääl.

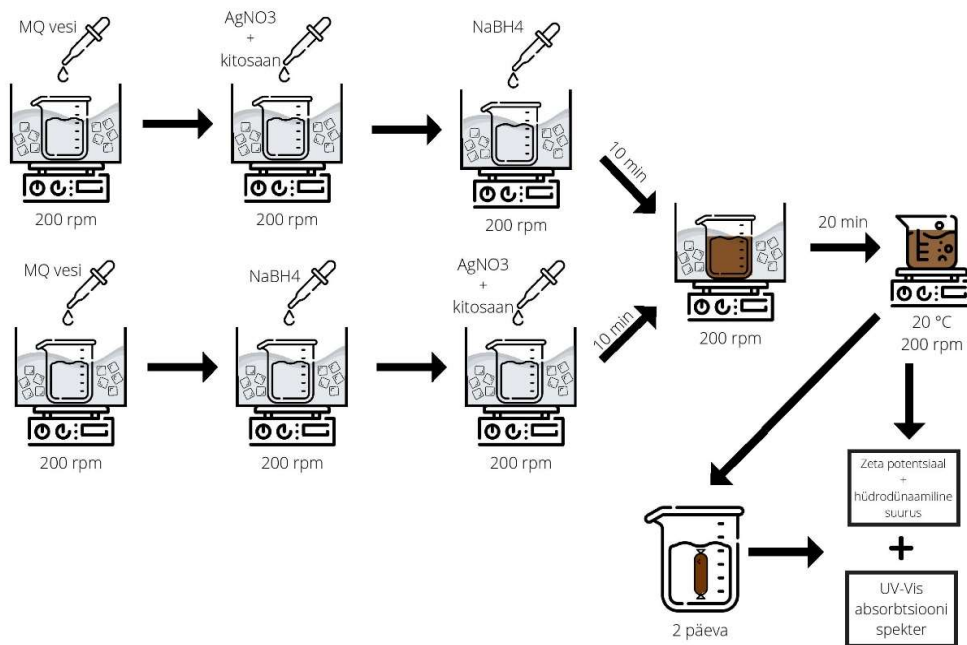
Naatriumboorhüdriidi koguse, lisamise kiiruse ning järjekorra mõju uuringud nanokomposiitide füüsikalise-keemilistele omadustele

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide sünteesil uuriti, kuidas mõjutab nanokomposiitide füüsikalise-keemilisi omadusi ja stabiilust (i) hõbeda ja naatriumboorhüdriidi molaarne suhe sünteesikeskkonnas, (ii) ainete lisamise järjekord ja (iii) lisamise kiirus reaktsioonisegusse (Joonis 4).

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide süntees (Joonis 4, Tabel 2):

1. 50 mL keeduklaas asetati magnetsegajal jäävanni ja lisati jahutatud MQ vett ja magnetsegaja lülitati sisse kiirusel 200 rpm .
2. Keeduklaasi lisati kas AgNO_3 -kitosaani või NaBH_4 lahust, millele lisati (kiiresti või aeglaselt) vastavalt kas NaBH_4 või AgNO_3 -kitosaani lahust.
3. Reaktsioon toimus 10 minutit jääl ja edasi 20 min toatemperatuuril.

Sünteesitud $n\text{AgCS}$ stabiilsuse uuringuteks määrati osakeste hüdrodünaamiline suurus, Z-potentsiaal ja UV-Vis spekter koheselt peale nanokomposiitide sünteesi ja üks nädal pärast toatemperatuuril seismist (Joonis 4).



Joonis 4. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide naatriumboorhüdriidiga sünteesi illustratiivne skeem.

Tabel 2. NaBH₄ sünteesil kasutatud lahuste kogused (mL).

Ag/NaBH ₄ molaarne suhe	1:1	1:2	1:3
MQ vesi	17.5	17.0	16.5
AgNO ₃ -kitosaani lahus	2.0	2.0	2.0
NaBH ₄	0.5	1.0	1.5

Trinaatriumtsitraadi ja naatriumboorhüdriidi sünteesi uuringutulemuste alusel valiti välja sünteesitingimused, mida kasutati madala ja kõrge molekulmassiga ning erineva hõbeda-kitosaani massisuhtega (1:0.3, 1:1 ja 1:3) nanokomposiitide sünteesil (kokku 12 erinevat proovi). Sünteesitud nanokomposiidid (30 mL) viidi üle dialüüsituubidesse (Viskase, USA; poori suurus 12 kDa) ja dialüüsi 48 tundi toatemperatuuril MQ vees (2 L), vahetades 24 moodsuses MQ vett. Enne ja peale dialüüsi mõõdeti nAgCS hüdrodünaamiline suurus, Z-potentsiaal ja UV-Vis spekter. Dialüüsitud nAgCS hoiti külmikus ~4°C juures.

3.3 Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide füüsikalises-keemilises iseloomustamises

3.3.1 Ultravioletne-nähtav spektroskoopia

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (10 mg Ag/L) neeldumisspekter määrati UV-Vis spektrofotomeetriga Multiskan Spectrum (ThermoFisher Scientific, USA) (Joonis 5). Referentsiks kasutati kas deioniseeritud vett või kunstlikku haavavedelikku.



Joonis 5. Ultraviolett ja nähtava valguse spektrofotomeeter Multiskan Spectrum (ThermoFisher Scientific, USA).

UV-Vis spektrofotomeeter töötab Beer-Lamberti seadusel, mis ütleb, et monokromaatse valguse neeldumine läbi vedeliku sõltub neelduva aine kontsentratsioonist, aine neeldumiskoeffitsiendist ja valguse poolt läbitud tee pikkusest. Hõbeda elektronid on metallis vabalt liikuvad ning kui valguse elektromagnetiline laine langeb metalli pinnale, siis tekib metalli pealmiste elektronide ja valguse vahel resonants. Resoneeruvad elektronid tekitavad metalli välispinnale resonantsi tulemusena elektromagnetilise laine, mis peegeldub valgusena hõbeda pinnalt. Pinna plasmoniresonantsi neeldumisriba lainepikkus ja võimsus sõltub nanoosakeste suurusel, kujul ja keskkonna dielektrilistest omadustest. [44]

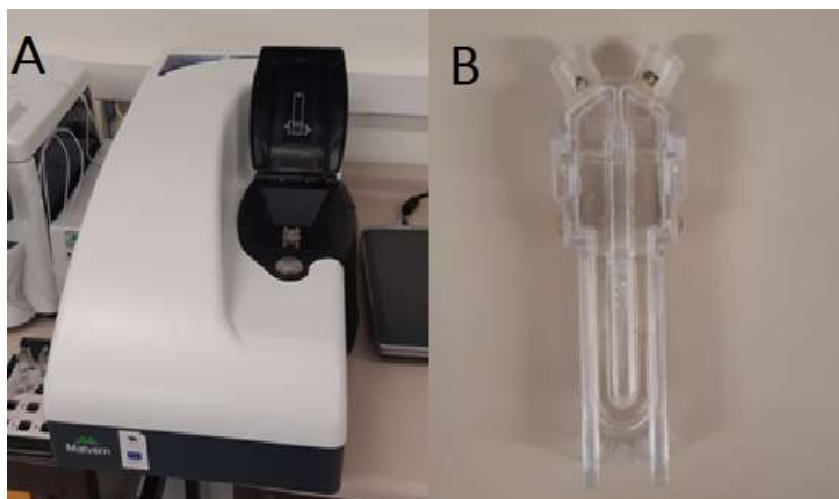
Selles töös mõõdeti nAgCS neeldumisspektrit vahemikus 250–800 nm (2 nm vahedega). Neeldumisspektri kuju ja haripunkti asukoht sõltub hõbeda nanoosakeste primaarsuurusest ja suurusjaotusest ning spektri haripunkti kõrgus sõltub nanoosakeste kontsentratsioonist.

3.2.2 Hüdrodünaamiline suurus ja pinnalaeng

Nanokomposiitide hüdrodünaamiline suurus ja pinnalaeng (Z-potentsiaal) määrati seadmega Malvern ZsiZer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK). (Joonis 6). Mõõtmised viidi läbi nAgCS kontsentratsioonil 10 mg Ag/L. Mõõtmisküveti (Malvern) lisati 1 mL töölahust. Kokku tehti kolm mõõtmist.

Z-potentsiaali otseselt ei mõõdeta, vaid arvutatakse laetud osakeste liikumise kiirusest elektriväljas, olles proportsionaalselt seotud liikumise määraga. Z-potentsiaal näitab vedelikus olevate nanokomposiitide piirpinna ja vedeliku vahelise potentsiaali erinevust, mida määratakse millivoltides (mV). Z-potentsiaali saab kasutada kolloidse kahekihilise dispersiooni omaduste kirjeldamiseks. Üldiselt on suspensioon stabiilne, kui Z-potentsiaal on suurem kui +30 mV või väiksem kui -30 mV. Madalamatel Z-potentsiaalide väärtustel ei pruugi nanokomposiitide vaheline elektrostaatiline tõrjuv jõud olla piisavalt suur, et takistada nanokomposiitide agregatsiooni Van der Waalsi jõu ja teiste interaktsioonide poolt. [13]

Nanokomposiitide hüdrodünaamilist suurust määrati kasutades valguse dünaamilise hajumise meetodit. Meetod põhineb Browni liikumisel ja nanoosakeste valguse hajutamisel. Browni liikumine on fluidiumis disperseerunud osakeste pidev ebakorrapärane liikumine, mille kiirus sõltub temperatuurist ja osakeste suurusest ning väheneb osakeste suuruse kasvamisega ehk eri suuruses osakesed hajutavad erinevalt valgust ja liiguvad eri kiirusega. Nanoosakeste suuruse määramiseks, lastakse uuritavast proovist läbi laserkiir ning hajutamise tulemusena tekkib heledate ja tumedate piirkondadega hajumispilt, mis fikseeritakse lühikese aja jooksul. Nanoosakeste suurus arvutatakse hajuvuspildi muutuste alusel; mida suurem on muutus, seda suuremad on osakesed.



Joonis 6. Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK) (A) ja nanokomposiitide hüdrodünaamilise suuruse ja pinnalaengu mõõtmiseks kasutatav küvett (B).

3.4. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide toksilisus bakterile *Escherichia coli*

3.4.1 Testtüvi ja kultiveerimise tingimused

Hõbeda-kitosaani antibakteriaalsete omaduste uurimisel kasutati Gram-negatiivset bakterit *Escherichia coli* MG1655. *E. coli* MG1655 on laboritüvi, mis sarnaneb metsiktüüpi tüvele *E. coli* K-12. [45][46] Baktereid kasvatati Luria-Bertaini (LB) söötmes (1 L): 10 g trüptooni (Neogen, USA), 5 g pärmi ekstrakti (Neogen, USA), 5 g NaCl (Sigma-Aldrich, Saksamaa) ja agarsöötme jaoks lisati 15 g agarit (Lab M, UK). LB sööde autoklaaviti 120°C juures 15 minutit.

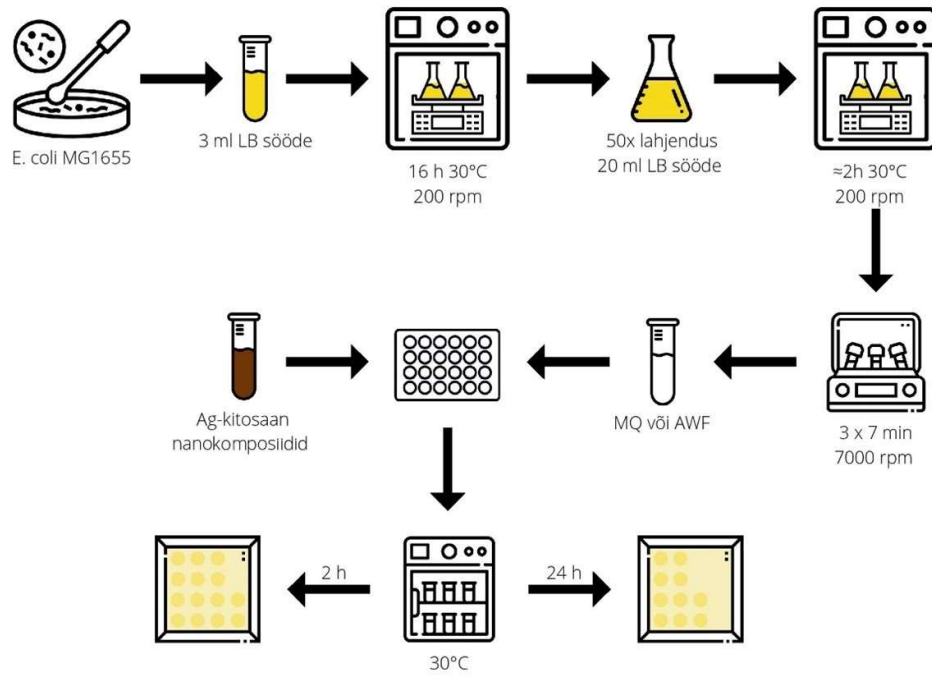
3.4.2. Elulemuse test (Spot test)

Nanokomposiitide toksilisust bakterile *E. coli* MG1655 hinnati elulemuse testiga (Spot test) ([47]). Testiti ka hõbenitraadi ning madala ja kõrge molekulmassiga kitosaani toksilisust. Spot test viidi läbi 96-auguga mikroplaadil (BD Falcon 351172, USA). Testikeskkonnaks oli (i) deioniseeritud vesi (MQ) ja (ii) kunstlik haavavedelik (AWF). Kunstlik haavavedelik sisaldas (1 L): 10 g veise seerumi albumiini (BSA) (Acros Organics, USA), 0.37 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 8.27 g NaCl ja TRIS 3.03 g (kemikaalid olid firmast Sigma-Aldrich, Saksamaa), pH 7.2. AWF filtreeriti (steriliseeriti) läbi 0.2 μm süstlafiltrit (Sartorius).

Spot test viidi läbi järgnevalt (Joonis 7):

1. LB söötmes üleöö kasvanud (30°C, 200 rpm) bakterikultuuri lahjendati 50 korda LB söötmes (100 mL klaaskolb, 10–20 mL LB) ja kasvatati inkubaator-loksutil (200 rpm) 30°C juures kuni optilise tiheduseni (OD) 0.6 (mõõdeti 600 nm juures spektrofotomeetriga Yenway 6300, UK).
2. Bakterikultuur viidi 50-mL tuubi (BD Falcon, USA) ja tsentrifugeeriti 7 min, 7000 rpm (Sigma 3-16PK, Saksamaa). Peale tsentrifugeerimist valati bakteri-sademelt sööde ja lisati MQ vett. Bakterikultuuri pesti 2-korda MQ veega, tsentrifugeerides kultuuri vahepeal 7000 rpm juures 7 minutit.
3. Valmistati bakterikultuur OD-tihedusega 0.1 kas deioniseeritud vees või AWF-s ja pipeteeriti 100 µL 96-auguga mikroplaadile, kuhu oli eelnevalt lisatud 100 µL uuritavat ainet DI vees. Testiti vähemalt 7 erinevat kontsentratsiooni, kus iga järgnev kontsentratsioon oli poole väiksem ning lisaks veel kontroll (ilma uuritava aineta).
4. Mikroplaat inkubeeriti 30°C juures staatilises inkubaatoris.

Peale 2 ja 24 tunni ekspositsiooni viidi 3 µL nii eksponeeritud kui ka eksponeerimata (kontroll) bakterikultuuri LB-agarsöötmele. Agarplaat hoiti ~24 tundi 30°C inkubaatoris ja määrati visuaalselt (kolooniate moodustumine agarsöötmel) minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon (MBK, madalaim testitud kontsentratsioon, mis tapab bakterid).

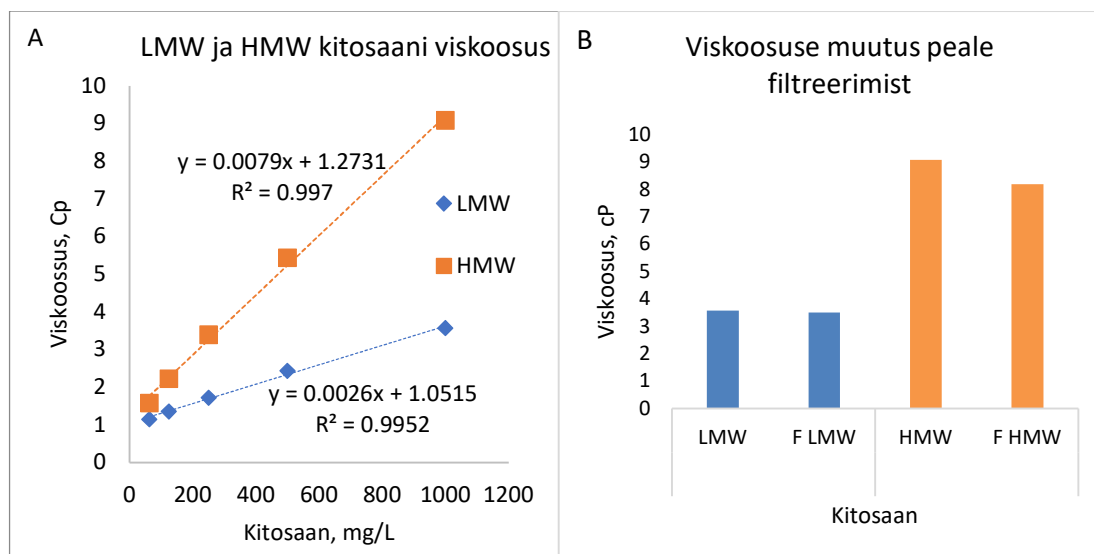


Joonis 7. Elulemuse testi (Spot test) illustreeriv joonis.

4. Tulemused ja diskussioon

4.1 Madala ja kõrge molekulmassiga kitosaani viskoossus

Joonisel 8 on näha, et madala (LMW) ja kõrge molekulmassiga (HMW) kitosaani kontsentratsioon ja lahuse viskoossus on lineaarses suhtes ning viskoossus sõltub kitosaani molekulmassist, suurenedes molekulmassi suurenemisega. 1000 mg/L kitosaani lahuse filtreerimisel läbi 0.45 µm (LMW) või 1.2 µm (HMW) süstlafiltri vähenes kitosaani viskoossus vastavalt 3.13 % (LMW) ja 11.7 % (HMW).



Joonis 8. Madala (LMW) ja kõrge (HMW) molekulmassiga kitosaani viskoossus (A) ja viskoossuse (1000 mg/L) muutus enne ja peale filtreerimist (F) (0.45 ja 1.2 µm-süstlafilter LMW ja HMW kitosaani jaoks, vastavalt) (B).

4.2 Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide süntees trinaatriumtsitraadiga

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAgCS) trinaatriumtsitraadiga sünteesi eesmärgiks oli uurida, kuidas mõjutab sünteesikeskkonna pH nanokomposiitide hüdrodünaamilist suurus, Z-potentsiaali ja stabiilsust. Selleks reguleeriti enne madala ja kõrge molekulmassiga kitosaan lisamist hõbeda nanoosakeste suspensiooni pH vahemikus 7.0–4.0. Kuna kitosaani (1 g/L 1% äädikhappe lahuses) lisamisel lahuse pH muutus, siis mõõdeti ka moodustunud nanokomposiitide pH väärtused (Tabel 3).

Tabel 3. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide pH peale madala (LMW) ja kõrge (HMW) molekulmassiga kitosaani lahuse lisamist erineva pH-väärtusega hõbeda nanoosakeste suspensioonile (AgNPs). Nanokomposiidid olid erineva hõbeda-kitosaani massisuhtega: 1:0.3 (nAgCS_0.3), 1:1 (nAgCS_1) ja 1:3 (nAgCS_3).

AgNPs, pH	nAgCS_0.3		nAgCS_1		nAgCS_3	
	LMW	HMW	LMW	HMW	LMW	HMW
7.0	6.27	6.48	5.28	5.18	4.69	4.52
6.5	6.13	6.09	5.19	4.97	4.63	4.48
6.0	5.72	5.63	4.93	4.88	4.62	4.39
5.5	5.28	5.14	4.80	4.73	4.52	4.34
5.0	5.00	4.86	4.80	4.62	4.43	4.30
4.5	4.58	4.42	4.50	4.41	4.30	4.19
4.0	4.15	4.06	4.16	4.05	4.12	4.12

4.2.1 Madala molekulmassiga kitosaan

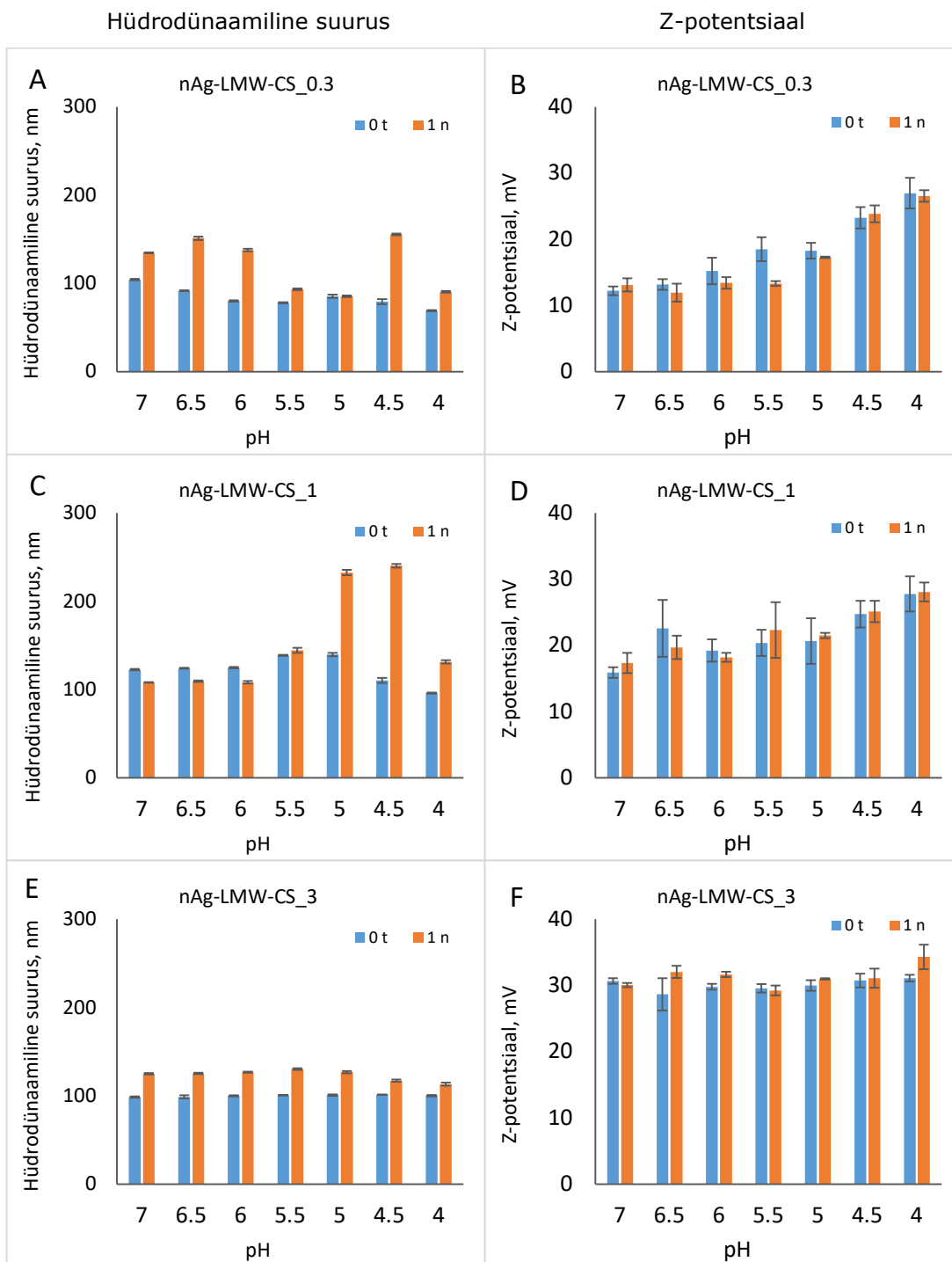
Madala molekulmassiga (LMW) kitosaaniga tehti kolm erineva hõbeda-kitosaani (Ag:CS) massisuhtega sünteesi ning võrreldi hõbeda-kitosaan nanokomposiitide (nAgCS) füüsikalise-keemiliste omaduste muutumist seitsme erineva sünteesikeskkonna pH juures (7.0–4.5). Joonisel 9 on esitatud nAgCS hüdrodünaamilised suurused (d_H) ja Z-potentsiaalid. UV-Vis absorptsiooni spektritest (Lisa 1) on näha et sünteesitud nAgCS maksimaalne neeldumine oli vahemikus 400–420 nm, mis kinnitab, et sünteesil moodustusid nanosuuruses hõbeda-kitosaani komposiidid, kuna hõbeda nanoosakeste neeldumise vahemik on 400–440 nm. [24], [25], [48]

Peale sünteesi (0 t) olid nAgCS hüdrodünaamilised suurused 69–104 nm (nAgCS_0.3), 95–122 nm (nAgCS_1) ja 98–101 nm (nAgCS_3) ning nAgCS_0.3 ja nAgCS_1 korral oli seos d_H ja sünteesikeskkonna pH vahel – madalamal pH-l vähenes ka d_H (Joonis 9). Samas nAgCS_3 sünteesil keskkonna pH ei mõjutanud nanokomposiitide d_H (Joonis 9 A, C), kuna kitosaani sellises hulgas lisamine langetas sünteesikeskkonna pH-d väärtusteni alla 5.0 (Tabel 3). Sünteesitud nanokomposiitide seismisel nädal aega toatemperatuuril olid nAgCS d_H hüdrodünaamilised suurused 85–155 nm (nAgCS_0.3), 108–240 nm (nAgCS_1) ja 125–130 nm (nAgCS_3) ning Ag:CS massisuhtega 1:3 nanokomposiitide d_H suurenes kõige vähem (Joonis 9). Tavaliselt põhjustab nanoosakeste d_H suurenemist agregatsioon. [21]

Peale sünteesi olid nAgCS Z-potentsiaalid +12–27 mV (nAgCS_0.3), +16–28 mV (nAgCS_1) ja +29–31 mV (nAgCS_3) ning nAgCS Z-potentsiaalid suurenesid madalamal pH-l, kuid nAgCS_3 korral sünteesikeskkonna pH ei mõjutanud osakeste Z-

potentsiaali (Joonis 9 B, D ja F). Z-potentsiaali suurenemine on seletatav kitosaani aminorühmade protoneerumisega pH väärtusel alla 6.5. Polinarski et al. (2021) [1] ja Sanpui et al. (2008) [22] näitasid, et pH langedes suurenes nanokomposiitide Z-potentsiaal -21.2 mV-lt +21.8 mV-ni ja -12.5 mV-lt +22.7 mV-ni. Peale ühe nädalast seismist toatemperatuuril olid nAgCS Z-potentsiaalid vastavalt +12–26 mV (nAgCS_0.3), +17–28 mV (nAgCS_1) ja +29–31 (nAgCS_3 mV) ning üldiselt ei olnud muutused suuremad kui ± 2 mV. Muutused võisid tuleneda osakeste ja laengute vahelise ekviliibriumi saavutamisest, ühendite aeglasest lagunemisest või reageerimisest.

UV-Vis neeldumisspektritest peale sünteesi ja 1 nädala seismist toatemperatuuril (Lisa 1) on näha, et nAgCS sünteesikeskkonna pH mõjutas minimaalselt nAgCS maksimaalse neeldumise lainepikkust ja absorptsiooni väärtusi, ainult nAgCS_0.3 korral toimus pH 7.0–5.0 juures absorptsiooni langus neeldumisspektrite haripunktis, kuid mitte madalamatel pH väärtusetel. Kõikidel teistel pH väärtustel nii nAgCS_0.3 kui ka nAgCS_3 neeldumisspektri haripunkt peaaegu ei muutunud või suurenes nagu nAgCS_3 korral. UV-Vis analüüs näitas, et sünteesikeskkonna pH 7.0–4.5 ei mõjutanud trinaatriumtsitraadiga sünteesitud nanokomposiitide stabiilsust 1-nädala seismisel toatemperatuuril, välja arvatud nAgCS_0.3, mis oli kõige stabiilsem kui keskkonna pH oli sünteesil 5.5–5.0. (Lisa 1).



Joonis 9. Trinaatriumtsitraadiga ja madala molekulmassiga (LMW) kitosaaniga sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAg-LMW-CS) hüdrodünaamiline suurus (A, C ja E) ja Z-potentsiaal (B, D ja F). CS_0.3, CS_1 ja CS_3 tähistab vastavalt Ag:CS massisuhet 1:0.3, 1:1 ja 1:3 ning 0 t ja 1 n mõõtmist peale sünteesi ning ühe nädalast seismist toatemperatuuril.

4.2.2 Kõrge molekulmassiga kitosaan

Kõrge molekulmassiga (HMW) kitosaaniga korrati LMW kitosaaniga läbiviidud sünteese, kus nAgCS sünteesiti kolme erineva hõbeda-kitosaani massisuhtega (1:0.3, 1:1 ja 1:3) ning võrreldi nAgCS füüsikalise-keemiliste omaduste muutumist seitsme erineva pH väärtuse juures. Uuringu eesmärgiks oli välja selgitada, kas kõrge molekulmassiga kitosaaniga sünteesitud nanokomposiitide omadused sõltuvad sünteesikeskkonna pH-st. Joonisel 10 on välja toodud sünteesitud nanokomposiitide hüdrodünaamilised suurused ja Z-potentsiaalid. UV-Vis neeldumisspektrid on esitatud Lisas 2.

Peale sünteese olid nAgCS d_H vastavalt 71–134 nm (nAgCS_0.3), 85–115 nm (nAgCS_1) ja 113–123 nm (nAgCS_3). Samamoodi nagu LMW kitosaaniga sünteesitud nanokomposiitide korral, ka HMW kitosaaniga sünteesitud nAgCS_0.3 ja nAgCS_1 mõjutab sünteesikeskkonna pH osakeste d_H , olles väiksem madala pH juures. nAgCS_3 korral ei olnud seost näha d_H ja pH vahel (Joonis 10 A, C ja E), ilmselt kuna kitosaani lisamine langetas suspensiooni pH-d (Tabel 3). Peale ühe nädalast seismist toatemperatuuril olid d_H väärtused vastavalt 98–140 nm (nAgCS_0.3), 103–151 nm (nAgCS_1) ja 124–130 nm (nAgCS_3). Võrreldes HMW ja LMW kitosaani hõbeda-kitosaani nanokomposiite, on näha, et tulemused olid d_H osas üldiselt sarnased, kuid peale ühe nädala seismist HMW nAgCS_1 pH-l 6.5-5.0 suurenes d_H märgatavalt, mis erines LMW nAgCS_1 tulemustest, kus d_H ei muutunud, erandiks olid ainult pH 5.0 ja 4.5, mille korral d_H peaaegu kahekordistus.

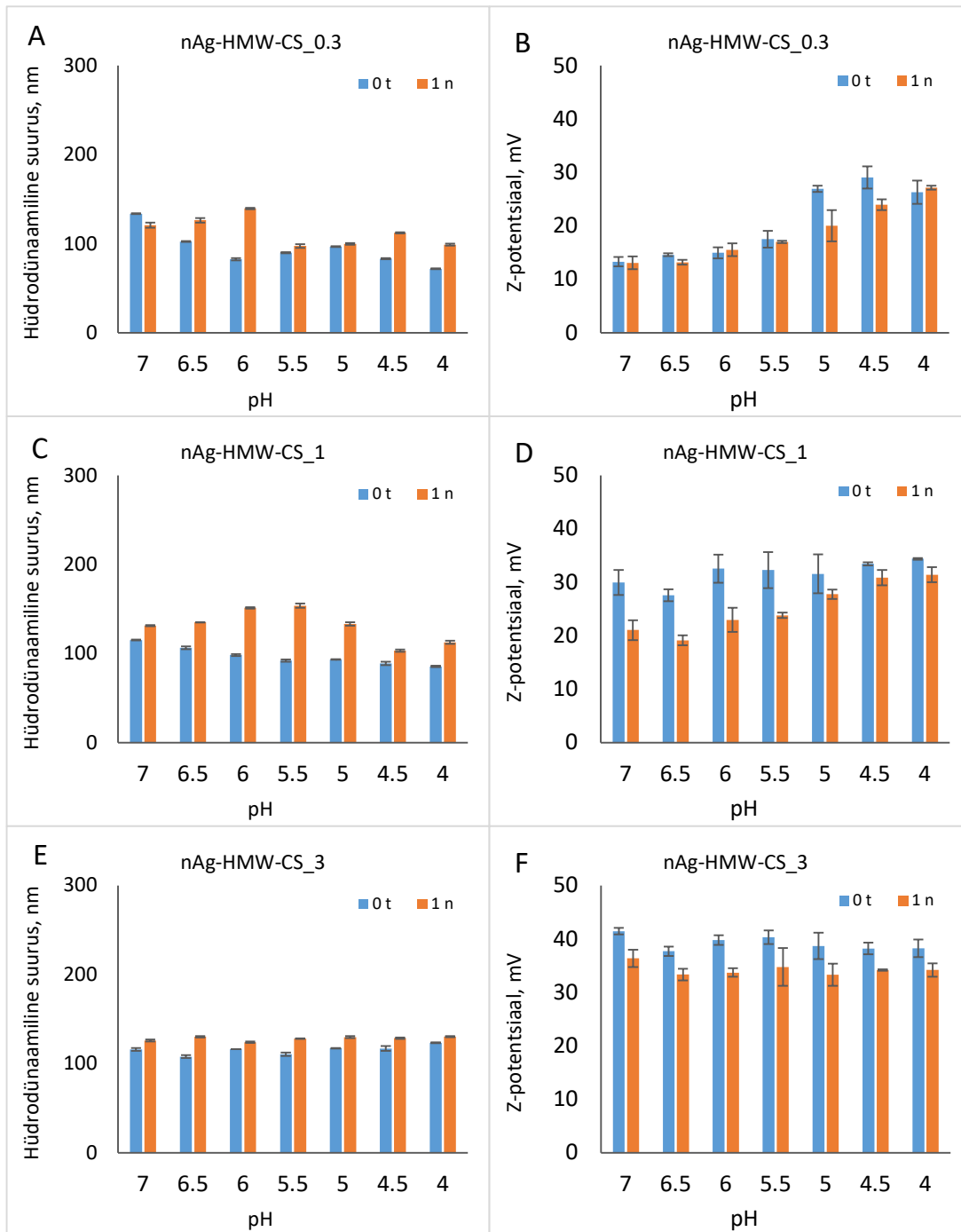
Peale sünteese olid nAgCS Z-potentsiaalid vastavalt +13–29 mV (nAgCS_0.3), +29–34 mV (nAgCS_1) ja +38–41 mV (nAgCS_3) ning tulemused näitasid, et 1:0.3 ja 1:1 Ag:CS massisuhte korral Z-potentsiaal suureneb madalamatel pH väärtustel ning 1:3 Ag:CS massisuhte korral Z-potentsiaal ei muutunud. Peale nädalast seismist toatemperatuuril vähenes nAgCS_1 Z-potentsiaal pH väärtustel 7.0-5.5 keskmiselt 8 mV ja nAgCS_3 kõigis proovides keskmiselt 5 mV. See tulemus erines LMW kitosaaniga sünteesitud nAgCS tulemustest, kus Z-potentsiaal oli stabiilne. Tõenäoliselt põhjustab muutust d_H -s ja Z-potentsiaalis kitosaani suurem molekulmass, mistõttu kitosaan ei kinnitu nii efektiivselt AgNPs ning seetõttu Z-potentsiaal väheneb ja d_H suureneb ajas (Joonis 10 B, D ja F).

UV-Vis neeldumisspektritest (Lisa 2) on näha, et sünteesikeskkonna pH mõjutab minimaalselt nAgCS maksimaalset neeldumise lainepikkust ja absorptsiooni väärtusi, ainult 1:0.3 Ag:CS massisuhtega nanokomposiitidel esines pH 6.5 ja 6.0 juures langus neeldumisspektrite haripunktis. Neeldumisspektrite stabiilsus ja absorptsiooni väärtuste suurenemine pigem näitab, et suspensioonis olevad nAgCS on stabiilsed. Kõikidel teistel pH väärtustel ja Ag:CS massisuhete korral neeldumisspektri haripunkt oli sisuliselt sama või suurenes nagu 1:3 Ag:CS massisuhte korral. Kuigi

neeldumisspektri haripunkti suurenemine pole nähtavalt seotud pH väärtustega, erineb see LMW kitosaaniga sünteesitud nAgCS tulemustest, kus seos pH ja UV-Vis neeldumisspektri vahel oli olemas, lisaks on HMW kitosaaniga sünteesitud nAgCS neeldumisspektrid umbes 20% suurema absorptsiooni haripunktiga, neid kõiki erinevusi põhjustab kõige tõenäolisemalt erinevus kitosaani molekulmassis. Üheks põhjuseks võib olla, et HMW CS stabiliseerib halvemini AgNPs kui LMW CS.

Hüdrodünaamiline suurus

Z-potentsiaal



Joonis 10. Trinaatriumtsitraadiga ja kõrge molekulmassiga (HMW) kitosaaniga sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAg-LMW-CS) hüdrodünaamiline suurus (A, C ja E) ja Z-potentsiaal (B, D ja F). CS_0.3, CS_1 ja CS_3 tähistab vastavalt Ag:CS massisuhet 1:0.3, 1:1 ja 1:3 ning 0 t ja 1 n mõõtmist peale sünteesi ning ühe nädalast seismist toatemperatuuril.

4.3 Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide süntees naatriumboorhüdriidiga

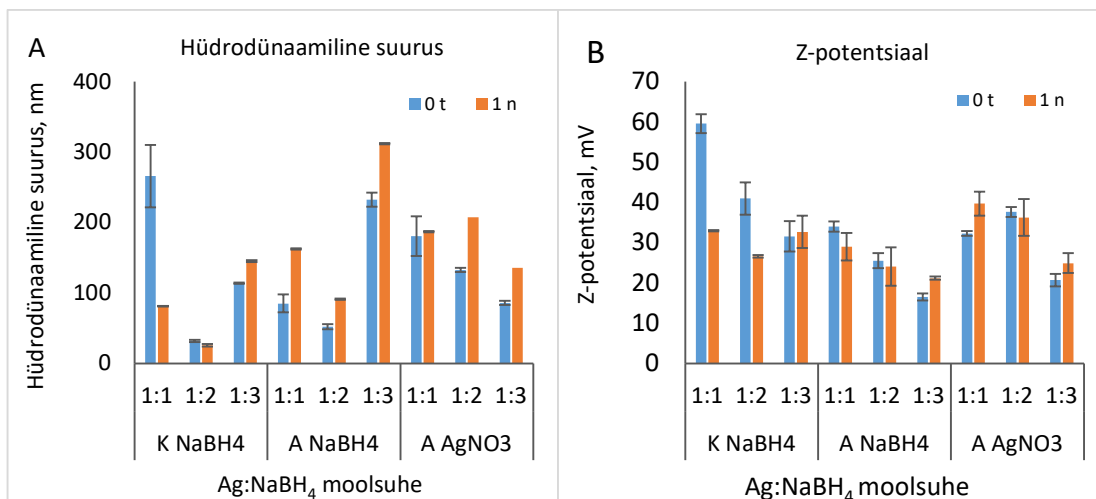
Naatriumboorhüdriidiga (NaBH_4) sünteeside eesmärgiks oli määrata kitosaani molekulmassi, hõbeda-kitosaani massisuhte, reagentide lisamise järjekorra ja hõbeda-naatriumboorhüdriidi moolsuhte mõju hõbeda-kitosaani nanokomposiitide füüsikaliskemilistele omadustele ja stabiilsusele.

4.3.1 Madala molekulmassiga kitosaan

Nanokomposiitide sünteesid madala molekulmassiga (LMW) kitosaaniga viidi läbi kahes etapis. Esimeses etapis uuriti hõbeda-naatriumboorhüdriidi erinevate moolsuhete ($\text{Ag}:\text{NaBH}_4$), naatriumboorhüdriidi lisamise kiiruse ja reagentide (NaBH_4 või $\text{AgNO}_3\text{-CS}$ segu) lisamise järjekorra mõju hõbeda-kitosaani nanokomposiitide ($n\text{AgCS}$) omadustele. Nendes katsetes oli $\text{Ag}:\text{CS}$ massisuhe 1:1 ($n\text{AgCS}_1$). Esimese etappi tulemusena valiti välja sünteesi tingimused ja uuriti, kas need tingimused on rakendatav ka teiste $\text{Ag}:\text{CS}$ massisuhetega nanokomposiitide ($n\text{AgCS}_{0.3}$ ja $n\text{AgCS}_1$) sünteesil. Nendes sünteesides saadud nanokomposiitide Z-potentsiaalid, hüdrodünaamilised suurused ja UV-Vis absorptsiooni spektrid on toodud Joonistel 11 ja 12.

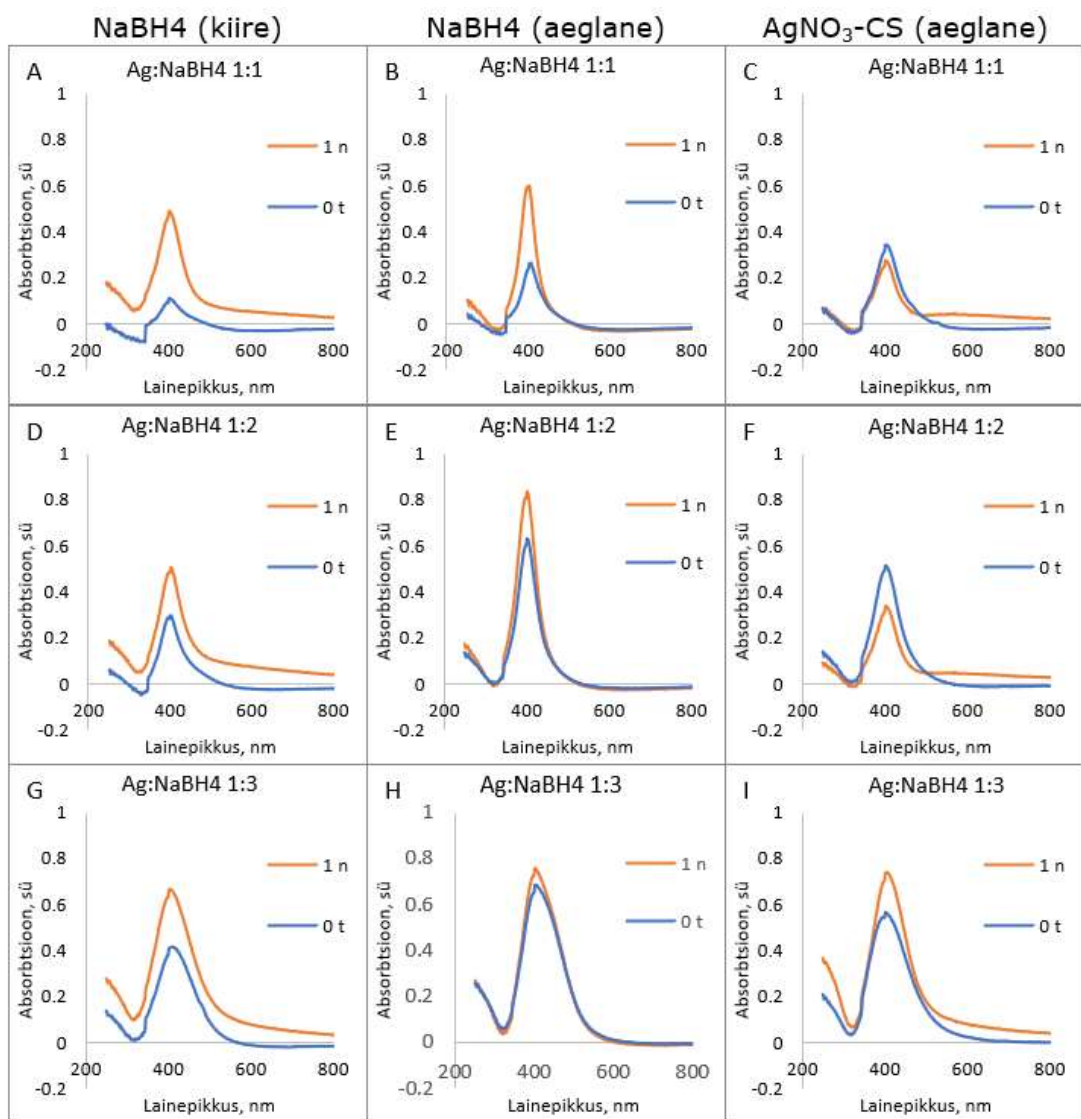
Sünteesides, kus lisati NaBH_4 kiirelt (~ 1 sec) $\text{AgNO}_3\text{-CS}$ lahusesse on $\text{Ag}:\text{NaBH}_4$ 1:1 moolsuhetega (MS) sünteesitud $n\text{AgCS}$ d_H 260 nm, kuid peale ühe nädalast seismist vähenes 80 nm-le. Selline langus d_H -s võib tuleneda $n\text{AgCS}$ ebastabiilsusest või agregatsioonist ja sadenemisest. Teiste moolsuhetega sünteesitud $n\text{AgCS}$ hüdrodünaamilised suurused muutusid ajas vähe: 1:2 MS korral d_H vähenes 32 nm-lt 26 nm-le ja 1:3 MS korral suurenes d_H 113 nm-lt 145 nm-le (Joonis 11). Sünteesides, kus NaBH_4 lisati aeglaselt $\text{AgNO}_3\text{-CS}$ lahusesse, on näha, et 1:1 ja 1:2 $\text{Ag}:\text{NaBH}_4$ moolsuhte korral olid $n\text{AgCS}$ d_H vastavalt 85 ja 52 nm, kuid 1:3 $\text{Ag}:\text{NaBH}_4$ moolsuhtel rakendamisel d_H oli 230 nm. Peale $n\text{AgCS}$ seismist üks nädal toatemperatuuril suurenes kõikide $n\text{AgCS}$ d_H (Joonis 11). Sünteesides, kus $\text{AgNO}_3\text{-kitosaani}$ lahust lisati aeglaselt NaBH_4 lahusesse, esines seos $\text{Ag}:\text{NaBH}_4$ moolsuhte ja sünteesitud $n\text{AgCS}$ hüdrodünaamilise suuruse vahel: moolsuhte suurenedes nanokomposiitide d_H vähenes. Erinevate $\text{Ag}:\text{NaBH}_4$ 1:1 moolsuhte korral (1:1, 1:2 ja 1:3) olid $n\text{AgCS}$ d_H vastavalt 180, 132 ja 86 nm. Peale ühe nädalast seismist nanokomposiitide d_H mõnevõrra suurenes (vastavalt 187, 207 ja 136 nm).

Seos Z-potentsiaali (Joonis 11 B) ja $\text{Ag}:\text{NaBH}_4$ moolsuhte vahel on negatiivne, kus NaBH_4 koguse suurendamine vähendab $n\text{AgCS}$ Z-potentsiaali. Kuna NaBH_4 on tugevalt aluseline ning tõstab lahuse pH taset, mis vähendab kitosaani protoneerituse astet ja laengut.



Joonis 11. Naatriumboorhüdriidiga (NaBH₄) ja madala molekulmassiga kitosaaniga sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAg-LMW-CS, Ag:CS massisuhe 1:1) hüdrodünaamiline suurus (A) ja Z-potentsiaal (B) peale sünteesi (0 t) ja peale ühe nädala (1 n) seismist toatemperatuuril. Sünteesil kasutati erinevaid Ag:NaBH₄ moolsuheteid (1:1, 1:2, 1:3) ja reagentide/lahuste lisamise kiiruseid – kiire (K) ja aeglane (A). Kiire lisamine – ~1 sek jooksul; aeglane lisamine – ~2 min jooksul.

UV-Vis absorptsiooni spektritelt (Joonis 12) on näha, et erinev Ag:NaBH₄ moolsuhe mõjutab sünteesitud nAgCS stabiilsust. Ag:NaBH₄ moolsuhte kasvades esines tõus neeldumisspektrite haripunktides ning peale ühe nädalast seismist toatemperatuuril esines väiksem langus haripunkti väärtustes, viidates nanokomposiitide suuremale stabiilsusele (Joonis 12 B, E ja H). NaBH₄ stabiliseerivaid omadusi on varem uurinud Solomon jt (2007) ja Song jt (2009)[27], [30], näidates, et Ag:NaBH₄ moolsuhte suurendamine suurendas hõbeda nanoosakeste stabiilsust. Lisaks leidsid Song jt (2009) [27], et hõbeda-naatriumboorhüdridi moolsuhte muutmine vahemikus 1:2 kuni 1:10 ei mõjutanud oluliselt nanoosakeste suurust. Võrreldes reagentide lisamise kiiruse ja järjekorra mõju neeldumisspektritele on näha, et nende mõju vähenes Ag:NaBH₄ moolsuhte kasvades, kuna Ag:NaBH₄ 1:3 moolsuhte korral olid sünteesitud nAgCS kõige stabiilsemad. Samas Ag:NaBH₄ 1:1 ja 1:2 moolsuhte korral tekkisid homogeensemad nAgCS, kuna neeldumisspektri piik on kitsam ja kõrgem (Joonis 12 B, E). Sünteesides, kus AgNO₃ ja CS lahust lisati aeglaselt (~2 min jooksul) NaBH₄ lahusesse on neeldumisspektri piigid madalamad ja haripunktid laiemad 1:1 ja 1:2 Ag:NaBH₄ moolsuhtel võrreldes, sünteesidega, kus NaBH₄ lisati aeglaselt AgNO₃-kitosaani lahusesse.

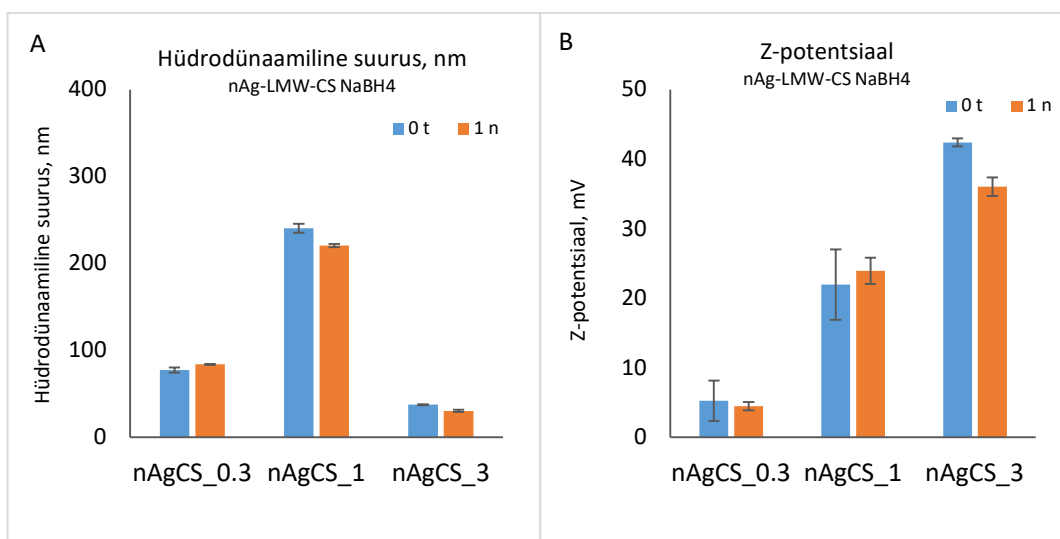


Joonis 12. Naatriumboorhüdriidiga (NaBH_4) ja madala molekulmassiga kitosaaniga (LMW) sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiidid (nAg-LMW-CS) UV-Vis absorptsiooni spektrid peale sünteesi (0 t) ja ühe nädala (1 n) seismist toatemperatuuril. Ag: NaBH_4 1:1, 1:2 ja 1:3 on vastav moolsuhe. Hõbeda-kitosaani massisuhe sünteesil oli 1:1 (nAgCS_1). Kiire lisamine – ~1 sek jooksul; aeglane lisamine – ~2 min jooksul.

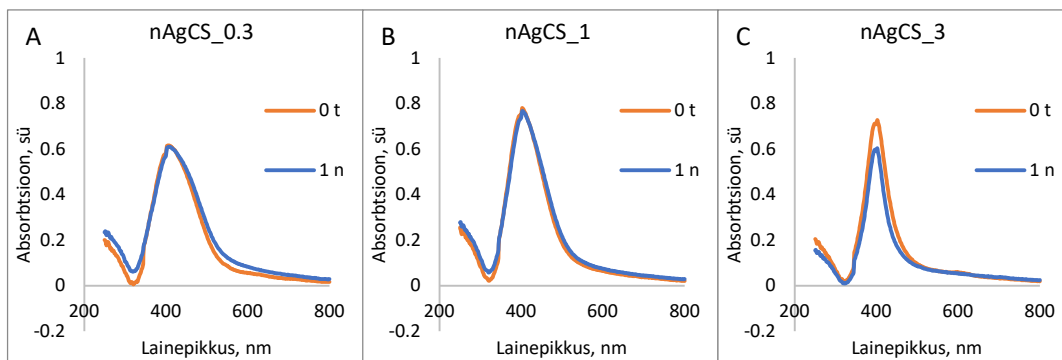
Lähtuvalt saadud tulemustest, valiti nAgCS edasisteks sünteesideks järgmised tingimused: Ag: NaBH_4 1:3 moolsuhe ja NaBH_4 aeglane lisamine AgNO_3 -CS lahusesse, kuna nende tingimuste kasutamisel olid sünteesitud nanokomposiitide UV-Vis spektrid kõige kõrgemate haripunktidega ja langus 1 nädala jooksul kõige väiksem (osakesed olid stabiilsed).

Välja valitud sünteesitingimusi kasutati ka hõbeda ja kitosaani massisuhetega 1:0.3 (nAgCS_0.3) ja 1:3 (nAgCS_3) nanokomposiitide sünteesil (Joonis 13 & 14), et välja selgitada nende tingimuste rakendatavust teistsuguse Ag:CS massisuhetega

nanokomposiitide sünteesil. Jooniselt 13 A on näha, et kõige väiksema d_H -ga nanokomposiidid tekkisid 1:3 Ag:CS massisuhtel ning Jooniselt 13 B on näha, et Z-potentsiaal suurenes Ag:CS massisuhte suurenedes, mis tulenes sünteesikeskkonna madalamast pH-st ja kitosaani protoneerumisest. UV-Vis neeldumisspektrilt on näha, et Ag:CS massisuhte suurenedes neeldumispik kitseneb, viidates osakeste väiksemale suurusjaotusele (Joonis 14).



Joonis 13. Naatriumboorhüdriidiga (Ag:NaBH₄ moolsuhe 1:3) ja madala molekulmassiga kitosaaniga (LMW) sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAg-LMW-CS) hüdrodünaamiline suurus (A) Z-potentsiaal (B) peale sünteesi (0 t) ja seismist üks nädal (1 n) toatemperatuuril. nAgCS_0.3, nAgCS_1 ja nAgCS_3 tähistab Ag:CS massisuhet 1:0.3, 1:1 ja 1:3.



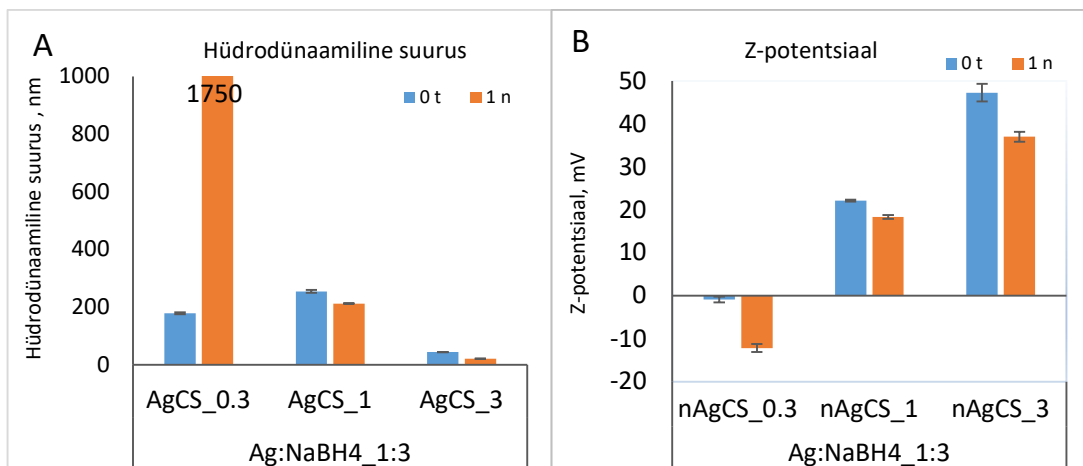
Joonis 14. Naatriumboorhüdroidiga ($\text{Ag}:\text{NaBH}_4$ moolsuhe 1:3) ja madala molekulmassiga kitosaaniga (LMW) sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAg-LMW-CS) UV-Vis absorptsiooni spektrid peale sünteesi (0 t) ja peale ühe nädala (1 n) seismist toatemperatuuril. nAgCS_0.3, nAgCS_1 ja nAgCS_3 tähistavad vastavalt 1:0.3, 1:1 ja 1:3 Ag:CS massisuhet.

4.3.2 Kõrge molekulmassiga kitosaan

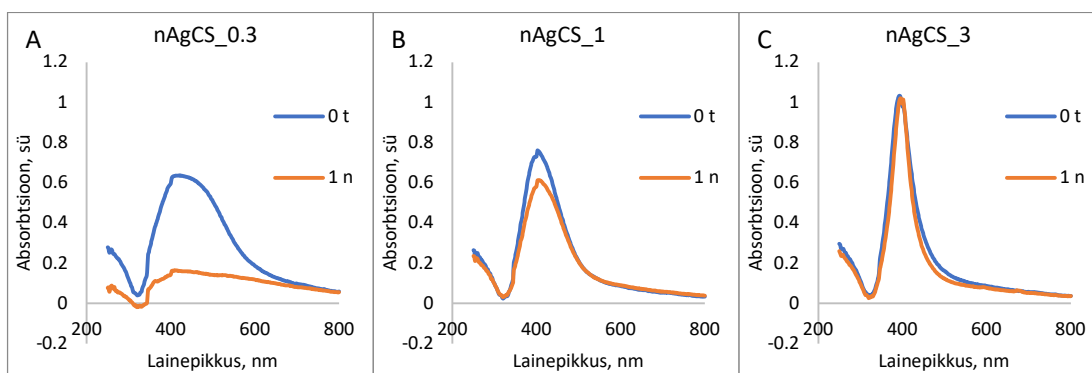
Kõrge molekulmassiga kitosaaniga korrati LMW kitosaaniga tehtud nAgCS sünteesi, kasutades juba eelnevates etappides välja valitud sünteesitingimusi: 1:3 Ag: NaBH_4 moolsuhe ja NaBH_4 aeglane lisamine AgNO_3 -kitosaani lahusesse. Sünteesitud nanokomposiitide hüdrodünaamiline suurus, Z-potentsiaal ja UV-Vis absorptsiooni spektrid on toodud Joonistel 15 ja 16.

Jooniselt 15 A on näha et HMW sünteesitud nAgCS_0.3 ei olnud stabiilsed, kuna peale ühe nädalast seismist suurenes d_H nanoskaalalt (179 nm) mikroskaalale (1750 nm). Koheselt sünteesitud nAgCS_0.3 Z-potentsiaal oli ~ 0 mV ja peale ühe nädalast seismist oli -12 mV. UV-Vis neeldumisspekter (Joonis 16 A) näitab samuti, et nAgCS_0.3 osakesed olid ebastabiilsed - peale ühe nädalast seismist esines ~ 3 -kordne langus OD haripunktis, mis viitab osakeste agregatsioonile ja sadenemisele. Seda võis põhjustada naatriumboorhüdroidi liig, mille tõttu suurenes lahuse pH väärtuse üle 6.5, põhjustades kõrge molekulmassiga kitosaani deprotoneerumist.

Samas olid nAgCS_1 ja nAgCS_3 stabiilsemad (Joonis 15 & 16): hüdrodünaamiline suurus ja Z-potentsiaal muutusid ajas vähe ja UV-Vis neeldumisspektrilt on näha, et neeldumiskiigi absoluutväärtused olid suhteliselt stabiilsed.



Joonis 15. Naatriumboorhüdriidiga (Ag:NaBH₄ moolsuhe 1:3) ja kõrge molekulmassiga kitosaaniga (HMW) sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAg-HMW-CS) hüdrodünaamiline suurus **(A)** Z-potentsiaal ja **(B)** peale sünteesi (0 t) ja seismist üks nädal (1 n) toatemperatuuril. nAgCS_0.3, nAgCS_1 ja nAgCS_3 tähistab Ag:CS massisuhet 1:0.3, 1:1 ja 1:3.



Joonis 16. Naatriumboorhüdriidiga (NaBH₄) ja kõrge molekulmassiga kitosaaniga (HMW) sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAg-HMW-CS) UV-Vis absorptsiooni spektrid peale sünteesi (0 t) ja peale ühe nädala (1 n) seismist toatemperatuuril. nAgCS_0.3, nAgCS_1 ja nAgCS_3 tähistavad vastavalt 1:0.3, 1:1 ja 1:3 Ag:CS massisuhet.

4.4 Dialüüsitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide füüsikaliskemilised omadused dieoniseeritud vees ja kunstlikus haavavedelikus

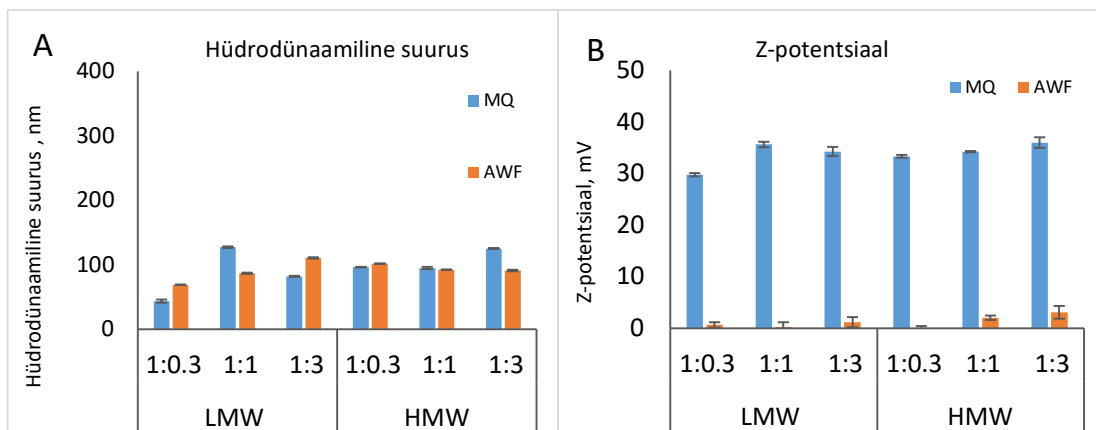
Eelnevate katsete alusel valiti välja hõbeda-kitosaani nanokomposiitide sünteesitingimused, mille alusel korrati nAgCS sünteesi nii TSC kui ka NaBH₄-ga. Nanokomposiitide sünteesiks TSC-ga reguleeriti sünteesikeskkonna pH 4.0-ni ja NaBH₄ sünteesidest jätkati 1:3 Ag:NaBH₄ moolsuhtega ja NaBH₄ aeglase lisamisega AgNO₃-CS segusse. Sünteesitud nAgCS dialüüsiti MQ vees ja määrati siis uuesti nende

füüsikalise-keemilised omadused nii MQ vees kui ka kunstlikus haavavedelikus (AWF) (toksilisuse määramise testikeskkonnad bakterile *E. coli* MG1655). Sünteesitud nAgCS dialüüsi MQ vees, et eemaldada madalmolekulaarsed sünteesiprotsessi lähte- ja jääkaineid. Dialüüsitud nAgCS d_H ja Z-potentsiaali väärtused on toodud Joonistel 17 ja 18 ning UV-Vis absorptsiooni spektrid on esitatud Lisas 3. TSC-ga ja NaBH₄-ga sünteesitud nAgCS primaarsuurused olid vastavalt 50±10 nm ja 10±4 nm (primaarsuurust määrati transmissioon elektronmikroskoobiga tellimustööna Tartu Ülikoolis).

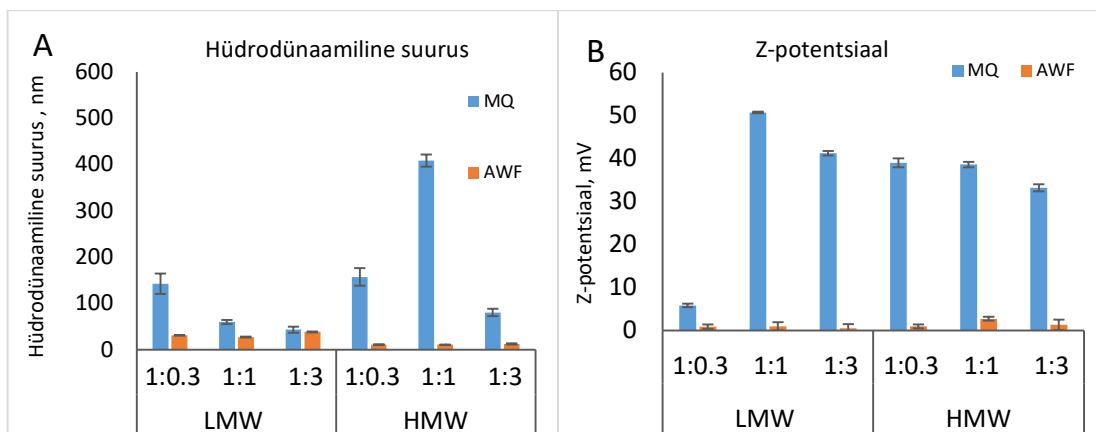
Jooniselt 17 A ja 18 A on näha, et MQ vees on dialüüsitud nAgCS Z-potentsiaal vahemikus +20 – +40 mV, sõltumata kasutatud redutseerijast ja Ag:CS massisuhtest ning AWF-s nAgCS Z-potentsiaalid olid ±1 mV. Z-potentsiaali langust põhjustab hõbeda kelaatumine kunstlikus haavavedelikus oleva veise seerumi albumiiniga. [49]

Hüdrodünaamiline suurus TSC-ga sünteesitud nAgCS oli MQ vees ja AWF-s 70-120 nm ning seost d_H ja Ag:CS massisuhte vahel ei esinenud. NaBH₄-ga sünteesitud nAg-LMW-CS d_H MQ vees vähenes Ag:CS massisuhte suurenedes (Joonis 18 A). HMW-CS sünteesitud osakestel oli nAgCS_1 d_H 400 nm, kuid AWF-s oli nAg-LMW-CS d_H 30-40 nm ja nAg-HMW-CS väiksem kui 15 nm. Hüdrodünaamilise suuruse langus tuleneb tõenäoliselt nAgCS ja veise seerumi albumiini omavahelisest seosest, mis kas aitab stabiliseerida nAgCS või agregeerib ja sadestab nAgCS lahusest välja, jättes ainult kõige väiksemad nAgCS suspensiooni.

UV-Vis neeldumisspektritelt on näha (Lisa 3), et TSC-ga sünteesides nAg-LMW-CS neeldumisspektrid MQ vees on väga sarnased, sõltumata Ag:CS massisuhtest, sama tulemus oli ka HMW kitosaaniga sünteesitud osakestel. Kuid Ag:CS massisuhte suurenedes AWF-s nAgCS haripunktide langus väheneb võrreldes haripunktidega MQ vees. NaBH₄ sünteesitud nAgCS neeldumisspektri piigid on kitsamad kui TSC-ga sünteesitud nanokomposiitidel.



Joonis 17. Trinaatriumtsitraadiga sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide hüdrodünaamiline suurus (**A**) ja Z-potentsiaal (**B**). LMW ja HMW tähistavad vastavalt madala ja kõrge molekulmassiga kitosaani ning 1:0.3, 1:1 ja 1:3 Ag:CS massisuhet. MQ - deioniseeritud vesi ja AWF - kunstlik haavavedelik.



Joonis 18. Naatriumboorhüdriidiga (NaBH_4) sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide hüdrodünaamiline suurus (**A**) ja Z-potentsiaal (**B**). LMW ja HMW tähistavad vastavalt madala ja kõrge molekulmassiga kitosaani ning 1:0.3, 1:1 ja 1:3 Ag:CS massisuhet. MQ - deioniseeritud vesi ja AWF - kunstlik haavavedelik.

4.5 Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide toksilisus bakterile *Escherichia coli*

Sünteesitud nanokomposiitide mürgisust testiti meditsiiniliselt olulisele Gram-negatiivsele bakterile *E. coli* MG1566 nii MQ vees kui ka kunstlikus haavavedelikus peale 2 ja 24 tunni ekspositsiooni. Määrati minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon (MBK, madalaim testitud kontsentratsioon, mis tapab bakterid).

4.5.1 Deioniseeritud vees

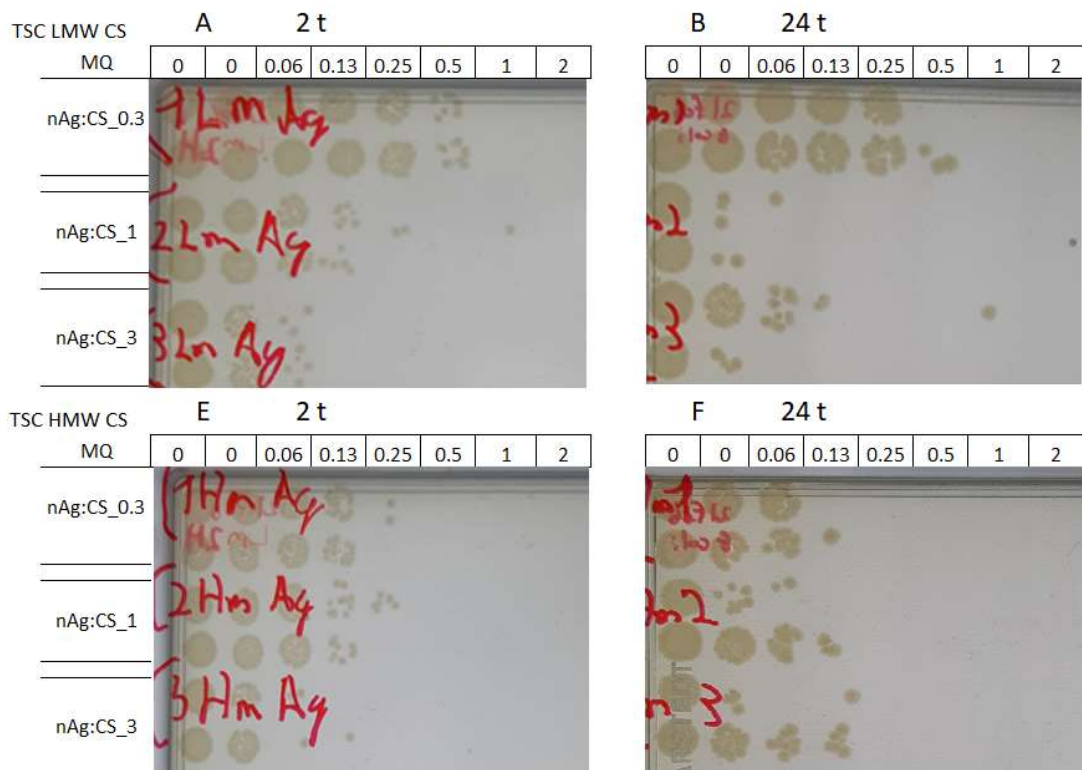
Tulemused näitasid, et hõbeda-kitosaani nanokomposiitide toksilisus MQ vees sõltus eelkõige kokkupuute ajast ja Ag:CS massisuhtest (Tabel 4). Kokkupuute aja pikenemisel suurenes nAgCS toksilisus ~35%.

TSC-ga sünteesitud nAgCS (~50 nm) elulemuse testi tulemused näitasid, et Ag:CS massisuhte suurenedes, suurenes ka nAgCS toksilisus nii LMW kui ka HMW kitosaaniga sünteesitud nanokomposiitide korral. nAg-LMW-CS_0.3, nAg-LMW-CS_1 ja nAg-LMW-CS_3 2-tunni MBK väärtused olid vastavalt 0.67, 0.31 ja 0.16 mg Ag/L ja peale 24 tunni ekspositsiooni 0.43, 0.11 ja 0.11 mg Ag/L. nAg-HMW-CS 2-t MBK väärtused olid vastavalt 0.38, 0.44 ja 0.19 mg Ag/L ja peale 24 tunni kokkupuudet 0.16, 0.17 ja 0.19 mg Ag/L. nAg-HMW-CS osakesed olid ~10% toksilisemad kui nAg-LMW-CS, kuid suurt erinevust nende bakteritsiidses toimes bakterile *E. coli* MG1655 ei olnud

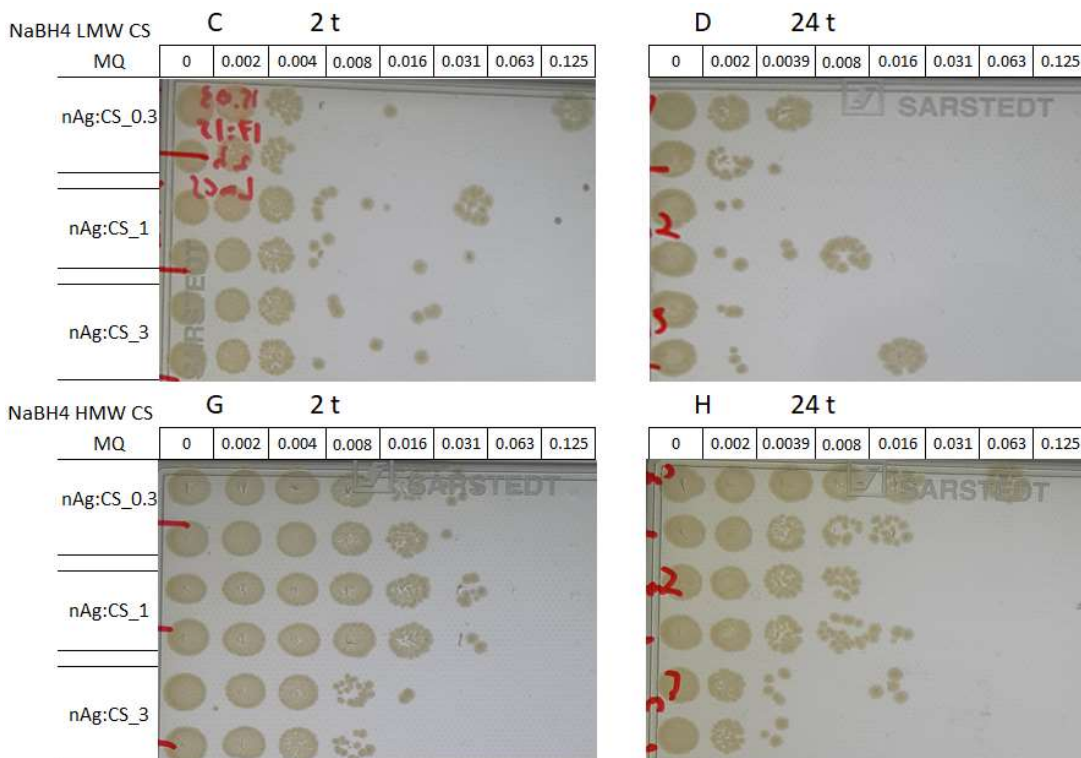
NaBH₄-ga sünteesitud (~10 nm) nAg-HMW-CS olid ~30% toksilisemad kui nAg-LMW-CS nanokomposiidid. nAg-LMW-CS muutusid küll ajaga mürgisemaks, kuid ei olnud seost Ag:CS massisuhte ja antibakteriaalsuse vahel nagu oli 50 nm nanokomposiitide korral.

NaBH₄-ga (~10 nm) ja TSC-ga (~50 nm) sünteesitud nAgCS mürgisus bakterile *E. coli* MG1655 sõltus kitosaani molekulmassist: 10 nm nAg-HMW-CS olid peale 2 tunni ekspositsiooni 6-10 korda mürgisemad kui 50 nm nAg-HMW-CS, kuid LMW kitosaaniga sünteesitud 10 ja 50 nm nanokomposiitide mürgisused olid võrdlemisi sarnased. Erandiks olid 10 nm nAg-HMW-CS_0.3, mis olid peale 2 ja 24 tunni kokkupuudet vastavalt ~7 ja ~4 korda toksilisemad kui nAgCS-LMW-0.3 (Tabel 4). Võrreldes NaBH₄-ga ja TSC-ga sünteesitud nAg-LMW-CS oli näha, et 2 tunnise kokkupuute ajaga muutub Ag:CS massisuhte suurenedes TSC-nAgCS toksilisemaks, kuid NaBH₄-nAgCS toksilisus vähenes, samas 24 tunnisel kokkupuutel ei olnud NaBH₄-nAgCS MBK 1:0.3, 1:1 ja 1:3 Ag:CS massisuhetel erinevad, olles vastavalt 0.11 , 0.14 ja 0.13 mg Ag/L.

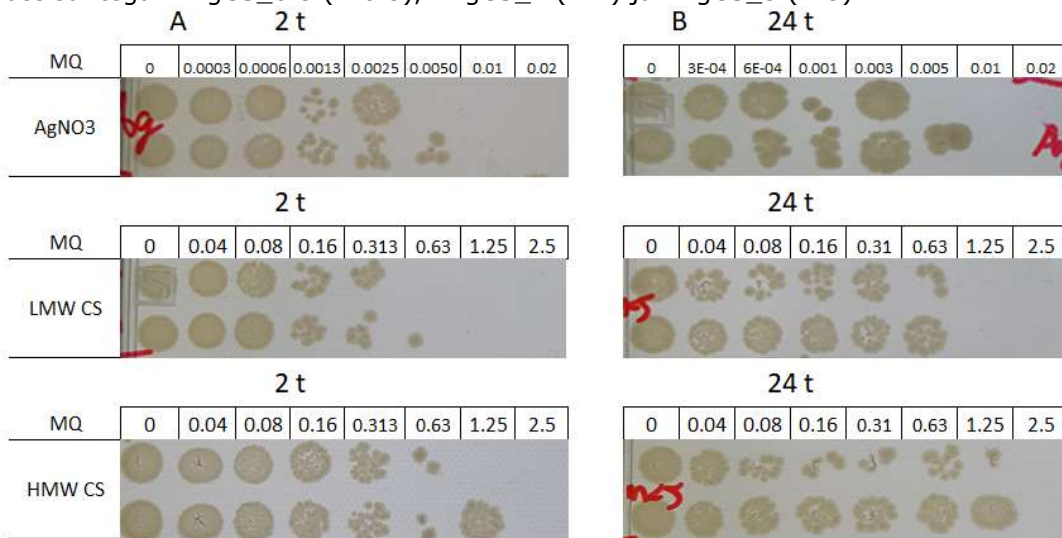
Võrdluse jaoks määrati ka AgNO₃ ning LMW ja HMW kitosaani MBK (Joonis 19). Hõbenitraadi MBK oli peale 2 ja 24 tunni ekspositsiooni 0.01 mg Ag/L, mis oli sarnane kirjanduses väljatoodud *E. coli* MBK väärtustega - 0.01-0.02 mg Ag/L. [47], [50], [51] Kitosaani elulemuse testide tulemused näitasid, et üldiselt on LMW kitosaan toksilisem kui HMW kitosaan ning ekspositsiooni aja pikenemisel LMW kitosaani toksilisus vähenes ja MBK suurenes 0.78 mg/L-t 1.09 mg/L-le, kuid HMW kitosaani toksilisus püsis stabiilselt MBK 1.88 mg/L juures.



Joonis 19. Trinaatriumtsitraadiga (TSC) sünteetitud madala (LMW; A, B) ja kõrge (HMW; E, F) molekulmassiga kitosaaniga kitosaani-hõbeda nanokomposiitide (nAgCS) toksilisus bakterile *Escherichia coli* MG1655 deioniseeritud vees (MQ) peale 2 ja 24 tunnist kokkupuudet 30°C juures (Spot test). nAgCS olid erineva Ag:CS massisuhtega: nAgCS_0.3 (1:0.3), nAgCS_1 (1:1) ja nAgCS_3 (1:3).



Joonis 20. Naatriumboorhüdriidiga (NaBH_4) ning madala (LMW; A, B) ja kõrge (HMW; C, D) molekulmassiga sünteetisid kitosaani-hõbeda nanokomposiitide (nAgCS) toksilisus bakterile *Escherichia coli* MG1655 deioniseeritud vees (MQ) peale 2 ja 24 tundi kokkupuudet 30°C juures (Spot test). nAgCS olid erineva Ag:CS massisuhtega: nAgCS_0.3 (1:0.3), nAgCS_1 (1:1) ja nAgCS_3 (1:3).



Joonis 21. Hõbenitraadi (AgNO_3), madala (LMW CS) ja kõrge molekulmassiga kitosaani (HMW CS) toksilisus bakterile *Escherichia coli* MG1655 deioniseeritud vees (MQ) peale 2 (A) ja 24 (B) tundi kokkupuudet 30°C juures (Spot test).

Tabel 4. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAgCS, ~10 ja ~50 nm), hõbenitraadi (AgNO₃), madala (LMW) ja kõrge molekulmassiga (HMW) kitosaani minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon (MBK) bakterile *Escherichia coli* MG1655 peale 2 ja 24 tunni kokkupuudet 30°C juures deioniseeritud vees (MQ) või kunstlikus haavavedelikus (AFW). nAgCS sünteesiti kas trinaatriumtsitraadiga (TSC) või naatriumboorhüdriidiga (NaBH₄) hõbeda-kitosaani massisuhetel, kus nAgCS_0.3, nAgCS_1 ja nAgCS_3 tähistavad vastavalt 1:0.3, 1:1 ja 1:3 Ag:CS massisuhet. Kõik katsed viidi läbi kahes või kolmes korduses.

Keskkond	Sünteesi meetod	MBK, mg (Ag)/L	2 t		24 t	
			LMW	HMW	LMW	HMW
MQ	TSC (~50 nm)	nAgCS_1:0.3	0.67	0.38	0.43	0.16
		nAgCS_1:1	0.31	0.44	0.11	0.17
		nAgCS_1:3	0.16	0.19	0.11	0.19
	NaBH ₄ (~10 nm)	nAgCS_1:0.3	0.09	0.06	0.11	0.06
		nAgCS_1:1	0.38	0.04	0.14	0.02
		nAgCS_1:3	0.25	0.03	0.13	0.02
	Kitosaan	0.78	1.88	1.09	1.88	
	AgNO ₃	0.01		0.01		
AWF	TSC (~50 nm)	nAgCS_1:0.3	>45.0	>50.0	16.9	12.5
		nAgCS_1:1	45.0	50.0	9.84	12.5
		nAgCS_1:3	25.0	25.0	4.69	6.25
	NaBH ₄ (~10 nm)	nAgCS_1:0.3	35.0	40.0	6.56	4.38
		nAgCS_1:1	10.9	32.8	2.34	4.10
		nAgCS_1:3	7.8	25.0	2.34	3.13
	Kitosaan	>400	>400	>400	>400	
	AgNO ₃	9.77		2.08		

4.5.2 Kunstlikus haavavedelikus

Kunstlikus haavavedelikus (AWF) läbi viidud elulemuse testid näitasid, et testikeskkond mõjutab nAgCS bakteritsiidsus (Tabel 4). AWF-s vähenes märkimisväärselt nAgCS toksilisust kuni 100 korda võrreldes MQ veega. Sellist muutust põhjustas tõenäoliselt AWF koostises olev veise seerum albumiin (BSA), mis on võimeline siduma vabanevaid hõbeda ioone, kuna omab negatiivset laengut tänu oma mitmetele karboksüül rühmadele. Lisaks võib esineda positiivselt laetud nAgCS ja negatiivselt laetud BSA vahel vastastikune tõmbumine, mille tulemusel nAgCS Z-potentsiaal langeb ligi 0 mV-ni, mis omakorda vähendab nAgCS interaktsiooni tõenäosust bakteritega.[49], [52]

TSC-ga sünteesitud (~50 nm) nAg-LMW-CS_0.3, nAg-LMW-CS_1 ja nAg-LMW-CS_3 MBK väärtused olid peale 2 tunni kokkupuudet vastavalt >50, 45 ja 25 mg Ag/L ja NaBH₄-ga sünteesitud nanokomposiitide vastavad 2 tunni MBK-d olid 35, 11 ja 8 mg Ag/L. Peale 24 tundi nii LMW kui ka HMW nAgCS toksilisus suurenes.

NaBH₄-ga sünteesitud nAgCS (~10 nm) toksilisuse bakteritele peale 2 tunnist kokkupuudet sõltus samuti Ag:CS massisuhtest (1:0.3, 1:1 ja 1:3): nAg-LMW-CS ja nAg-HMW-CS 2-tunni MBK väärtused olid vastavalt 35, 11 ja 7.8 mg Ag/L ning 40, 33 ja 25 mg Ag/L. Ka peale 24 tunni kokkupuudet olid kõige toksilisemad nAgCS-3 (nii LMW kui ka HMW kitosaaniga sünteestitud). Võrreldes LMW ja HMW tulemusi, on näha, et peale 2-tunnist kokkupuudet olid 10 nm nAg-LMW-CS vähemalt 2 korda toksilisemad kui 50 nm nanokomposiidid (Tabel 4).

Võrdluse jaoks määrati ka AgNO₃ ning LMW ja HMW kitosaani MBK kunstlikus haavavedelikus. LMW ja HMW kitosaani 2 ja 24-tunni MBK oli >400 mg/L ja AgNO₃ MBK oli peale 2 ja 24 tunnist kokkupuute aega 9.77 ja 2.08 mg Ag/L, mis on vastavalt ligi 1000 ja 200 suurem võrreldes tosilisusega MQ vees.

Võrreldes MQ ja AWF nAgCS tulemusi on näha, et TSC nAgCS MBK suurenes 2 ja 24 tunnise kokkupuute ajaga vähemalt 100 ja 30 korda ning MBK suurenemise ja kitosaani molekulmassi vahel seos puudus. Kuid NaBH₄ LMW nAgCS MBK suurenes 2 tunnise kokkupuute ajaga 1:0.3, 1:1 ja 1:3 Ag:CS massisuhtel vastavalt 400, 29 ja 31 korda, mis erineb HMW nAgCS tulemusest, kus MBK suurenes vastavalt 640, 840 ja 900 korda.

5. Järeldused

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAgCS) trinaatriumtsitraadiga (TSC) ja naatriumboorhüdriidiga (NaBH_4) sünteesi tingimuste optimeerimise katsete tulemused näitasid, et kitosaani ja nAgCS füüsikalised-keemilised omadused sõltuvad keskkonna pH-st ning üldistatult võib järeldada, et madalama pH väärtuse juures sünteesitud nAgCS d_H suurus oli väiksem ning Z-potentsiaal suurem. TSC-ga sünteeside nanokomposiitide katsed näitasid, et Ag:CS massisuhtega 1:0.3 hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAgCS_0.3) sünteesil on vaja reguleerida sünteesikeskkonna pH 4-4.5-ni, kuid suuremate Ag:CS massisuhete korral (1:1 ja 1:3) otsene pH reguleerimise vajadus puudub, kuna lisatav kitosaani 0.1% äädika lahus alandab juba piisavalt sünteesikeskkonna pH-d. (Joonis 9 ja 10, Tabel 3.) Samaselt TSC-ga sünteesidega, võib pH alandamine paranda NaBH_4 -ga sünteesitud nAgCS suspensiooni stabiilsust: 1:3 Ag: NaBH_4 moolsuhtega sünteesitud nAg-HMW-CS_0.3 sadenesid peale ühe nädalast seismist toatemperatuuril, kuna Z-potentsiaal oli nulli lähedane, kuid dialüüsitud nAg-HMW_CS_0.3 olid stabiilsed kuna Z-potentsiaal suurenes üle +30 mV (Joonised 15 B ja 18 B) ja seda ilmselt keskkonna pH muutuse tõttu dialüüsil.

NaBH_4 -ga sünteesides uuriti Ag: NaBH_4 moolsuhte, reagentide lisamise järjekorra ja Ag:CS massisuhte mõju sünteesitud nAgCS omadustele ja stabiilsusele. Tulemused (Joonis 11 ja 12) näitasid, et reagentide aeglane lisamine (~2 minutit) sünteesikeskkonda soodustab stabiilsemate ja väiksema hüdrodünaamilise suuruse ning ühtlasema suurusjaotusega nAgCS teket. Kirjanduses on kasutatud nii NaBH_4 lisamist AgNO_3 ja CS lahusesse [19], [53] kui ka vastupidist lisamist [27], [30]–[32]. Magistritöös saadud tulemused näitasid, et eelistada tuleks NaBH_4 lisamist AgNO_3 ja kitosaani lahusesse, kuna 1:1 ja 1:3 Ag: NaBH_4 moolsuhtel sünteesitud nAgCS-de d_H olid väiksemad ja UV-Vis neeldumisspektrid olid kitsamad ja kõrgemate haripunktidega võrreldes sünteesidega, kui lisati AgNO_3 ja kitosaani lahust NaBH_4 lahusesse. Erineva Ag: NaBH_4 moolsuhtega sünteesi tulemused näitasid, et stabiilsemad nAgCS saadi siis, kui kasutati 1:3 Ag: NaBH_4 moolsuhte, kuna suurem NaBH_4 kontsentratsioon soodustab väiksemate ja ühtlasema suurusjaotusega nAgCS teket. Samas tõstab liias olev NaBH_4 suspensiooni pH-d, mis vähendab nAgCS Z-potentsiaali ja stabiilsust, mistõttu on soovitatav sünteesikeskkonna pH-d vähendada (Joonised 11-16 ja 18 ja Lisa 3). NaBH_4 liia mõju on näha kõige paremini HMW CS nAgCS katsetes, kus Ag:CS massisuhte suurenemisel Z-potentsiaal suurenes ning UV-Vis neeldumisspektrid olid kitsamad ja nende haripunkt kasvas ja d_H vähenes.

Sünteesitud nanokomposiitide mürgisuse tulemused bakterile *E. coli* MG 1655 (Tabel 4.) deioniseeritud vees ja kunstlikus haavavedelikus (AWF) näitasid, et nAgCS antibakteriaalne efektiivsus sõltus kokkupuute ajast, nanokomposiitide hõbeda-

kitosaani massisuhtes, osakeste primaarsuurusest (~10 ja ~50 nm), kitosaani molekulmassist ja testi keskkonnast. Kõige suuremat mõju nAgCS toksilisusele omas testi keskkond - MBK väärtused olid AWF-s kuni 100 korda suuremad (seega siis vähem mürgisemad) ning kokkupuute aeg, mille pikenedes suurenes ka nAgCS toksilisust bakteritele. Elulemuse testi tulemused näitasid, et nAgCS toksilisus suurenes koos nanokomposiitide Ag:CS massisuhte suurenemisega: kõige bakteritsiidsemad olid nAgCS_3 nii MQ vees kui kunstlikus haavavedelikus. Oluline oli ka osakeste primaarnesuurus: NaBH₄ sünteesitud 10 nm primaarsuurusega nAgCS olid toksilisemad võrreldes TSC sünteesitud 50 nm primaarsuurusega nAgCS ja seda just AFW-s.

6. Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö eesmärk oli optimeerida hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAgCS) sünteesi tingimusi. Sünteesil kasutati madala (LMW, 50-190 kDa) ja kõrge molekulmassiga (HMW, 310-375 kDa) kitosaani ja kahte erinevat sünteesi meetodit, kasutades hõbeda ionide (AgNO_3) redutseerijana kas (i) trinaatriumtsitraati (TSC) või (ii) naatriumboorhüdriidi (NaBH_4). Määrati sünteesitud nAgCS toksilisust Gram-negatiivsele bakterile *Escherichia coli* MG1655 võrdlevalt deioniseeritud vees ja kunstlikus haavavedelikus.

TSC-ga sünteesides uuriti sünteesikeskkonna pH (7.0-4.0) ja Ag:CS massisuhte (1:0.3, 1:1 ja 1:3) ning NaBH_4 -ga sünteesides Ag: NaBH_4 moolsuhte (MS) (1:1, 1:2 ja 1:3), reagentide lisamise kiiruse, järjekorra ja Ag:CS massisuhte (1:0.3, 1:1 ja 1:3) mõju nAgCS füüsikalise-keemilistele omadustele ja stabiilsusele. Kokku tehti 42 sünteesi TSC-ga ja 15 NaBH_4 -ga. Määrati sünteesitud nAgCS füüsikalise-keemilised omadused – hüdrodünaamiline suurus, Z-potentsiaal, neeldumist UV ja nähtava valguse vahemikus.

Andmete analüüs näitas et:

- TSC-ga sünteesides madalamal pH-l nAgCS hüdrodünaamiline suurus (d_H) vähenes ja Z-potentsiaal suurenes. Optimaalne pH oli vahemikus 4.0-4.5, eelkõige kui Ag-kitosaani massisuhe oli 1:0.3, kuid Ag:CS massisuhte suurenedes pH muutmine ei omanud enam sellist efekti, kuna kitosaani suuremas hulgas lisamine vähendas ise sünteesikeskkonna pH-d (kitosaan oli 0.1% äädika lahuses).
- NaBH_4 -ga sünteesides saadi kõige stabiilsemad hõbeda-kitosaani nanokomposiidid, lisades NaBH_4 lahust aeglaselt (~2 minutit) AgNO_3 ja CS lahusesse ning Ag: NaBH_4 moolsuhe oli 1:3.
- TSC-ga ja NaBH_4 -ga sünteesides Ag:CS massisuhte suurenedes nanokomposiitide d_H vähenes ja Z-potentsiaal suurenes. Samas ei olnud suurt erinevust LMW ja HMW kitosaaniga sünteesitud nanokomposiitide füüsikalise-keemilistes omadustes.
- Elulemuse testi tulemused bakteriga *E. coli* MG1655 näitasid, et NaBH_4 -ga sünteesitud nAgCS (primaarsuurus ~10 nm) olid toksilisemad kui TSC-ga sünteesitud nAgCS (~50 nm) ning LMW nAgCS olid mürgisemad kui HMW nAgCS.
- Elulemuse testi keskkond mõjutas suuresti nAgCS antibakteriaalsust: nAgCS olid 10–100 korda mürgisemad MQ vees võrreldes kunstliku haavavedelikuga.

- Nii MQ vees kui ka AWF-s suurenes nAgCS toksilisus Ag:CS massisuhte suurenedes – kõige mürgisemad olid nAgCS_3.

Käesoleva magistritöö tulemused näitasid, et NaBH₄-ga (~10 nm) olid mürgisemad kui TSC-ga sünteesitud (~50 nm) hõbeda-kitosaani nanokomposiidid bakterile *E. coli* MG1655. Lisaks suurenes nAgCS toksilisus hõbeda-kitosaani massisuhte suurenedes ning kui sünteesides kasutati madalama molekulmassiga kitosaani.

Käesoleva magistritöö põhjal oleks soovitatav hõbeda-kitosaani nanokomposiitide sünteesides kasutada AgNO₃ redutseerijana NaBH₄, väikese molekulmassiga kitosaani ja suuremat hõbeda-kitosaani massisuhet, et saada võimalikult väikse d_H , suure pinnalaenguga (Z-potentsiaaliga) stabiilsed ja bakteritsiidsed hõbeda-kitosaani nanokomposiidid.

7. Summary

The aim of this master's thesis was to optimize the conditions for silver-chitosan nanocomposite (nAgCS) synthesis. This involved using two molecular weight variants of chitosan: (i) low (LMW, 50-190 kDa) and (ii) high molecular weight (HMW, 310-375 kDa) and employing two distinct synthesis methods: (i) trisodium citrate (TSC) and (ii) sodium borohydride (NaBH_4). The toxicity evaluation of the synthesized nAgCS against the gram-negative bacteria *Escherichia coli* MG1655 was conducted in deionized water and artificial wound fluid.

In the TSC synthesis, the experiments focused on the synthesis medium's pH (ranging from 7.0 to 4.0) and the mass ratio of Ag:CS (at 1:0.3, 1:1, and 1:3), while the NaBH_4 synthesis focused on the molar ratio of Ag: NaBH_4 (at 1:1, 1:2, and 1:3), along with the effect Ag:CS mass ratio (1:0.3, 1:1, and 1:3), the addition order reagents and speed of the reactant addition to the physico-chemical properties and stability of nAgCS. A total of 42 syntheses were conducted using TSC and 15 syntheses with NaBH_4 . Subsequently, the physicochemical properties of the synthesized nAgCS were determined: hydrodynamic size, Z-potential, and absorption in the UV and visible light spectrum.

The analysis of the data revealed several key findings:

- When synthesizing with TSC, the properties of nAgCS improve as the pH decreases: d_H decreases, and Z-potential increases, but the UV-Vis spectrum was not directly affected by pH. The optimal pH was between 4.0-4.5 for Ag:CS 1:0.3 mass ratio, but the need to change the pH decreased as the mass ratio of Ag:CS increased since chitosan was in a 0.1% vinegar solution.
- When synthesizing with NaBH_4 , the best results of nAgCS were obtained by adding NaBH_4 slowly ~ 2 minutes to a solution of AgNO_3 and CS. As the molar ratio of Ag: NaBH_4 increased, the properties of nAgCS improved.
- When synthesizing with TSC and NaBH_4 , as the mass ratio of Ag:CS increased, the properties of nAgCS improved: d_H decreased, Z-potential increased, and UV-Vis graphs became narrower and peaks became higher. However, there was no significant difference in the properties of nAgCS synthesized by LMW and HMW CS.
- In spot tests with *E. coli* MG1655 the nAgCS synthesized by NaBH_4 (primary size ~ 10 nm) were more toxic than nAgCS synthesized by TSC (primary size ~ 50 nm), and LMW nAgCS was more toxic than HMW nAgCS.

- The Spot test environment significantly affects nAgCS toxicity, where differences in nAgCS toxicity in MQ and AWF environments were ten- to one-hundred-fold, but the differences decreased with increasing exposure time.
- In both MQ water and AWF nAgCS toxicity increased with increasing Ag:CS mass ratio – the most toxic were the nAgCS_3.

The results of the present work showed that nAgCS synthesized with NaBH₄ (primary size ~10 nm) were more toxic to *E. coli* MG1655 than nAgCS synthesized with TSC (~50 nm). In addition, increasing the Ag:CS mass ratio and using lower molecular weight chitosan resulted in higher bactericidal properties.

Based on the present master's thesis it would be recommended to use sodium borohydride (NaBH₄) as the reducing agent for silver nitrate (AgNO₃) silver and low molecular weight chitosan (LMW CS) as the stabilizing agent in nAgCs synthesis. Also, it is recommended to use higher silver-chitosan mass ratio and Ag:NaBH₄ molar ratio during synthesis yields nAgCS with minimized d_H , enhanced stability, and increased toxicity to bacteria *E. coli*.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- [1] M. A. Polinarski *et al.*, "New Perspectives of Using Chitosan, Silver, and Chitosan–Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacteria," *Part. Part. Syst. Charact.*, vol. 38, no. 4, Apr. 2021, doi: 10.1002/PPSC.202100009.
- [2] "nanoparticle | Definition, Size Range, & Applications | Britannica." <https://www.britannica.com/science/nanoparticle> (accessed Apr. 11, 2022).
- [3] I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities," *Arab. J. Chem.*, vol. 12, no. 7, pp. 908–931, Nov. 2019, doi: 10.1016/J.ARABJC.2017.05.011.
- [4] Q.-G. Jiang *et al.*, "Strong and Tough Glass with Self-Dispersed Nanoparticles via Solidification," *Adv. Mater.*, vol. 31, no. 33, p. 1901803, Aug. 2019, doi: 10.1002/ADMA.201901803.
- [5] B. J. Landi, M. J. Ganter, C. D. Cress, R. A. DiLeo, and R. P. Raffaele, "Carbon nanotubes for lithium ion batteries," *Energy Environ. Sci.*, vol. 2, no. 6, pp. 638–654, Jun. 2009, doi: 10.1039/B904116H.
- [6] T. Singh, S. Shukla, P. Kumar, V. Wahla, and V. K. Bajpai, "Application of nanotechnology in food science: Perception and overview," *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. AUG, p. 1501, Aug. 2017, doi: 10.3389/FMICB.2017.01501/BIBTEX.
- [7] Z. Aguilar, *Nanomaterials for Medical Applications*. 2012.
- [8] G. A. Martínez-Castañ and A. N. Niño-Martínez AE F Martínez-Gutierrez AE J R Martínez-Mendoza AE Facundo Ruiz, "Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes," doi: 10.1007/s11051-008-9428-6.
- [9] W.-R. Li, X.-B. Xie, Q.-S. Shi, H.-Y. Zeng, Y.-S. OU-Yang, and Y.-B. Chen, "Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*," *Appl. Microb. CELL Physiol.*, doi: 10.1007/s00253-009-2159-5.
- [10] H. Renner *et al.*, *Silver, Silver Compounds, and Silver Alloys*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
- [11] S. Iravani, H. Korbekandi, S. V Mirmohammadi, and B. Zolfaghari, "Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods," *Res. Pharm. Sci.*, vol. 9, no. 6, pp. 385–406, 2014.
- [12] R. Güzel and G. Erdal, "Synthesis of Silver Nanoparticles," *Silver Nanoparticles - Fabr. Charact. Appl.*, Jul. 2018, doi: 10.5772/INTECHOPEN.75363.
- [13] P. Santhi Yerragopu *et al.*, "Chemical Synthesis of Silver Nanoparticles Using Tri-sodium Citrate, Stability Study and Their Characterization," *Artic. Int. Res. J. Pure Appl. Chem.*, 2020, doi: 10.9734/IRJPAC/2020/v21i330159.
- [14] I. Prosycevas, A. Šileikait, J. Puišo, I. Prosyčėvas, and S. Tamulevičius, "Investigation of Silver Nanoparticles Formation Kinetics during Reduction of Silver Nitrate with Sodium Citrate," *MEDŽIAGOTYRA*, vol. 15, no. 1, 2009.

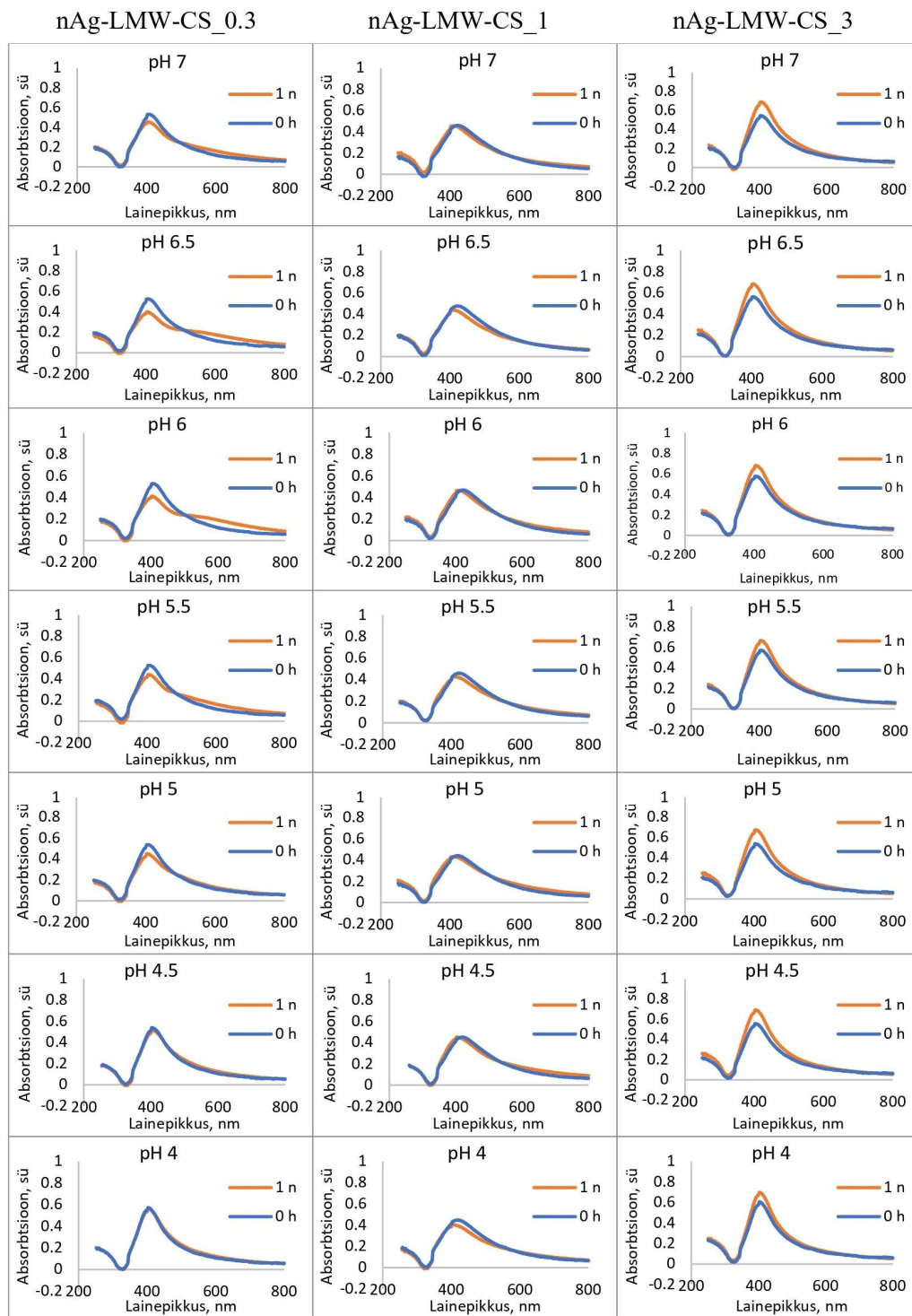
- [15] M. A. Polinarski *et al.*, "2100009 (1 of 18) New Perspectives of Using Chitosan, Silver, and Chitosan-Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacteria," 2021, doi: 10.1002/ppsc.202100009.
- [16] S. Das, K. Bandyopadhyay, and M. M. Ghosh, "Effect of stabilizer concentration on the size of silver nanoparticles synthesized through chemical route," *Inorg. Chem. Commun.*, vol. 123, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.INOCHE.2020.108319.
- [17] X. C. Jiang, W. M. Chen, C. Y. Chen, S. X. Xiong, and A. B. Yu, "Role of Temperature in the Growth of Silver Nanoparticles Through a Synergetic Reduction Approach," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 6, no. 1, p. 32, 2011, doi: 10.1007/S11671-010-9780-1.
- [18] Z. GUOQIANG and W. WENYING, "Synthesis of Silver Nanoparticles and their Antiproliferation against Human Lung Cancer Cells In vitro."
- [19] A. Sobczak-Kupiec, D. Malina, Z. Wzorek, and M. Zimowska, "Influence of silver nitrate concentration on the properties of silver nanoparticles," *Micro Nano Lett.*, vol. 6, no. 8, pp. 656–660, Aug. 2011, doi: 10.1049/MNL.2011.0152.
- [20] Z. S. Pillai and P. V. Kamat, "What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method?," *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, no. 3, pp. 945–951, Jan. 2003, doi: 10.1021/JP037018R.
- [21] P. V Kamat, M. Flumiani, and G. V Hartland, "Picosecond Dynamics of Silver Nanoclusters. Photoejection of Electrons and Fragmentation," 1998.
- [22] P. Sanpui, A. Murugadoss, P. V. D. Prasad, S. S. Ghosh, and A. Chattopadhyay, "The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 124, no. 2, pp. 142–146, May 2008, doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2008.03.004.
- [23] R. Thakur, G. Jambheshwar, A. Chaudhury, P. Kaur, and A. Choudhary, "Synthesis of Chitosan-silver nanocomposites and their antibacterial activity. The National Centre of Excellence in Nanotechnology for Agriculture and Environment and National Facility for Toxicology, Life Cycle and Regulations View project Antimicrobial nanomaterials View project Synthesis of Chitosan-Silver Nanocomposites and their Antibacterial Activity," *Artic. Int. J. Sci. Eng. Res.*, vol. 4, no. 4, 2013.
- [24] A. Šileikaitė, I. Prosyčėvas, J. Puišo, A. Juraitis, and A. Guobienė, "Analysis of Silver Nanoparticles Produced by Chemical Reduction of Silver Salt Solution," *MEDŽIAGOTYRA*, vol. 12, no. 4, 2006.
- [25] N. G. Bastús, F. Merkoçi, J. Piella, and V. Puntes, "Synthesis of highly monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic control and catalytic properties," *Chem. Mater.*, vol. 26, no. 9, pp. 2836–2846, May 2014, doi: 10.1021/CM500316K.

- [26] G. Suriati, M. Mariatti, and A. Azizan, "SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES BY CHEMICAL REDUCTION METHOD: EFFECT OF REDUCING AGENT AND SURFACTANT CONCENTRATION," *Int. J. Automot. Mech. Eng.*, vol. ISSN, pp. 1920–1927, doi: 10.15282/ijame.10.2014.9.0160.
- [27] K. C. Song, S. M. Lee, T. S. Park, and B. S. Lee, "Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method," 2009.
- [28] K. Mavani, "Synthesis of Silver Nanoparticles by using Sodium Borohydride as a Reducing Agent Related papers."
- [29] R. Desai, V. Mankad, S. K. Gupta, and P. K. Jha, "Size distribution of silver nanoparticles: UV-visible spectroscopic assessment," *Nanosci. Nanotechnol. Lett.*, vol. 4, no. 1, pp. 30–34, 2012, doi: 10.1166/NNL.2012.1278.
- [30] S. Solomon, M. Bahadori, A. V. Jeyarajasingam, S. A. Rutkowsky, C. Boritz, and L. Mulfinger, "Synthesis and Study of Silver Nanoparticles," 2007.
- [31] K. Mavani and M. Shah, "Synthesis of Silver Nanoparticles by using Sodium Borohydride as a Reducing Agent Related papers," vol. 2, no. 3, pp. 1–5, 2013.
- [32] D. L. Van Hying and C. F. Zukoski, "Formation Mechanisms and Aggregation Behavior of Borohydride Reduced Silver Particles," 1998, doi: 10.1021/la980325h.
- [33] S. Tang and J. Zheng, "Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects," 2018, doi: 10.1002/adhm.201701503.
- [34] B. Le Ouay and F. Stellacci, "Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight," *Nano Today*, vol. 10, no. 3, pp. 339–354, Jul. 2015, doi: 10.1016/J.NANTOD.2015.04.002.
- [35] S. Chernousova and M. Epple, "Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 52, no. 6, pp. 1636–1653, Feb. 2013, doi: 10.1002/ANIE.201205923.
- [36] M. A. Matica, F. L. Aachmann, A. Tøndervik, H. Sletta, and V. Ostafe, "Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 23, Dec. 2019, doi: 10.3390/IJMS20235889.
- [37] "What is the Difference Between Chitin and Chitosan | Compare the Difference Between Similar Terms." <https://www.differencebetween.com/what-is-the-difference-between-chitin-and-chitosan/> (accessed Nov. 28, 2023).
- [38] M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 31, no. 7, pp. 603–632, Jul. 2006, doi: 10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2006.06.001.
- [39] I. Aranaz *et al.*, "polymers Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications," 2021, doi: 10.3390/polym13193256.

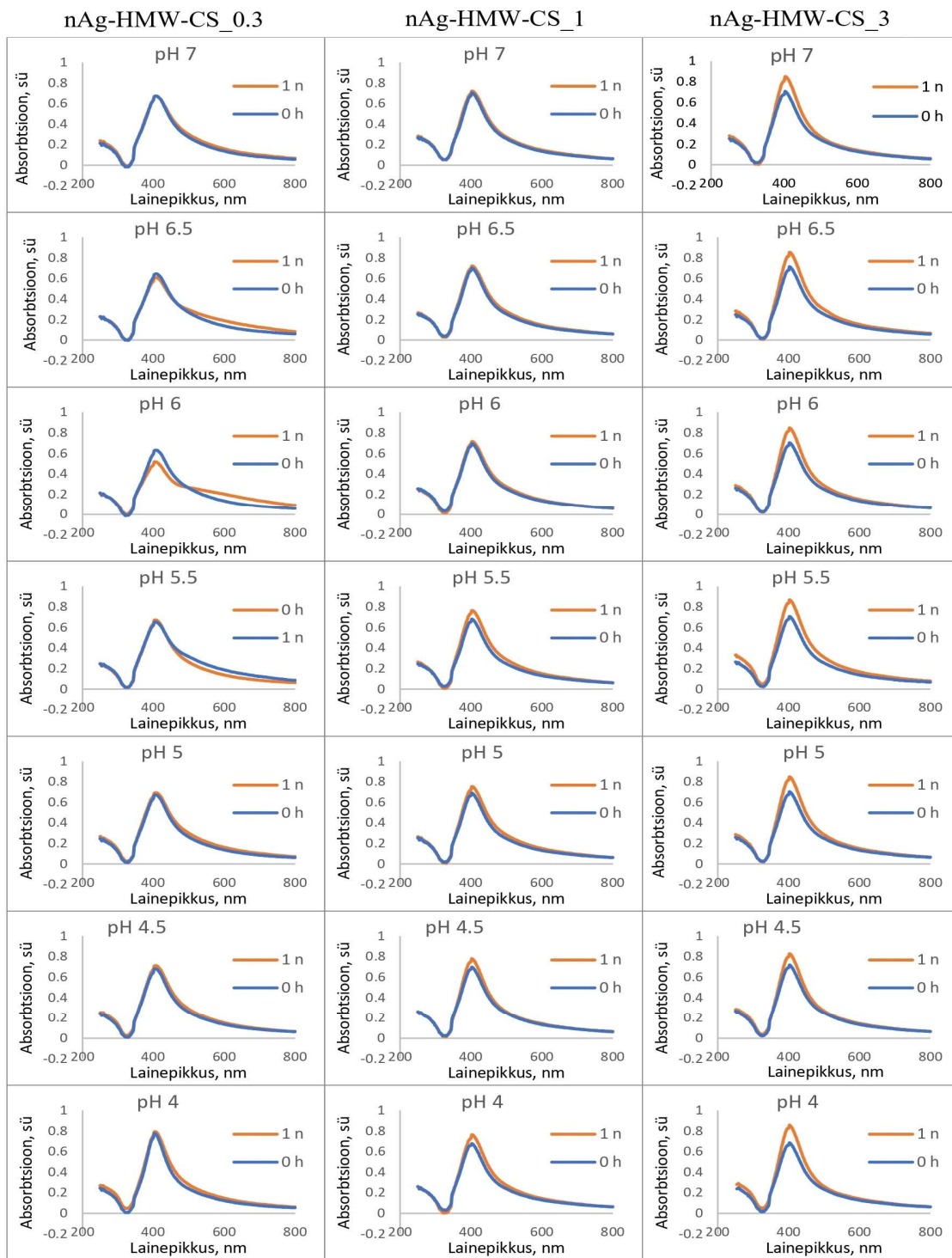
- [40] Q. Z. Wang *et al.*, "Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation," *Carbohydr. Polym.*, vol. 65, no. 2, pp. 194–201, Jul. 2006, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2006.01.001.
- [41] D. Wei, W. Sun, W. Qian, Y. Ye, and X. Ma, "The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity," *Carbohydr. Res.*, vol. 344, no. 17, pp. 2375–2382, Nov. 2009, doi: 10.1016/J.CARRES.2009.09.001.
- [42] S. Kumar-Krishnan *et al.*, "Chitosan/silver nanocomposites: Synergistic antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions," *Eur. Polym. J.*, vol. 67, pp. 242–251, Jun. 2015, doi: 10.1016/J.EURPOLYMJ.2015.03.066.
- [43] S. Govindan, E. A. K. Nivethaa, R. Saravanan, V. Narayanan, and A. Stephen, "Synthesis and characterization of Chitosan–Silver nanocomposite," *Appl. Nanosci.*, vol. 2, no. 3, pp. 299–303, Sep. 2012, doi: 10.1007/S13204-012-0109-5/FIGURES/8.
- [44] A. Liang, Q. Liu, G. Wen, and Z. Jiang, "The surface-plasmon-resonance effect of nanogold/silver and its analytical applications," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 37, pp. 32–47, Jul. 2012, doi: 10.1016/J.TRAC.2012.03.015.
- [45] "Pathogen Safety Data Sheets: Infectious Substances – Escherichia coli, enteropathogenic – Canada.ca." <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/escherichia-coli-enteropathogenic.html> (accessed Apr. 18, 2022).
- [46] "Strain Information of E. coli K-12 MG1655." <https://www.genome.wisc.edu/resources/strains.htm> (accessed Apr. 18, 2022).
- [47] S. Suppi *et al.*, "A novel method for comparison of biocidal properties of nanomaterials to bacteria, yeasts and algae," *J. Hazard. Mater.*, vol. 286, pp. 75–84, Apr. 2015, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2014.12.027.
- [48] S. Honary, K. Ghajar, P. Khazaeli, and P. Shalchian, "Preparation, characterization and antibacterial properties of silver-chitosan nanocomposites using different molecular weight grades of chitosan," *Trop. J. Pharm. Res.*, vol. 10, no. 1, pp. 69–74, 2011, doi: 10.4314/TJPR.V10I1.66543.
- [49] A. K. Ostermeyer, C. Kostigen Mumuper, L. Semprini, and T. Radniecki, "Influence of bovine serum albumin and alginate on silver nanoparticle dissolution and toxicity to *Nitrosomonas europaea*," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 47, no. 24, pp. 14403–14410, Dec. 2013, doi: 10.1021/ES4033106.
- [50] H. L. Liu, S. A. Dai, K. Y. Fu, and S. hui Hsu, "Antibacterial properties of silver nanoparticles in three different sizes and their nanocomposites with a new waterborne polyurethane," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 5, no. 1, p. 1017, 2010, doi: 10.2147/IJN.S14572.

- [51] A. L. Kubo *et al.*, "Antimicrobial potency of differently coated 10 and 50 nm silver nanoparticles against clinically relevant bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 170, pp. 401–410, Oct. 2018, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2018.06.027.
- [52] G. Li, J. Huang, T. Chen, X. Wang, H. Zhang, and Q. Chen, "Insight into the interaction between chitosan and bovine serum albumin," *Carbohydr. Polym.*, vol. 176, pp. 75–82, Nov. 2017, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2017.08.068.
- [53] L. A. P. Gontijo, E. Raphael, D. P. S. Ferrari, J. L. Ferrari, J. P. Lyon, and M. A. Schiavon, "pH effect on the synthesis of different size silver nanoparticles evaluated by DLS and their size-dependent antimicrobial activity," *Matéria (Rio Janeiro)*, vol. 25, no. 4, pp. 1–10, Dec. 2020, doi: 10.1590/S1517-707620200004.1145.

Lisa 1. Trinaatriumtsitraadi ja madala molekulmassiga kitosaaniga (LMW) sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAgCS) UV-Vis spektrid peale sünteesi (0 h) ja ühe nädala (1 n) seismist toatemperatuuril. Sünteesikeskkonna pH oli 7.0–4.0. Nanokomposiidid olid erineva hõbeda-kitosaani massisuhtega: 1:0.3 (nAgCS_0.3), 1:1 (nAgCS_1) ja 1:3 (nAgCS_3).



Lisa 2. Trinaatriumtsitraadi ja kõrge molekulmassiga kitosaaniga (HMW) sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAgCS) UV-Vis spektrid peale sünteesi (0 h) ja ühe nädala (1 n) seismist toatemperatuuril. Sünteesikeskkonna pH oli 7.0–4.0. Nanokomposiidid olid erineva hõbeda-kitosaani massisuhtega: 1:0.3 (nAgCS_0.3), 1:1 (nAgCS_1) ja 1:3 (nAgCS_3).



Lisa 3. Trinaatriumtsitraadiga (TSC) ja naatriumboorhüdriidiga (NaBH_4), madala (LMW) ja kõrge molekulmassiga (HMW) kitosaaniga ning erinevatel hõbeda-kitosaani massisuhtel (Ag:CS) sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAgCS, 10 mg Ag/L) UV-Vis spektrid deioniseeritud vees (MQ) ja kunstlikus haavavedelikus (AWF).

