

## **HÕBEDA JA VASE NANOOSAKESTE KOOSMÕJU BAKTERITELE**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Angelina Vinogradova 185615LAAB

Juhendajad: Grigory Vasiliev, Keemilise ja bioloogilise füüsika instituut, TalTech doktorant

Dr. Olesja Bondarenko, Keemilise ja bioloogilise füüsika instituut, vanemteadur

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia

## **Autorideklaratsioon**

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Angelina Vinogradova  
06.06.2022, allkirjastatud digitaalselt

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.  
Juhendajad: Grigory Vasiliev, Olesja Bondarenko  
06.06.2022, allkirjastatud digitaalselt

Töö on lubatud kaitsmisele.  
Kaitsmiskomisjoni esimees: Vello Tõugu  
allkiri ja kuupäev

# Sisukord

<b>Autorideklaratsioon.....</b>	<b>2</b>
<b>Annotatsioon.....</b>	<b>5</b>
<b>Lühendite loetelu.....</b>	<b>6</b>
<b>Sissejuhatus.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Kirjanduse ülevaade .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Nanoosakeste definitsioon.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Nanoosakeste päritolu .....</b>	<b>9</b>
1.2.1. Looduslikud nanoosakesed .....	9
1.2.2. Inimtekkilised ja sünteetilised nanoosakesed.....	9
<b>1.3. Hõbeda nanoosakesed .....</b>	<b>9</b>
1.3.1. Hõbeda nanoosakeste antibakteriaalne toime .....	10
<b>1.4. Vase nanoosakesed.....</b>	<b>11</b>
1.4.1. Vase nanoosakeste antibakteriaalne toime .....	11
<b>1.5. Kolloidhõbe .....</b>	<b>12</b>
1.5.1. Kolloidhõbeda iseloomustus .....	12
1.5.2. Kolloidhõbeda kasutamine ja selle toksilisus .....	12
<b>1.6. Nanoosakeste toksilisust mõjutavad füüsikalised-keemilised tegurid.....</b>	<b>12</b>
1.6.1. Hõbeda ja vase nanoosakeste pinnakatete mõju toksilisusele.....	13
1.6.2. Zeta-potentsiaal ja selle definitsioon .....	14
1.6.3. Nanosuspensioonide sonikeerimine .....	15
<b>1.7. Nanoosakeste toksilisuse testid bakteritega .....</b>	<b>15</b>
1.7.1. Minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon.....	16
1.7.2. Spot-test .....	16
<b>Töö eesmärk.....</b>	<b>17</b>
<b>2. Materjalid ja meetodid .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Kasutatud nanoosakesed, keemikalid ja söötmed .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2. Nanoosakeste iseloomustus .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3. Nanosuspensioonide valmistamine .....</b>	<b>19</b>
<b>2.4. Kasutatud bakterid ja nende kirjeldus .....</b>	<b>19</b>
2.4.1. Bakterite ettekasvamine .....	20
<b>2.5. Spot-testi läbiviimine .....</b>	<b>20</b>
<b>2.6. Andmetöötlus.....</b>	<b>21</b>

<b>3. Tulemused ja arutelu .....</b>	<b>22</b>
3.1. Hõbeda ja vase nanoosakeste antibakteriaalne koosmõju .....	22
3.2. Antibakteriaalse koosmõju sõltuvus Ag nanoosakestest.....	22
3.3. Hõbeda ja vase nanoosakeste antibakteriaalne koosmõju erinevatele bakteritele ....	24
<b>Kokkuvõte .....</b>	<b>28</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>29</b>
<b>Tänuavaldused .....</b>	<b>30</b>
<b>Kasutatud kirjandus.....</b>	<b>31</b>

## Annotatsioon

Bakteriaalsed infektsioonid tekitavad palju probleeme tervishoiu valdkonnas. Üleliigne antibiootikumide kasutamine põhjustas multiresistentsete bakteritüvede tekkimist. Seoses sellega teadusringkondades hakkas kasvama huvi nanoosakeste vastu, mis oma ainulaadsete füüsikaliste ja keemiliste omaduste tõttu võivad saada suurepäraseks alternatiiviks antibiootikumidele.

Mõned nanoosakesed, sealhulgas hõbe ja vask, on ammu tuntud oma antibakteriaalsete omaduste poolest ja neid aktiivselt kasutatakse paljudes tööstus- ja majapidamistoodetes. Hiljutised uuringud, sh. Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudi teadlaste uuringud, on näidanud, et hõbeda ja mõnede siirdemetallisoolade vahel on olemas sünergistlik antibakteriaalne toime. See sünergistlik toime on äärmiselt oluline uute senisest efektiivsemate nanoosakestel põhinevate lahenduste väljatöötamiseks, Samas teadustöid, mis uuriksid nanoosakeste bakterivastast sünergiat (koosmõju) on väga vähe.

Käesolevas töös uuriti erinevate katmata ja kaetud CuO ja Ag nanoosakeste vahel tekkivat koosmõju. Kontrolliks kasutati vasesoola ( $\text{CuSO}_4$ ) ja hõbenitraadi ( $\text{AgNO}_3$ ). Nanoosakeste toksilisuse mõõtmiseks valiti 5 erinevatest klassidest bakterit, mis on tuntud oma kõrge patogeensusega. Peamiseks eesmärgiks oli hõbeda ja vase nanoosakeste vahel tekkiva koosmõju iseloomustamine ja kvantitatiivne hindamine.

Töö käigus selgitati välja, et võrreldes üksikute nanoosakestega, vase ja hõbeda nanoosakeste kombinatsioonidel on oluliselt kõrgem antibakteriaalne toime kõige testitud bakteritüvede suhtes. Nanoosakeste segude antibakteriaalne toime oli kuni 6 korda kõrgem võrreldes üksikute komponentide antibakteriaalse toime summaga. Eriti kõrget sünergiat hõbeda nanoosakestega määrati positiivselt laetud vase nanoosakeste ja vasesoolaga ( $\text{CuSO}_4$ ). Kõige suuremat nanoosakeste toksilisust määrati grampositiivse *E. faecalis* bakteri puhul ja kõige madalamat gramnegatiivse *P. aeruginosa* bakteri puhul.

Antud töö tulemused kinnitavad edasiste uuringute tähtsust nanoosakeste ja nende segude kasutamise kohta antibakteriaalsete ainetena.

## Lühendite loetelu

Ag - hõbe  
Ag-col - kolloidhõbe  
AgNP - hõbeda nanoosakesed  
AgO - hõbeoksiid  
ATP - adenosiintrifosfaat  
CCM - cell culture meedium  
-COOH - karboksüül rühm  
CuO - vaskoksiid  
CuSO<sub>4</sub> - vasksulfaat  
DI - destilleeritud vesi  
DNA - desoksüribonukleiinhape  
D<sub>h</sub> - hüdrodünaamiline suurus  
E. coli - Escherichia coli  
ESBL - Extended-spectrum beta-lactamase  
E. faecalis - Enterococcus faecalis  
FBC - fraktsionaalne bakteritsiidne kontsentratsioon  
g - gramm  
h - tund  
K(AbS) - antibakteriaalse koosmõju koefitsient  
LB - Luria-Bertani sööde  
MBC - minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon  
mg/l - milligrammi liitris  
ml - mililiter  
mV - millivolt  
NaCl - naatriumkloriid  
-NH<sub>2</sub> - amiin rühm  
nm - nanomeeter  
P - p-väärtus  
P. aeruginosa - Pseudomonas aeruginosa  
PEG - polüetüülglikool  
PEI - polüetüülenimiin  
PVP - polüvinüülpürrolidoon  
ROS - hapnikku sisaldavad reaktiivsed osakesed  
RPMI - Roswell Park Memorial Institute meedium  
S. aureus - Staphylococcus aureus  
SD - standardhälve  
TiO<sub>2</sub> - titaandioksiid  
μl - mikroliter

## Sissejuhatus

Bakteriaalsed infektsioonid on krooniliste infektsioonide ja suremuste üks peamisi põhjuseid (Cannon, Matrin and Carrion 2020). Antibiootikumid oma kulutasuvuse ja efektiivsuse tõttu olid pikaaegselt bakteriaalsete infektsioonide eelistatuim ravimeetod (Lee, Ko and Hsueh 2019). Viimasel ajal aga ilmub aina rohkem uuringuid, mis kinnitavad, et antibiootikumide laialdane kasutamine on viinud multiresistentsete bakteritüvede tekkeni. Seoses sellega hakkas teadusringkondades kasvama huvi nanoosakeste vastu, mis oma ainulaadsete füüsikaliste ja keemiliste omaduste tõttu võivad saada suurepäraseks alternatiiviks antibiootikumidele, eeskätt paikse bakteriinfektsiooni raviks (Theuretzbacher, et al. 2020). Nanoosakeste kombinatsioonide kasutus võiks olla eriti kasulik, kuna nanoosakeste kombinatsioonid võivad aidata vähendada nanoosakeste annust ja vähendada resistentsuse teket bakteritel.

Nanoosakesed on lai materjalide klass, mis sisaldab aineid osakeste kujul, mille üks mõõdust on vahemikus 1-100 nm. Nanomeetrisuurustel osakestel on ainulaadne omadus, mis eristab neid sarnastest materjalidest: nende väike suurus tagab suure pinna ja mahu suhte, mis toob kaasa olulise biokeemilise ja katalüütilise aktiivsust võrreldes sama koostise suuremate osakestega (Khan, Khalid and Idrees 2017).

Metallnanoosakeste hulgas pööratakse eritähelepanu hõbeda nanoosakestele, eriti meditsiini kontekstis (AgNP-d) (Choi, et al. 2008). Ajalooliselt on hõbe olnud peamiseks antibakteriaalseks aineks, mida kasutati antibakteriaalsetel haavahooldustoodetes, nagu meditsiinilised plaastrid ja pihustid (Silva, et al. 2017). Viimased teaduspublikatsioonid on aga näidanud, et Ag ja eriti Ag-põhised nanoosakesed võivad olla kahjulikud keskkonnale ja inimeste rakkudele (Greulich, et al. 2012). Seoses sellega hakkasid teadlased rohkem uurima ka teisi antibakteriaalseid metalle. Näiteks vask, millel on paljude teiste metallidega võrreldes parimad antibakteriaalsed omadused ning mis on ka keskkonnasõbralikum (Kubo 2020).

Vask on kergesti kättesaadav metall ja üks olulisemaid mikroelemente enamikes elusorganismides. Nanomõõtmelistel vaseosakestel on tööstuses palju rakendusi, sealhulgas nende kasutamine gaasiandurites, kõrge temperatuuriga üldjuhtides, päikesepatareides ja puidukaitsevahendites (Dupont, Grassb and Rensing 2011). Vase ioonid on näidanud antibakteriaalset toimet paljude mikroorganismide vastu, nagu *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteric*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* ja *Listeria monocytogenes* (Garza-Cervantes, et al. 2017) (Bondarenko, et al. 2012).

Hiljutised uuringud on näidanud, et hõbeda ja vase soolade vahel on olemas sünergistlik antibakteriaalne toime (Bankier, et al. 2019). Seega otsustasime kindlaks teha, kas hõbeda ja vase nanoosakestel on ka olemas sünergistlik antibakteriaalne toime ja kui tugev see on.

Käesoleva bakalaureusetöö peamiseks eesmärgiks oli erinevate Ag nanoosakeste ja soola ning CuO funktsionaalrühmadega kaetud nanoosakeste vahel tekkivat sünergistlikku antibakteriaalset toimet uurimine.

Selleks viidi läbi toksilisuste katseid katmata CuO ja kaetud karboksüül (COOH), amiin (NH<sub>2</sub>) rühmade; katmata Ag ja Ag<sub>2</sub>O nanoosakestega. Samuti kasutati Ag-col-i kaseiiniga kaetud nanoosakesed ning kontrolliks vasesoola (CuSO<sub>4</sub>) ja hõbenitraadi (AgNO<sub>3</sub>). Nanoosakeste toksilisuse kontrollimiseks valiti 5 erinevat bakterit: *Escherichia coli* K-12, *Escherichia coli* ESBL, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ja *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Peamiseks meetodiks valiti spot-test, mida kasutati bakterite minimaalse bakteritsiidse kontsentratsiooni määramiseks. Püstitati hüpoteesi, et erinevate hõbeda ja vase nanoosakeste vahel tekib koosmõju ja selle tõttu nende antibakteriaalne toime kasvab.

Töös näidati, et hõbeda ja vase nanoosakeste toksiline mõju segus bakteritele on mitmekordselt kõrgem võrreldes üksikute nanoosakestega. Kõige paremat koosmõju näitasid Ag-col koos positiivselt laetud CuO-NH<sub>2</sub> nanoosakeste ja CuSO<sub>4</sub> vasesoolaga. Negatiivselt laetud CuO-COOH nanoosakesed näitasid kõige madalamat koosmõju hõbeda nanoosakestega.



# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Nanoosakeste definitsioon

ISO/TS 27687 standard defineerib nanoobjekti nagu osakest, mille vähemalt üks välismõõdetest on vahemikus 1 kuni 100 nm (ISO/TS 27687 2008). Nanoosakesi võib iseloomustada kuju, suuruse, pinnakate ja laengu, keemilise koostise, eripinna, lahustuvuse ja päritolu kaudu. Nanoosakesed jagunevad sümmeetrilisteks (kerad, kuubikud) ja asümmeetrilisteks (nanotorud) kuju poolest ja võivad olla loodusliku, inimtekkelise või sünteetilise päritolust (Mourdikoudis, Pallares and Thanh 2018). Nanoosakeste puhul on täheldatud unikaalseid omadusi, mis on kõigepealt tingitud nende suurest pinna ja mahu suhtest nimetatud eripinnast. Vastavalt nanoosakeste suurusle muutuvad paljud omadused nagu sulamis- ja külmumistemperatuur, elektrijuhtivus, bioloogiline aktiivsus, lahustuvus ja magnetiline läbilaskvus (Niemeyer 2001).

## 1.2. Nanoosakeste päritolu

### 1.2.1. Looduslikud nanoosakesed

Looduslikud nanoosakesed leiduvad kõikides maa sfäärides (hüdrosfääris, atmosfääris, litosfääris, biosfääris) ja tekivad paljude looduslike protsesside käigus, näiteks erosioonil, metsapõlengutes, biomassi lagunemisel, vulkaanipursetel ning taimede ja loomade elutegevuse käigus (Buzea, Pacheco and Robbie 2007).

### 1.2.2. Inimtekkelised ja sünteetilised nanoosakesed

Inimtekkelistel nanoosakestel ei ole tavaliselt ettemääratud suurust ega keemilist koostist. Need tekivad erinevate materjalide ja diiselkütuste põletamisel, söe kaevandamisel, keevitamisel, maakide kaevandamisel ja sulatamisel (Buzea, Pacheco and Robbie 2007) (Vance, et al. 2015).

Sünteetilised nanoosakesed on tavaliselt spetsiaalselt sünteesitud ja nende omadused ning parameetrid on ette määratud. Enamasti neid kasutatakse tööstuslikkudel eesmärkidel, näiteks kosmeetikatoodetes, elektroonikaseadmetes, meditsiinitarvikutes, toiduainetööstuses. Sünteetiliste nanoosakeste hulka kuuluvad, näiteks fullerenid, kvantpunktid, kulla ja hõbeda nanoosakesed (Vance, et al. 2015). Antud töös keskenduti sünteetiliste nanoosakeste uurimisele.

## 1.3. Hõbeda nanoosakesed

Hõbeda nanoosakesed (AgNP) on ühed kõige enim uuritud ja kasutatud nanoosakesed (Calderón-Jiménez, et al. 2017). Oma suure pindala ja ruumala suhte ning lahustumisel vabanevate Ag ionide tõttu on neil isegi madalatel kontsentratsioonidel väga hea antibakteriaalne toime.

Praegu kasutatakse AgNP-sid laialt enam kui 300 tarbekaupades: kosmeetikatarvetes, pesuvahendites, elektroonikas, veetöötlussüsteemides, toidulisandites ja meditsiiniseadmetes. Hiljutise hinnangu järgi on hõbedate nanoosakeste aastane toodang rohkem kui 500 tooni (Yaqoob, Umar and Ibrahim 2020) (Choi, et al. 2008).

### 1.3.1. Hõbedate nanoosakeste antibakteriaalne toime

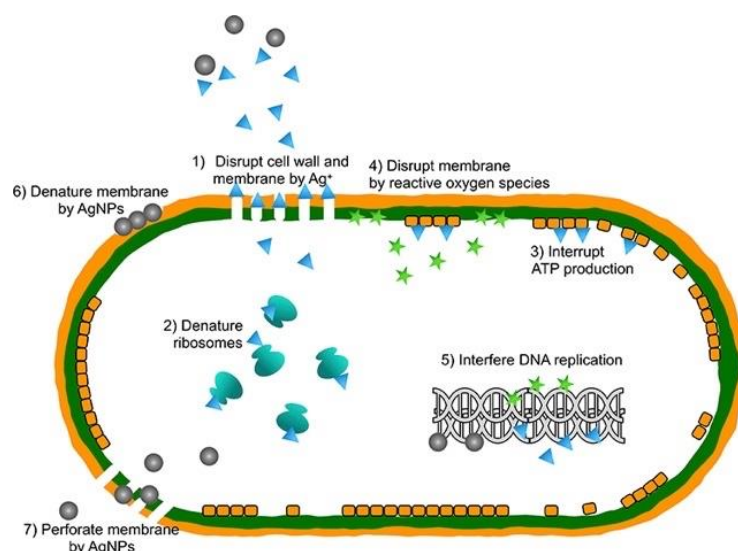
Oma kõrge antibakteriaalse aktiivsuse tõttu nanovormis kasutatakse AgNP-sid ja nendel põhinevad tooted antibiootikumide kõrval paikse ravimina bakteriinfektsiooni raviks (Cheng, et al. 2016). AgNP-d on efektiivsed nii grampositiivsete kui ka gramnegatiivsete bakterite vastu (Cavassin, et al. 2015). Täpne mehhanism, mille abil AgNP-d toimivad bakteritele ei ole veel täielikult välja selgitatud. Olemasolevatel eksperimentaalsetel andmetel põhjal võib esile tuua seitse AgNP-de toimemehhanismi (Joonis 1) (Yin, et al. 2020).

Esimene mehhanism põhineb rakuseina ja tsütoplasma membraani katkemisel: hõbedate nanoosakeste poolt vabanevad hõbedate ioonid ( $Ag^+$ ) kinnituvad või läbivad rakuseina ja tsütoplasma membraani (Bapat, Chaubal and Joshi 2018). Teine mehhanism põhineb ribosoomide denatureerimisel: hõbedaeioonid denatureerivad ribosoomi ja inhibeerivad valgusünteesi. Kolmas mehhanism põhineb adenosintrifosfaadi (ATP) tootmise katkestamisel: ATP tootmine lõpetatakse, kuna hõbedate ioonid deaktiveerivad tsütoplasmaatilisel membraanil hingamisensüümi (Yin, et al. 2020).

Neljanda mehhanismina toimub membraani kahjustamine reaktiivsete hapnikuliikide poolt ja elektronide transpordiahela katkemise tõttu tekivad reaktiivsed hapniku liigid, mis põhjustavad membraani häireid (Durán, Nakazato and Seabra 2016).

Viies mehhanism põhineb DNA replikatsiooni häirimisel: hõbede ja reaktiivsed hapniku liigid seonduvad DNA-ga ning takistavad selle replikatsiooni ja rakkude paljunemist (Bapat, Chaubal and Joshi 2018).

Kuues mehhanism põhineb membraani denaturatsioonil: hõbedate nanoosakesed kogunevad rakuseinas ja põhjustavad membraani denaturatsiooni (Khorrami, et al. 2018). Ja viimane seitsmes mehhanism põhineb membraani perforatsioonil: hõbedate nanoosakesed liiguvad otse läbi tsütoplasmaatilise membraani, mis võib rakust organelle vabastada (Yin, et al. 2020).



Joonis 1. Hõbeda nanoosakeste antibakteriaalne toime. 1) Rakuseina ja tsütoplasma membraani katkemine: hõbeda nanoosakeste poolt vabanevad hõbeda ioonid ( $Ag^+$ ) kinnituvad või läbivad rakuseina ja tsütoplasma membraani. 2) Ribosoomide denatureerimine: hõbeioonid denatureerivad ribosome ja inhibeerivad valgusünteesi. 3) Adenosiintrifosfaadi (ATP) tootmise katkestamine: ATP tootmine lõpetatakse, kuna hõbeda ioonid deaktiveerivad tsütoplasmaatilisel membraanil hingamisensüümi. 4) Membraani rikkumine reaktiivsete hapnikuliikide poolt elektronide transpordiahela katkemise tõttu tekivad reaktiivsed hapniku liigid, mis põhjustavad membraani häireid. 5) DNA replikatsiooni häirimine: hõbe ja reaktiivsed hapniku liigid seonduvad DNA-ga ning takistavad selle replikatsiooni ja rakkude paljunemist. 6) Membraani denaturatsioon: hõbeda nanoosakesed kogunevad rakuseinas ja põhjustavad membraani denaturatsiooni. 7) Membraani perforatsioon: hõbeda nanoosakesed liiguvad otse läbi tsütoplasmaatilise membraani, mis võib rakust organelle vabastada.

## 1.4. Vase nanoosakesed

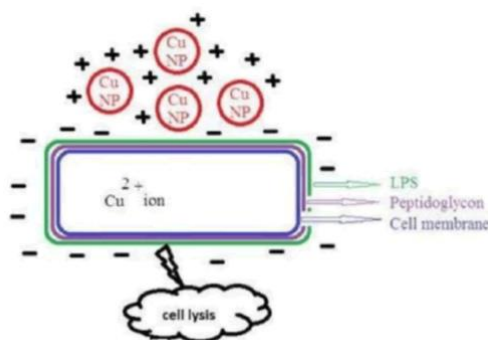
Ajalooliselt oli vask laialt kasutatud majapidamises, metallurgias, põllumajanduses ja majapidamisetoodetes (Mahmoodi, Elmi and Hallaj-Nezhadi 2018). Viimasel ajal nanotehnoloogia arengu tulemusena hakati vase nanoosakesi kasutama elektroonikas, puidukaitses, haiglaseadmetes ja tekstiilides. Vask on kergesti kättesaadav metall ja üks kõige olulisematest mikroelementidest enamikus elusorganismides (Cronholm, et al. 2011). Samuti nagu hõbe on vase ioonid näidanud head toksilisust paljude mikroorganismide vastu. Neid saab kasutada bakterite, pärmiseente ja viiruste hävitamiseks (Mahmoodi, Elmi and Hallaj-Nezhadi 2018)

### 1.4.1. Vase nanoosakeste antibakteriaalne toime

Üks kõige tuntumatest nanoosakeste toksilisuse mehhanismidest on interaktsioon bakteriraku membraani ja nanoosakeste vahel, mis viib bakteri membraani terviklikkuse katkemiseni ja lõpuks põhjustab bakteri surma (Gawande, et al. 2016). Paljude uuringute jooksul oli välja selgitatud, et vase nanoosakesed toimivad bakteriraku funktsioonidele mitmel viisil, sealhulgas gramnegatiivse bakteriraku seina külge adhesioon elektrostaatiliselt interaktsiooni tõttu (Joonis 2), mis avaldab mõju rakumembraani valgu struktuurile, rakusiseste valkude denaturatsioonile ning fosforit ja väävlit sisaldavate ühenditega nagu DNA interaktsioonile (Mahmoodi, Elmi and Hallaj-Nezhadi 2018).

Ühes uuringus, kus uuriti vase nanoosakeste antibakteriaalseid mehhanisme, kasutades bioloogilise vahendina *E. coli* bakterit, selgitati välja, et *E. coli* rakkude töötlemine vase

nanoosakestega põhjustas rakulise reaktiivse hapniku liigi (ROS) 2.5-kordse ületootmist. Samuti põhjustas nanoosakeste vahendatud ROS-i taseme tõus märgatava lipiidide peroksüdatsiooni, valkude oksüdatsiooni, DNA lagunemist ja lõpuks rakkude tapmist (Raffi, et al. 2010).



Joonis 2. Cu nanoosakeste antibakteriaalne toime elektrostaatilise interaktsiooni kaudu gramnegatiivsete bakterite rakuseinaga.

## 1.5. Kolloidhõbe

### 1.5.1. Kolloidhõbeda iseloomustus

Kolloidhõbe (Ag-col) on hõbeda nanoosakesed, mis on dispergeeritud vedelas keskkonnas, tihti abiainete, näiteks valkude, vahendusel. Nanoosakesed koos moodustavad hõbeda kolloidse lahuse. Selline lahus tavaliselt on termodünaamiliselt ebastabiilne ja intensiivse punakaspruuni värvusega plasmonresonantsefektide avaldumise tõttu. Õhuga kokkupuutel kolloidhõbe oksüdeerub mõne aja jooksul, samal ajal tekivad aeglaselt hõbedasoolad (Domínguez, et al. 2020).

### 1.5.2. Kolloidhõbeda kasutamine ja selle toksilisus

Kolloidhõbeda minimaalse bakteritsiidse kontsentratsiooni saavutamiseks peab üldiselt olema hõbeioonide kontsentratsioon üle 150 µg/l, aga see sõltub ekspositsiooni ajast, bakteritüvest, testikeskkonnast jne (Domínguez, et al. 2020).

1940. aastani Ag-col-i aktiivselt kasutati bakteritsiidse ja desinfektsioonivahendina. Arstid kasutasid Ag-col-i erinevate haiguste vastu, nagu külmetus, epilepsia ja gonorröa. Praegu Ag-col-i kasutamine on piiratud, kuna selle pikaajalise liigse inimese organismi sattumise tõttu võib tekkida spetsiifiline haigus nagu argüroos - hõbeda mürgistus (Kudrinskiy, et al. 2014).

## 1.6. Nanoosakeste toksilisust mõjutavad füüsikaliskemilised tegurid

Nanoosakeste antibakteriaalsete mehhanismide selgitamisega oli ka kindaks tehtud, et nanoosakeste omadused, nimelt keemiline suurus, laeng, osakeste koostis, kate, kuju, ionide

vabanemise efektiivsus, lahustumiskiirus ja pind, mõjutavad ka nende toksilisust (El Badawy, et al. 2011).

Nanoosakeste suurus ja pindala mängivad olulist rolli, määrates oluliselt nanoosakeste koostoimet ainulaadse mehhanismi elussüsteemidega. Nanoosakeste väike suurus võimaldab neil tungida läbi epiteeli ja endoteeli barjääride lümfii ja verre, kandudes vereringe ja lümfivoolu kaudu erinevatesse organitesse ja kudesse (Lu, et al. 2013).

Seoses suurusega viidi läbi üks uuring (Lu, et al. 2013), kus kontrolliti AgNP-de toksilisust bakterite vastu, mis põhjustavad periodontaalseid haiguseid. AgNP-sid suurusega 5, 15 ja 55 nm sünteesiti keemilise redutseerimise teel polüvinüülpürrolidooniga (PVP) ja hinnati nende toksilisust *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*'i, *Streptococcus mutansi*, *Streptococcus sanguis*'e, *Streptococcus mitis*'e ja *Aggregatibacter*'i bakterite vastu. Nanoosakesed 5 nm suurusega näitasid paremat toksilisust võrreldes suuremate nanoosakestega, kusjuures testitud mikroorganismide minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon oli vahemikus 25 kuni 50 µg/mL (Lu, et al. 2013).

Nanoosakeste pinnalaeng mängib olulist rolli ka nende toksilisuses, kuna see määrab oluliselt nanoosakeste koostoimet bioloogiliste süsteemidega (Wang, Hu ja Shao 2017). Ühes uuringus näidati, et positiivselt laetud nanoosakestel on kõrgem antibakteriaalne toime, kui negatiivselt laetud nanoosakestel. Kõrge toksilisus on seletatav nende võimega kergesti rakkudesse siseneda. Selle põhjuseks on elektrostaatiline külgetõmme negatiivselt laetud rakumembranni glükoproteiinide ja positiivselt laetud nanoosakeste vahel (Jo, et al. 2015).

Seoses nanoosakeste suuruse ja laenguga on veel üks tähtis mõjutav tegur moodustunud toodete stabiilsus, mis väljendub zeta-potentsiaalis (Pons, et al. 2006). Kui sünteesitud AgNP-del on madal stabiilsus, kipuvad need agregeeruma ja moodustama suuremaid osakesi. Kõige stabiilsemad on reeglina tugevalt positiivse või negatiivse zeta-potentsiaaliga suspensioonid (Chen, et al. 2016).

#### 1.6.1. Hõbeda ja vase nanoosakeste pinnakatete mõju toksilisusele

Stabiliseerimiseks või laengu andmiseks nanoosakesi kaetakse sageli orgaaniliste funktsionaalrühmadega (Ray 2011). Nanoosakeste pinna kaitsmiseks või kaitsvate, stabiliseerivate, funktsionaalsete omaduste tagamiseks saab kasutada erinevaid kemikaale, nagu polümeerid, anioonid, katioonid või mitteioonid pindaktiivsed ained, ioonid vedelikud ja redutseerivad ained (Labhasetwar and Leslie-Pelecky 2007).

Katte kandmine nanoosakestele võib mõjutada nende koostoimet rakkudega. Näiteks, ühes uuringus kasutati glükaani katmist, et vältida nanoosakeste katmist verevalkudega (Marradi, et al. 2013). Lisaks on pinnalaeng üks nanoosakeste omadusest, mis võib muuta nende koostoimet rakkudega. On näidatud, et hargnenud polüetüülenimiiniga (PEI) põhjustavad kaetud positiivselt laetud AgNP-d bakteritele suuremat toksilisust võrreldes negatiivse laenguga polüvinüülpürrolidooniga (PVP) kaetud AgNP-dega. AgNP-de katteid kasutatakse sageli nende parema hajutatavuse tagamiseks ja nende füüsikalise-keemiliste omaduste häälestamiseks erinevateks rakendusteks (El Badawy, et al. 2011).

Katted on olulised ka CuO nanoosakeste toksiliste mõjude suurendamiseks. Näiteks, ühes uuringus näidati, et polüetüleenglükooli (PEG) ja PVP-ga kaetud CuO nanoosakestel oli parem antibakteriaalne toime kui katmata CuO nanoosakestel (Javed, et al. 2017). Sarnaselt AgNP-dele võib lahustumisel olla oluline mõju CuO nanoosakestele toksilistele mõjudele. CuO nanoosakesed võivad orgaanilises keskkonnas väga hästi lahustada ja lahustumist saab modifitseerida kattematerjalidega (Líbalová, et al. 2018).

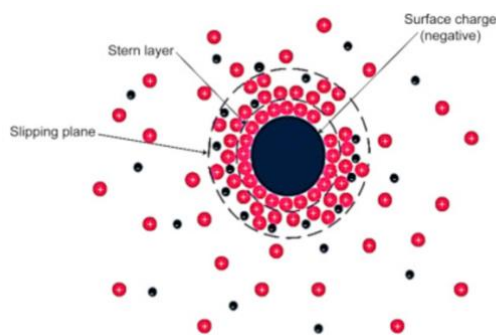
### 1.6.2. Zeta-potentsiaal ja selle definitsioon

Kuna nanoosakeste stabiilsus mõjutab oluliselt nanoosakeste toksilisust, siis katsete läbiviimisel on vaja arvestada nanoosakeste zeta-potentsiaali.

Zeta-potentsiaal ehk  $\zeta$ -potentsiaal on elektrokineetilise potentsiaali lühend koloidsüsteemides.  $\zeta$ -potentsiaal on nimetatud topeltkihi elektripotentsiaali järgi ja määratakse laetud osakeste kiiruse mõõtmise teel, mis liiguvad elektroodi poole üle proovilahuse välise elektrivälja juuresolekul (Pons, et al. 2006). Laetud osakese pind tõmbab ligi õhukese vastaslaenguga kihti ja seob sellega kindlalt, moodustades õhukese vedela kihti nimega «Sterni kiht»; osakese lahuses difundeerudes haarab ta endasse lõdvalt assotsieerunud ionidest koosnev välimine difuusne kiht, mille tulemusena tekib elektriline topeltkiht (Joonis 3) (Clogston and Patri 2011).

Zeta-potentsiaali määramine on oluline selleks, et hinnata nanoosakeste pinnalaengu, mida saab kasutada nanosuspensioonide füüsikalise stabiilsuse mõõtmiseks (Jiang, et al. 2008).  $\zeta$ -potentsiaali suur positiivne või negatiivne väärtus nanokristallides näitab nanosuspensioonide head füüsikalist stabiilsust üksikute osakestega elektrostaatilisest tõuke tõttu.

$\zeta$ -potentsiaali väärtus, mis on tugevasti positiivne või negatiivne (üle  $-30$  mV või  $+30$  mV) peetakse piisavaks, et saavutada paremat füüsilist kolloidset stabiilsust. Neutraalne  $\zeta$ -potentsiaalne väärtus põhjustab osakeste agregatsiooni ja sade ilmumist, kuna mõjuvad Van der Waalsi atraktiivsed jõud. Need efektid võivad põhjustada füüsilist ebastabiilsust (Jiang, Oberdörster and Biswas 2008). Lisaks  $\zeta$ -potentsiaali väärtustele mõjutavad saadud materjali füüsikalist stabiilsust ka muud tegurid, nagu materjali omadused, pindaktiivsete ainete olemasolu ja lahuse keemia (Murdock, et al. 2007).



Joonis 3. Zeta-potentsiaali illustratsioon, mis näitab pinnalaengut, Sterni kihti ja libisevat kihti.

### 1.6.3. Nanosuspensioonide sonikeerimine

Nanoosakeste suurus võib mõjutada nende lahustuvust ja rakkudesse sisenemist. Sellel põhjusel on vaja jälgida, et nanosuspensioon oleks võimalusel stabiilne ja ühtlase suurusjaotusega. Selle saavutamiseks nanosuspensioonide ettevalmistamisel kasutatakse sonikeerimist (Cho, et al. 2012).

Ultrasonikeerimine on protsess, mille käigus muudetakse helienergia füüsilisteks vibratsioonideks ja mis võib olla kasutatud lahuses olevate suurte osakeste purustamiseks väiksemateks nanoosakesteks (Bihari, et al. 2008). Tavaliselt seda teostatakse ultrahelivanni või sarve/sondi abil, mida tuntakse ka sonikaatorina. Sond edastab vibratsioonienergiat nanoosakesi sisaldavale lahusele. See liigub üles ja alla väga suure kiirusega, kusjuures amplituudi valib operaator ja see sõltub kasutatavast lahendusest ja selle rakendusest (Johnston, et al. 2013). Luuakse kavitatsioonieffekt, mille käigus vibratsioonid tekitavad lahuses koos tühikutega mikroskoopilisi mulle, mis on kinni pigistatud tekitatud molekulide vahel. Pärast need hakkavad lõhustuma, et saada ümbritsevasse piirkonda lööklaineid, mis tsirkuleerivad lahusesse ja purustavad suuri nanoosakesi väiksemateks (Meißner, Oelschlägel and Potthoff 2014) (Cronholm, et al. 2011).

## 1.7. Nanoosakeste toksilisuse testid bakteritega

Bakterid on üherakulised prokarüootsed organismid, mis on tänu oma struktuurilisele lihtsusele võrreldes eukarüootidega, muutuvates kasvutingimustes ellujäämisele ja lühikesele genereerimisajale (20-40 minutit) hästi sobivad nanoosakeste toksilisuse ja nende vahel tekkivaid interaktsioone uurimiseks (Leimbach, Hacker and Dobrindt 2013) (Lin, et al. 2014).

Kõige populaarsem maailmas bakter, mida kasutatakse katsete jaoks on *Escherichia coli*. Suur osa molekulaarbioloogia põhimõistetest, mis meil praegu on, nagu replikatsioon, geeniekspressioon ja valgusüntees on saavutatud *E. coli* uuringute kaudu (Blount 2015).

*E. coli* on gramnegatiivne pulgakujuline fakultatiivne anaeroobne bakter, mis oli avastatud 1885. aastal ja mis leidub tavaliselt soojavereliste organismide alumises soolestikus. Laboratoorsetes tingimustes *E. coli* bakterit võib odavalt ja lihtsalt kasvatada (Idalia and Bernardo 2017).

Selles töös kasutati *E. coli* bakterit K-12 ja samuti veel neli bakterit (need on kirjeldatud praktilises osas) selleks, et saada objektiivseid tulemusi ja täpsemalt uurida, kuidas sõltub hõbeda ja vase nanoosakeste koosmõju bakteri klassist ja gram-värvimisest.

Bakterite elulisuse testimiseks kasutati nii nimetatud spot-test, mille abil oli võimalik määrata minimaalset bakteriitsidset kontsentratsiooni.

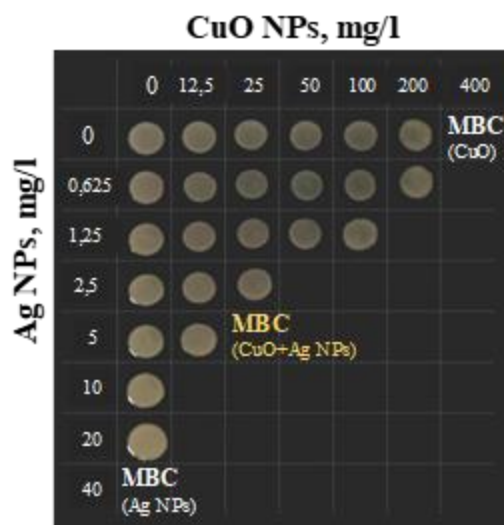
### 1.7.1. Minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon

Minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon (MBC) on aine madalaim kontsentratsioon, mis on vajalik konkreetse bakteri hävitamiseks. Seda saab määrata erinevate testide kaudu, külvates agarplaatidele baktereid nanoosakeste suspensioonides. MBC tuvastatakse antibakteriaalse aine madalaima kontsentratsiooni määramisega, mis vähendab esialgse bakteriaalse inokulaadi elujõulisust  $\geq 99,9\%$  võrra (Parvekar, et al. 2020).

### 1.7.2. Spot-test

Spot-test on alternatiivne meetod hägususpõhisele meetodile, mida kasutatakse minimaalse bakteritsiidse kontsentratsiooni määramiseks (Wang, Woo and Yan 2017). Selle meetodi eelistele kuuluvad kiirus, sama tingimuste säilitamine kõikide testide jaoks ja plaatide arvu minimaliseerimine.

Analüüs põhineb sellel, et elujõuliste rakkude võime moodustada kolooniaid agarplaadis väheneb nanoosakeste kontsentratsiooni suurenemisega (Joonis 4). Seetõttu see meetod võimaldab minimaalset bakteritsiidset kontsentratsiooni võrrelda erinevate tüvede tundlikkusega nanoosakeste suhtes.



Joonis 4. Spot-test agaraseeritud LB söötmel bakteriga *E. coli* K-12 pärast 24 tundi inkubeerimist RPMI CCM baasil rakukultuurisöötmes kaseiiniga kaetud hõbeda nanoosakeste ja CuO-ga (üksi ja segatuna). Telgedel on näidatud toksiliste ainete kontsentratsioonid. CuO ja Ag-col-i bakteritsiidsed kontsentratsioonid on vastavalt 400 mg/l ja 40 mg/l. Samuti võib näha, et CuO ja Ag nanoosakeste segus on bakteritsiidsed kontsentratsioonid on vastavalt ainult 25 mg/l ja 5 mg/l.



## Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureusetöö põhieesmärk oli uurida hõbeda ja vase nanoosakeste koosmõju erinevatele bakteritele. Selle töö hüpotees seisnes selles, et hõbeda ja vase nanoosakesed toimivad koos efektiivsemalt kui omaette.

Spetsiifilised töö eesmärgid olid järgmised:

- 1) Iseloomustada hõbeda ja vase nanoosakeste vahel tekkivat koosmõju.
- 2) Välja selgitada, milliste bakterite puhul hõbeda ja vase nanoosakeste vahel tekkiv koosmõju on kõrgem ja miks.

## 2. Materjalid ja meetodid

### 2.1. Kasutatud nanoosakesed, keemikalid ja söötmed

Antud bakalaureusetöös kasutati katmata CuO (Sigma-Aldrich) ja kaetud CuO (PlasmaChem GmbH) nanoosakesi, katmata Ag (Sigma-Aldrich), Ag<sub>2</sub>O ja kaseiiniga kaetud Ag-col-i (Laboratorios Argenol S. L.) nanoosakesi. Kaetud CuO nanoosakesed olid funktsionaliseeritud karboksüüli- (COOH) ja amiini- (NH<sub>2</sub>) rühmadega. Kontrolliks ja tulemuste võrdlemiseks kasutati vasesoola CuSO<sub>4</sub> (Alfa Aesar) ja AgNO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich).

Nanoosakeste suspensioonide valmistamiseks (lõppkontsentratsiooniga 2000 mg/l) kasutati MilliQ vett ja ultraheli homogenisaatorit (Branson Sonifier 450).

Bakterite kasvatamiseks kasutati Luria-Bertani (LB) söödet. LB valmistati lahustades trüptooni (5 g), pärmiekstrakti (2.5g) ja NaCl (5 g) MilliQ vees (500 ml), mis autoklaaviti (121°C, 15 min) ning hoiti toatemperatuuril.

Rakkude kultiveerimiseks kasutati RPMI koos FBS ja Na-pyr testimissöödet (RPMI CCM), kuna FBS sisaldab vereseerumit ja kõike vajalike kasvufaktoreid ning simuleerib inimorganismis olevat keskkonda.

Minimaalse bakteritsiidse kontsentratsiooni (MBC) hindamiseks kasutati LB tardsöötmeid, kus LB lahusele lisati agar (7.5 g). LB tardsöötmeid MBC hindamiseks valati kandilisele Petri tassile.

### 2.2. Nanoosakeste iseloomustus

Antud töö jaoks kasutati nanoosakesi, milliste füüsikalise-keemilised parameetrid olid juba mõõdetud teiste teadlaste poolt ja näidatud Tabelis 1.

Tabel 1. Kasutatud nanoosakeste nimekiri ja nende füüsikalise-keemiliste parameetrite iseloomustus.

Nano-osakese nimetus	Esmane suurus, nm	Hüdrodünaamiline suurus (Dh) MilliQ vees, nm± sd	Hüdrodünaamiline suurus(Dh) testsöötmes, nm± sd	Zeta-potentsiaal MilliQ vees, mV	Zeta-potentsiaal testsöötmes, mV
CuO	15.9 ± 5.2*	237 ± 31 (0.25)*	204 ± 13 (0.45)*	27.5 ± 1.8*	- 10.8 ± 1.4*
CuO-NH <sub>2</sub>	6.9 ± 2.2*	733 ± 252 (0.24)*	936 ± 229 (0.67)*	25.8 ± 1.3*	- 8.9 ± 0.8*
CuO-COOH	9.2 ± 2.5*	1124 ± 128 (0.35)*	303 ± 84 (0.70)*	- 12.0 ± 2.2*	- 10.2 ± 0.8*
Ag-col	12.5 ± 4**	45.88 ± 0.21 (0.261)**	61.2 ± 0.47 (0.24)**	-56.6 ± 1.91**	-9.76 ± 0.84**
nAg	85.7 ± 29.3***	109.4 ± 1.3 (0.447)***	156 ± 3.15 (0.403)***	-27.7 ± 1.65***	-10.49 ± 0.93***
Ag <sub>2</sub> O	23 ± 16.8*	81.265 ± 9.04 (0.604)*	81.8 ± 24.21 (0.533)*	-50.97 ± 4.15*	-10.2 ± 0.2*

\* Nanoosakesed olid mõõdetud Kubo ja et.al (Kubo 2020)

\*\* Nanoosakesed olid mõõdetud Blinova ja et.al (Blinova 2013)

\*\*\* Nanoosakesed olid mõõdetud Kurvet ja et.al (Kurvet 2013)

### 2.3. Nanosuspensioonide valmistamine

Nanosuspensioonide valmistamiseks kaaluti 0.2 grammi erinevaid nanoosakesi ja lisati 10 ml MilliQ vett selleks, et saada 2% lahust. Pärast valmistatud nanoosakeste lahuseid dispergeeriti homogenisaatoris 5 min 21% võimsusega jää peal (stabiilse temperatuuri hoidmiseks).

### 2.4. Kasutatud bakterid ja nende kirjeldus

Uuringu jaoks valiti 5 erinevat bakterit (Tabel 2), et välja selgitada, kuidas bakterite omadused mõjutavad hõbeda ja vase nanoosakeste vahel tekkivat koosmõju. Kõik need bakterid on infektsioonide peamised patogeenid ja tekitavad palju probleeme tervishoiu valdkonnas.

Tabel 2. Kasutatud bakterite nimekiri ja nende lühikirjeldus.

Bakteri nimetus	Sugukond	Gram-värvimine	Bakteri kuju	Bakteri suurus
<i>E. coli</i> K-12	enterobakterid	gramnegatiivne	pulgakujuline	1.0-2.0 µm
<i>E. coli</i> ESBL(kõrge resistentsusega)	enterobakterid	gramnegatiivne	pulgakujuline	1.0-2.0 µm
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	pseudomonaad	gramnegatiivne	pulgakujuline	1.5-3.0 µm
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	stafülokokid	grampositiivne	ümara kujuline	0.8-1.2 µm
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	enterokokid	grampositiivne	ümara kujuline	0.6-2.5 µm

#### 2.4.1. Bakterite ettekasvamine

Alguses pandi bakter LB agar söötmega Petri tassile 24 tunniks kasvama. Pärast võeti Petri tassilt väike bakterikoloonia kogust ja pandi seda 3 ml LB söötmes üleöö loksutil kasvama tihedaks kultuuriks. Bakteri kasvatamiseks kasutati loksutil (Forma Orbital Shaker 420) (200 rpm, 30°C). Järgmisel päeval võeti 400 µl üleöö kasvatatud bakterisuspensiooni ja lisati 20 ml RPMI CCM söötmele. Bakterisuspensioonit kasvatati loksutil samal temperatuuril umbes 3 tunni, kuni eksponentsiaalse faasi saavutamiseni tihedusega OD600=0.7. Selleks, et tihedust kontrollida, võeti kaks 2 ml anumit: üks sisaldas 2 ml RPMI CCM bakterita, teine 200 µl bakteriaalse suspensiooni ja 1800 µl RPMI CCM söödet. Need anumid pandi spektrofotomeetrise (Malvern), et määrata optilist tihedust. Eksponentsiaalse kasvufaasi saavutatud bakterit lahjendati LB söötmes kuni tiheduseni OD600=0.07.

## 2.5. Spot-testi läbiviimine

Spot-testi kasutati selleks, et määrata minimaalse bakteritsiidse kontsentratsiooni.

Spot-test viidi läbi mitmes etapis ja selle jaoks kasutati varem ettevalmistatud baktereid. Testi jaoks valmistati valget 96-auguga mikrotiiterplaati (BD Falcon) ette. Eelnevalt kirjeldatud CuO ja Ag nanoosakeste suspensioonid lahjendati MilliQ vees kuni vajaliku kontsentratsiooni saavutamiseni ning lisati mikrotiiterplaadile vastavalt Tabelile 3. Seejärel lisati igasse auku 75 µl bakterisuspensiooni koos Ag ja CuO nanoosakestega ning inkubeeriti plaati 30°C juures 24 h. Pärast 24 h bakterite eksponeerimist pipeteeriti 3 µl suspensiooni Petri tassile LB tardsöötmega. Seejärel inkubeeriti tassi 30°C 24 h. Spot-testi tulemused on kokku võetud viie sõltumatu katse põhjal.

Tabel 3. Nanoosakeste kontsentratsioonid plaadil.

		CuO NP-d, mg/L							
		0	12,5	25	30	50	100	200	400
AgNP-d, mg/L	0								
	0,625								
	1,25								
	2,5								
	5								
	10								
	20								
	40								

## 2.6. Andmetöötlus

Andmetöötlus oli teostatud Microsoft (MS) Excel keskkonnas. Tulemused on esitatud viie erineva katse keskmistena  $\pm$  standardhälve (sd).

### 3. Tulemused ja arutelu

#### 3.1. Hõbeda ja vase nanoosakeste antibakteriaalne koosmõju

Hõbeda ja vase nanoosakeste koosmõju uuriti spot-testiga. Katsete põhjal selgitati välja, et nanoosakeste segude antibakteriaalsed omadused olid mitu korda kõrgemad kui sama nanoosakeste antibakteriaalsete toimete summa eraldi RPMI CCM-is.

Antibakteriaalse koosmõju koefitsient ( $K(AbS)$ ) oli arvatud komponentide fraktsionaalsete bakteriitsidsete kontsentratsioonide (FBC) summa pöördväärtusena.  $K(AbS)$  näitab, mitu korda segu on efektiivsem kui komponentide antibakteriaalse toime summa eraldi.

$$K(AbS) = \frac{1}{\sum FBC} = \frac{1}{FBC \text{ of antimicrobial A} + FBC \text{ of antimicrobial B}} = \\ = 1 / \left( \frac{MBC \text{ of antimicrobial A in mix}}{MBC \text{ of antimicrobial A alone}} + \frac{MBC \text{ of antimicrobial B in mix}}{MBC \text{ of antimicrobial B alone}} \right)$$

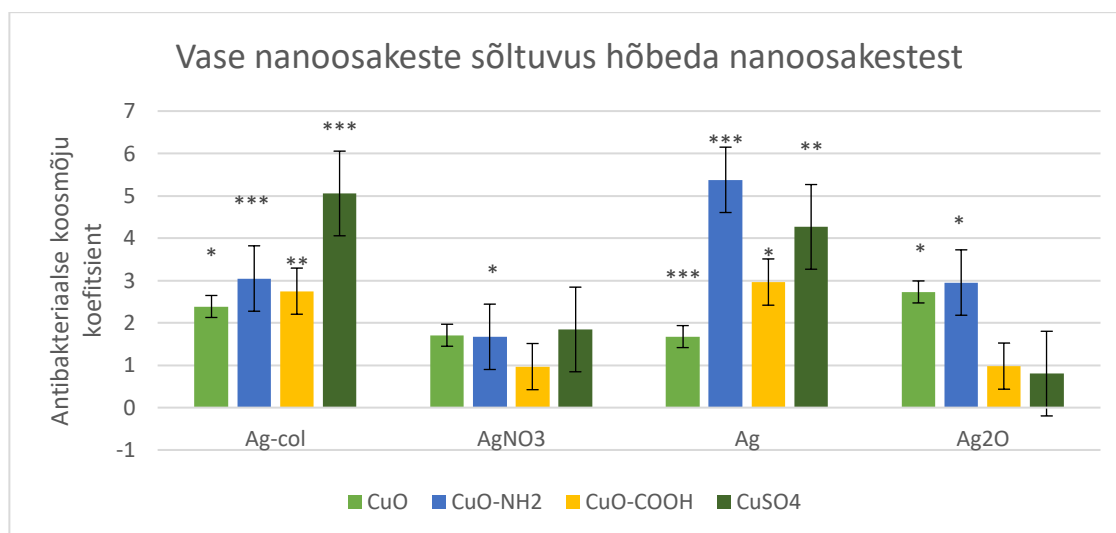
Kui  $K(AbS) > 2$  on tegemist tugeva sünergiaefektiga, kui  $K(AbS) = 0,5-2$  aditiivne või kerge sünergia/antagonism,  $K(AbS) < 0,5$  tugev antagonism.

#### 3.2. Antibakteriaalse koosmõju sõltuvus Ag nanoosakestest

Alguses viidi läbi katseid erinevate Ag komponentidega, et välja selgitada, millistel Ag komponenditel on kõige tugevam antibakteriaalne koosmõju CuO nanoosakestega. Selleks valiti *E. coli* K-12 bakterit ja katsete läbiviimiseks kasutati spot-testi meetodit. Saadud MBC tulemused nii eraldi kui ka segus on näidatud Tabelis 4. Arvatud  $K(AbS)$  on näidatud Joonisel 5.

Tabel 4. Komponentide keskmise minimaalse bakteritsiidse kontsentratsiooni (MBC) väärtused eraldi ja segus erinevate Cu ja Ag komponentidega E. coli K-12 bakteriga.

Cu nanoosakesed	Ag nanoosakesed	none	Ag-col, mg/L	nAg, mg/L	Ag <sub>2</sub> O, mg/L	AgNO <sub>3</sub> , mg/L
none			0	0	0	0
			34.04 ± 13.1	1333 ± 428	66.67 ± 24.62	10.16 ± 8.20
CuO, mg/L		215.4 ± 114.4	41.67 ± 14.43	68.75 ± 37.5	33.33 ± 14.43	54.17 ± 43.9
		0	7.441 ± 2.577	125 ± 50	12.5 ± 0	2.744 ± 3.385
CuO-NH <sub>2</sub> , mg/L		157.1 ± 51.4	18.75 ± 7.22	25 ± 0	25 ± 21.65	37.5 ± 42.08
		0	5.208 ± 3.348	87.5 ± 25	12.5 ± 0	2.508 ± 3.646
Cu-COOH, mg/L		350 ± 90.5	12.5 ± 0	62.5 ± 43.3	200 ± 0	206.3 ± 274
		0	11.90 ± 5.16	350 ± 100	16.67 ± 7.217	4.350 ± 3.174
CuSO <sub>4</sub> , mg/L		217.6 ± 72.8	22.5 ± 16.3	12.5	115.5	12.5 ± 0
		0	2.679 ± 0.998	100 ± 0	12.5 ± 7.217	3.646 ± 3.646



Joonis 5. Antibakteriaalse koosmõju koefitsient erinevate Ag ja Cu nanoosakeste vahel E. coli K-12 bakteriga. \* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $<0,01$ ; \*\*\* -  $< 0,001$ , ## -  $P < 0,01$  antagonism.

Joonisel on näha, et kõige suuremad K(Abs)-id on Ag-col-i ja CuSO<sub>4</sub> vahel; Ag ja CuO-NH<sub>2</sub> vahel, vaid kui vaadata Ag-col-i ja Ag nanoosakeste MBC-d, siis võib teha järeldust, et Ag-col sobib katsete läbiviimiseks paremini, kuna selle MBC on ~34.04 mg/L aga Ag nanoosakestel on ~1333,33

mg/L. See tähendab, et Ag nanoosakesed ei toimi bakterite vastu nii efektiivselt, kui Ag-col. Sellel põhjusel järgmiste katsete läbiviimiseks valiti Ag-col-i nanoosakesed (Joonis 5).

### 3.3. Hõbeda ja vase nanoosakeste antibakteriaalne koosmõju erinevatele bakteritele

Hõbeda ja vase täpsemaks antibakteriaalse koostoime mõõtmiseks ja selle sõltuvust bakterite omadustest valiti viis bakterit, millistel on erinev gram-värvimine, liik ja suurus: *E. coli* K-12, *E. coli* ESBL (kõrge resistentsusega bakter), *P. aeruginosa* PAO1, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212.

Erinevate CuO ja Ag-col-i komponentide MBC tulemused on näidatud Tabelis 5. Arvutatud K(AbS) erinevate bakteritega on näidatud Joonisel 6.

Tabel 5. Erinevate Cu ja Ag-col-i komponentide MBC tulemused erinevate bakteritega segus ja eraldi.

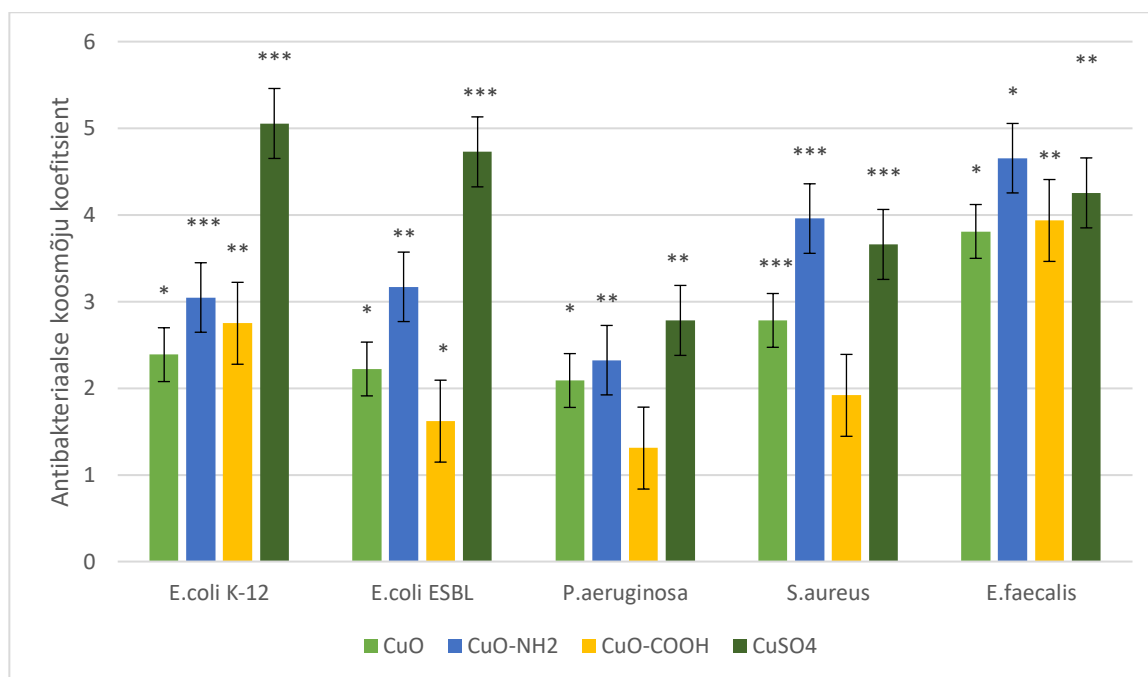
Bakter(gram-värvimine)	MBC eraldi $\pm$ SD	MBC(CuX) segus $\pm$ SD	MBC(Ag-col) segus $\pm$ SD	K(AbS)
<b><i>E. coli</i> K-12 (G-)</b>				
Ag-col	34.04 $\pm$ 13.1			
CuO	215.4 $\pm$ 114.4	41.67 $\pm$ 14.43	7.441 $\pm$ 2.577	2.387 $\pm$ 1.179
CuO-NH <sub>2</sub>	157.1 $\pm$ 51.4	18.75 $\pm$ 7.22	5.208 $\pm$ 3.348	3.047 $\pm$ 0.289
CuO-COOH	350 $\pm$ 90.5	12.5 $\pm$ 0	11.90 $\pm$ 5.16	2.75 $\pm$ 0.915
CuSO <sub>4</sub>	217.6 $\pm$ 72.8	22.5 $\pm$ 16.3	2.679 $\pm$ 0.998	5.055 $\pm$ 0.383
<b><i>E. coli</i> ESBL(G-)</b>				
Ag-col	45.83 $\pm$ 9.73			
CuO	133.3 $\pm$ 57.7	41.67 $\pm$ 14.43	7.292 $\pm$ 4.774	2.222 $\pm$ 0.801
CuO-NH <sub>2</sub>	100 $\pm$ 0	20.83 $\pm$ 7.22	5.208 $\pm$ 1.804	3.17 $\pm$ 0.536
CuO-COOH	333.3 $\pm$ 115.5	58.33 $\pm$ 38.19	20.83 $\pm$ 7.22	1.621 $\pm$ 0.352
CuSO <sub>4</sub>	200 $\pm$ 0	25 $\pm$ 0	4.167 $\pm$ 1.804	4.727 $\pm$ 0.63
<b><i>P. aeruginosa</i> PAO1(G-)</b>				
Ag-col	28.91 $\pm$ 15.63			
CuO	1400 $\pm$ 400	43.75 $\pm$ 12.5	15.63 $\pm$ 10.83	2.089 $\pm$ 0.867
CuO-NH <sub>2</sub>	200 $\pm$ 122.5	20 $\pm$ 6.85	8.75 $\pm$ 3.423	2.324 $\pm$ 0.653
CuO-COOH	800 $\pm$ 0	34.38 $\pm$ 18.75	21.88 $\pm$ 6.25	1.31 $\pm$ 0.592
CuSO <sub>4</sub>	720 $\pm$ 178.9	20 $\pm$ 6.85	8.75 $\pm$ 3.423	2.783 $\pm$ 0.687
<b><i>S. aureus</i> ATCC 25923 (G+)</b>				
Ag-col	16.25 $\pm$ 5.88			
CuO	60 $\pm$ 22.36	17.5 $\pm$ 6.85	2.969 $\pm$ 2.096	2.18 $\pm$ 0.447
CuO-NH <sub>2</sub>	80 $\pm$ 27.39	12.5 $\pm$ 7.65	1.875 $\pm$ 0.699	3.958 $\pm$ 0.858
CuO-COOH	110 $\pm$ 54.8	11.25 $\pm$ 2.8	8.125 $\pm$ 4.193	1.918 $\pm$ 1.106
CuSO <sub>4</sub>	90 $\pm$ 22.36	16.25 $\pm$ 8.39	1.875 $\pm$ 0.699	3.659 $\pm$ 1.083



<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (G+)				
Ag-col	58.33 ± 19.46			
CuO	233.3 ± 152.8	29.17 ± 19.09	9.375 ± 5.413	3.81 ± 1.374
CuO-NH <sub>2</sub>	266.7 ± 115.5	12.5 ± 0	10.42 ± 3.61	4.655 ± 1.62
CuO-COOH	400 ± 0	16.67 ± 7.22	12.5 ± 0	3.936 ± 0.983
CuSO <sub>4</sub>	200 ± 0	20.83 ± 7.22	8.333 ± 3.608	4.254 ± 0.977

Tabelist 5 on selgelt näha, et nanoosakeste antibakteriaalne koosmõju segus bakteritele on oluliselt kõrgem kui üksikute nanoosakeste puhul. Näiteks, kui käsitleda *S. aureus* bakterit, siis on näha, et selle minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon CuO erinevate nanoosakestega varieerub ~60-110 mg/L vahemikus ja Ag-col-i puhul on ~16.25 mg/L. Kui läbi vaadata sama bakterit CuO ja Ag-col-i nanoosakestega segus, siis selle bakteri elulisus on umbes 6,25 korda vähem. See tõestab seda, et hõbeda ja vase nanoosakeste vahel tekib antibakteriaalne koosmõju ja nende antibakteriaalne toime suureneb mitmekordselt.

Samuti on näha, et kõige väiksem MBC (eraldi) kõikidel bakteritel on Ag-col-i nanoosakestega, mis tähendab seda, et Ag-col-il on kõrgeim toime bakterite vastu võrreldes teiste hõbeda ja vase nanoosakestega.



Joonis 6. Antibakteriaalse sünergia koefitsient Ag-col-i ja erinevate vase komponentide vahel erinevates bakterites. \* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $< 0,01$ ; \*\*\* -  $< 0,001$ , ## -  $P < 0,01$  antagonism.

Kui läbi vaadata Ag-col-i CuO nanoosakestega segus, siis kõige parem koosmõju nanoosakeste vahel oli Ag-col-i ja CuO-NH<sub>2</sub>. Põhjus võib olla nende laengute vahes. Kuna Ag-col oli negatiivselt laetud ja CuO-NH<sub>2</sub> nanoosakesed positiivselt laetud, siis ühendamisel nende kogulaeng muutus positiivsemaks võrreldes negatiivselt laetud Ag nanoosakestega. Selle tõttu nende vahel tekkis

elektrostaatiline külgetõmme ja Ag sisaldav komposiit paremalt tõmbus negatiivselt laetud bakteri membraanile.

Samuti hea koosmõju kõikide bakteritega oli Ag-col-i nanoosakeste ja CuSO<sub>4</sub> ionide vahel, kuna vaseioonid CuSO<sub>4</sub>-lt on ka positiivselt laetud.

Kõige madalam sünergia oli Ag-col-i ja CuO-COOH nanoosakeste vahel. Nii Ag-col-il kui ka CuO-COOH nanoosakestel on negatiivne laeng, selle tõttu ei saanud need moodustada komposiidi ning Ag sisaldav komponent ei saanud hästi kleepuda bakteri membraanile.

Antud töö tulemused on kooskõlas varasemalt tehtud uuringutega. Näiteks Garza-Cervantes (2017) töös uuriti, milliste metallide kombinatsioonidega võib olla alanenud minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (Garza-Cervantes, et al. 2017). Selleks võeti kaks bakterit: *Eschericia coli* ja *Bacillus subtilis*, millest esimene oli gramnegatiivne vaid teine oli grampositiivne. Tulemustest selgus, et hõbedate ja vasekade kombinatsioonide antibakteriaalne koostoime oli kuni 8 korda parem, kui nanoosakeste antibakteriaalne toime omaette.

Kui käsitleda nanoosakeste koosmõju tulemusi iga bakteri kohta, siis on näha, et kõige suurem koosmõju oli nanoosakestel *E. faecalis* bakteriga. See võib olla seotud palju kiirema DNA hävitamise kiirusega vase komponentidest võrreldes *E. coli* bakteriga (Warnes, Caves and Keevil 2012).

Ühes varasemas töös (Bankier 2019), kus uuriti metallnanoosakeste kombinatsioonide antibakteriaalse koostoimet, oli eeldatud, et kõrge nanoosakeste koosmõju grampositiivsete bakterite vastu võib olla seotud nende rakuseina ehitusega (Bankier, et al. 2019). Grampositiivsetel bakteritel ei ole rakuümbrises välismembraani ja esineb ainult tsütoplasma membraan, sellepärast võivad vase nanoosakesed põhjustada pooride moodustumist rakumembraanis, mis võimaldab hõbeda nanoosakestel tungida rakku ja bakterit hävitada.

Kõige madalam nanoosakeste sünergia oli *P. aeruginosa* bakteri puhul. Vaatamata sellele, et teiste bakteritega võrreldes *P. aeruginosa* K(AbS) oli kõige madalam, on näha, et nanoosakeste antibakteriaalne koosmõju koefitsient segus *P. aeruginosa* bakteri vastu kasvas vähemalt kaks korda võrreldes üksikute nanoosakestega.

Ühes varasemas uuringus (Salomoni 2017), mis oli seotud hõbeda nanoosakeste ja antibiootikumide mõju võrdlemisega *P. aeruginosa* bakteri puhul oli saadud sarnased tulemused. Uurimiseks valiti kolm bakteri tüve, millest kaks oli võetud nakkushaiglastest (Salomoni, et al. 2017). Tulemused näitasid, et kaks tüve olid tundlikud nii nanoosakeste kui ka antibiootikumide suhtes vaid üks võetud haiglast tüvi näitas 100% resistentsust kõige 11 testitud antibiootikumi suhtes. Kui käsitleda aga sama tüve näitajaid nanoosakestega, siis on näha, et hõbeda kontsentratsioonidel 1,25 ja 0,156 µg/ml bakter oli püsivõimeline nanoosakeste vastu ja hõbeda kontsentratsioonil 5,0 µg/ml bakterikolooniate arv oluliselt vähenes. See tõestab seda, et nanoosakestel on tugevam antibakteriaalne toime resistentsete bakterite suhtes võrreldes antibiootikumidega. Arvestatakse, et põhjus on seotud hõbeda nanoosakeste ionide

vabastamisega, mis ladestuvad seejärel rakus ja piki rakuseina graanulitena, pärssides rakkude jagunemist, kahjustades rakumembraani- ja seina terviklikkust ning häirides raku sisu.

Kui võrrelda kaks *E. coli* bakterit erinevate tüvedega, siis on näha, et *E. coli*-l K-12 on madalam MBC kui *E. coli* ESBL-il vaid nende K(AbS)-id olid peaaegu võrdsed. See tähendab, et *E. coli* ESBL resistentsus antibiootikumide suhtes ei mõjutanud oluliselt nanoosakeste antibakteriaalse koosmõju ja mõlemad *E. coli* tüved näitasid sarnased tulemused.

Kui võrrelda bakterite elulisust gram-värvimise parameetri järgi, siis on näha, et kõrgeim nanoosakeste antibakteriaalse koosmõju koefitsient oli grampositiivse bakteri puhul *E. faecalis* ja madalaim koefitsient oli gramnegatiivse bakteri puhul *P. aeruginosa*. Vaatamata sellele aga ei saa täpselt konstateerida, et nanoosakeste koosmõju sõltub gram-värvimisest, kuna teised bakterid ei näidanud nii üksühesed tulemused.

## Kokkuvõte

Käesoleva töö peamiseks eesmärgiks oli iseloomustada hõbeda ja vase nanoosakeste vahel tekkivat koosmõju. Lisaks oli vaja välja selgitada, milliste bakterite puhul hõbeda ja vase nanoosakeste vahel tekkiv koosmõju on kõrgem ja miks.

Selleks kasutati antud töös erinevaid katmata ja kaetud CuO ja Ag nanoosakesed. Samuti kontrolliiks kasutati vasesoola ( $\text{CuSO}_4$ ) ja hõbenitraadi ( $\text{AgNO}_3$ ). Nanoosakeste toksilisuse mõõtmiseks valiti 5 erinevat bakterit: *E. coli* K-12, *E. coli* ESBL (kõrge resistentsusega bakter), *P. aeruginosa* PAO1, *S. aureus* ATCC 25923 ja *E. faecalis* ATCC 29212, mis on tuntud oma kõrge patogeensusega.

Töö peamised järeldused on järgmised:

1. Hõbeda ja vase nanoosakeste vahel tekib sünergia ja nende antibakteriaalne toime suureneb vähemalt kahekordselt.
2. Kõige parem koosmõju on negatiivselt laetud Ag-col-i ja positiivselt laetud CuO-NH<sub>2</sub> nanoosakeste vahel. Tõenäoliselt see toimub sellepärast, et moodustab negatiivselt laetud Ag-col koos positiivselt laetud CuO-NH<sub>2</sub>-ga komposiidi positiivsema laenguga ning seetõttu kergemini liigub negatiivselt laetud bakteri membraanile.
3. Kõige suurem vase ja hõbeda nanoosakeste koosmõju koefitsient oli grampositiivse *E. faecalis* bakterite puhul ja kõige madalam koefitsient oli gramnegatiivse *P. aeruginosa* bakteri puhul.

Kokkuvõtteks võib öelda, et hõbeda ja vase nanoosakeste segu võib tulevikus saada efektiivseks ravimiks bakteriaalsete infektsioonide vastu. Nanoosakeste komponentide mõju segus bakteritele on palju efektiivsem võrreldes üksikute nanoosakestega.

Käesoleva töö tulemused kinnitavad edasiste uuringute tähtsust nanoosakeste kasutamise kohta antibakteriaalsete ainetena. Järgmised uuringud võiksid olla seotud nanoosakeste ohutu kontsentratsioonide määramisega inimese rakkudele. Lisaks võiks uurida hõbeda ja vase nanoosakeste koosmõju teiste nanoosakestega ning leida kõige efektiivsemat ja turvalisemat kombinatsiooni bakteriaalsete infektsioonide vastu.

## Abstract

Bacterial infections can cause serious health issues. Excessive use of antibiotics as the main mean of protection has led to the development of multidrug-resistant strains. That is why the scientific community is paying more and more attention to nanoparticles, which due to their unique physical and chemical properties, could become an excellent alternative to antibiotics.

Some nanoparticles, including silver and copper, has been known for their antimicrobial properties and actively used in many industrial and household products. Recent studies, including studies by reseachers at the Institute of Chemical and Biological Physic showed a synergistic antibacterial effect between silver and some transition metal salts. This synergistic effect is crucial for the development of new, more effective nanoparticle-based solutions.

The interaction between different uncoated and coated CuO and Ag nanoparticles has been researched in this work. Copper salt ( $\text{CuSO}_4$ ) and silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) were used as controls. To measure the toxicity of nanoparticles, 5 different classes of bacteria known for their high pathogenicity, were selected. The main aim was to characterize and quantify the interaction between silver and copper nanoparticles.

In the course of the work, it was found that the combinations of copper and silver nanoparticles have significantly higher toxicity against all tested bacteria strains comparing to individual nanoparticles. The toxicity of the nanoparticle mixture was up to 6 times higher than the sum of the toxicity of the individual components. Particularly high synergy with silver nanoparticles was determined with positively charged copper nanoparticles and copper salt ( $\text{CuSO}_4$ ). The highest toxicity was determined against gram-positive bacteria *E. faecalis* and the lowest against gram-negative *P. aeruginosa*.

The results of this work confirm the importance of further research on the use of nanoparticles as antibacterial agents.

## **Tänuavaldused**

Bakalaureusetöö oli läbi viidud Keemilise Füüsika ja Biofüüsika Instituudi (KBFI) toetusel, Keskkonnatoksikoloogia Laboris.

Olen siiralt tänulik minu juhendajatele Grigory Vasiliev ja Olesja Bondarenko nende toetuse, pädevuse, kannatlikkuse, kasulikkude nõuannete ja positiivse suhtumise eest.

Samuti tänan kõike KBFI töötajaid nende abi ja sõbralikkuse eest.

## Kasutatud kirjandus

- Bankier, C., R. K. Matharu, Y. K. Cheong, G. G. Ren, E. Cloutman-Green, L. Ciric. 2019. «Synergistic Antibacterial Effects of Metallic Nanoparticle Combinations.» *Scientific Reports*.
- Bapat, R.A., T.V. Chaubal, C.P. Joshi. 2018. „An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry.“ *Mater Sci Eng C*. 2018;91:881–898.
- Bihari, P., M. Vippola, S. Schultes, M. Praetner, A. Khandoga, C. Reichel, C. Coester, T. Tuomi, M. Rehberg, F. Krombach. 2008. «Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies.» *Part. Fibre Toxicol*. 5.
- Blinova, Irina et al. 2013. „Toxicity of Two Types of Silver Nanoparticles to Aquatic Crustaceans Daphnia Magna and Thamnocephalus Platyurus.“ *Environmental Science and Pollution Research* 20(5): 3456–63.
- Blount, Z. D. 2015. «The Natural History of Model Organisms: The unexhausted potential of E. coli.» *eLife*.
- Bondarenko, O., A. Ivask, A. Käkinen, A Kahru. 2012. «Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action.» *Environmental Pollution*. 169:81-89.
- Buzea, C., I. I. Pacheco, K. Robbie. 2007. „Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity.“ *Biointerphases*.
- Calderón-Jiménez, Bryan, Monique E. Johnson, Antonio R. Montoro Bustos, Karen E. Murphy, Michael R. Winchester, Vega José R. Baudrit. 2017. «Silver Nanoparticles: Technological Advances, Societal Impacts, and Metrological Challenges.» *Frontiers in Chemistry*.
- Cannon, Mary D., Paul Matrin, Andres F. Carrion. 2020. «Bacterial Infection in Patients with Cirrhosis: Don't Get Bugged to Death.» *Dig Dis Sci*.Jan;65(1):31-37.
- Cavassin, E.D., L.F.P. Figueiredo, J.P. Otoch, M.M. Seckler, Oliveira R.A., F.F. Franco, V.S. Marangoni, V. Zucolotto, A.S.S. Levin, S.F. Costa. 2015. «Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria.» *J. Nanobiotechnol*.

- Chen, J., S. Li, J. Luo, R. Wang, W. Ding. 2016. «Enhancement of the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles against Phytopathogenic Bacterium *Ralstonia solanacearum* by Stabilization.» *J. Nanomater.*
- Cheng, G., M. Dai, S. Ahmed, H. Hao, X. Wang, Z. Yuan. 2016. «Antimicrobial drugs in fighting against antimicrobial resistance.» *Front. Microbiol.*
- Cho, W.S., R. Duffin, F. Thielbeer, M. Bradley, I.L. Megson, W. Macnee, C.A. Poland, C.L. Tran, K. Donaldson. 2012. «Zeta potential and solubility to toxic ions as mechanisms of lung inflammation caused by metal/metal oxide nanoparticles.» *Toxicol Sci.*, 469-477.
- Choi, O., K. K. Deng, N. J. Kim, L. Ross, R. Y. Surampalli, Z. Q. Hu. 2008. «The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth.» *Water Res.*, 42 (12) 3066–3074.
- Clogston, J., A. Patri. 2011. „Characterization of nanoparticles intended for drug delivery.“ *Humana Press*, 63-70.
- Cronholm, P., K. Midander, H. Karlsson, K. Elihn, I. Wallinder, L. Möller. 2011. «Effect of sonication and serum proteins on copper release from copper nanoparticles and the toxicity towards lung epithelial cells.» *Nanotoxicology* 5, 269-281.
- Domínguez, Vila A., Ayerbe R. Algaba, Miró A. Canturri, Rodríguez Á. Villodres, Y. Smani. 2020. «Antibacterial Activity of Colloidal Silver against Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria.» *Antibiotics (Basel)*.
- Dupont, Christopher L., a Gregor Grassb, Christopher Rensing. 2011. «Copper toxicity and the origin of bacterial resistance—new insights and applications.» *Metallomics* 3, 1109–1118.
- Durán, N., G. Nakazato, A. Seabra. 2016. „Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments.“ *Appl Microbiol Biotechnol*;100(15):6555–6570.
- E.Z., Goma. 2017. «Silver nanoparticles as an antimicrobial agent: A case study on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as models for Gram-positive and Gram-negative bacteria.» *J. Gen. Appl. Microbiol.*
- El Badawy, A.M., R.G Silva, B. Morris, K.G. Scheckel, M.T. Suidan, T.M. Tolaymat. 2011. «Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles.» *Environ. Sci. Technol.* 45, 283-287.
- Garza-Cervantes, Javier A., Arturo Chávez-Reyes, Elena C. Castillo, Gerardo García-Rivas, Oscar Antonio Ortega-Rivera, Eva Salinas, M. Ortiz-Martínez. 2017. «Synergistic Antimicrobial Effects of Silver/Transition-metal Combinatorial Treatments.» *Scientific Reports*.



- Gawande, Manoj B., Anandarup Goswami, Francois-Xavier Felpin, Tewodros Asefa, Xiaoxi Huang, Rafael Silva, Xiaoxin Zou, Radek Zboril, Rajender S. Varma. 2016. «Cu and Cu-Based Nanoparticles: Synthesis and Applications in Catalysis.» *Chem. Rev.*, 3722-3811.
- Greulich, C., D. Braun, A. Peetsch, J. Diendorf, B. Siebers, M. Epple, M. Köller. 2012. «The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range.» *RSC Advances*, 2(17), 6981.
- Idalia, VM. N., F. Bernardo. 2017. „Escherichia coli as a Model Organism and Its Application in Biotechnology.“ *Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*.
- ISO/TS 27687. 2008. «Terminology and definitions for nano-objects: nanoparticle, nanofibre and nanoplate.»
- Ivask A., Elbadawy A., Kaweeteerawat C., Boren D., Fischer H., Ji Z., Chang C.H., Liu R., Tolaymat T., Telesca D., et al. 2014. «Toxicity mechanisms in Escherichia coli vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver.» *ACS Nano*.
- Javed, R., M. Ahmed, ul I. Haq, S. Nisa, M. Zia. 2017. «PVP and PEG doped CuO nanoparticles are more biologically active: Antibacterial, antioxidant, antidiabetic and cytotoxic perspective.» *Mater. Sci. Eng. C* 79, 108-115.
- Jiang, J., G. Oberdörster, P. Biswas. 2008. „Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies.“ *Journal of Nanoparticle Research*, 77-89.
- Jiang, W., B.Y. Kim, J.T. Rutka, W.C. Chan. 2008. «Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent.» *Nat Nanotechnol.*, 145-150.
- Jo, D.H., J.H. Kim, T.G. Lee, J.H. Kim. 2015. «Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases.» *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, 1603-1611.
- Johnston, H., G. Pojana, S. Zuin, N. Jacobsen, P. Moller, S. Loft, M. Semmler-Behnke. 2013. «Engineered nanomaterial risk. Lessons learnt from completed nanotoxicology studies: potential solutions to current and future challenges.» 1-20.
- Khan, Ibrahim, Saeed Khalid, Khan Idrees. 2017. „Nanoparticles: properties, applications and toxicities.“ *Arabian Journal of Chemistry*.
- Khorrami, S., A. Zarrabi, M. Khaleghi, M. Danaei, M Mozafari. 2018. «Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties.» *Int J Nanomedicine* ;13:8013–8024.

- Kubo, Anna-Liisa et.al. 2020. „Surface Carboxylation or PEGylation Decreases CuO Nanoparticles' Cytotoxicity to Human Cells in Vitro without Compromising Their Antibacterial Properties.“ *Archives of Toxicology* 94(5): 1561–73.
- Kudrinskiy, A. A., A. Yu. Ivanov, E. V. Kulakovskaya, A. I. Klimov, P. M. Zherebin, D. V. Khodarev, Anh-Tuan Le, Le Thi Tam, G. V. Lisichkin, and Yu. A. Krutyakov. 2014. “The Mode of Action of Silver and Silver Halides Nanoparticles against *Saccharomyces cerevisiae* Cells.” *Volume* 2014.
- Kurvet, Imbi et.al. 2013. «Particle-Cell Contact Enhances Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles.» 8(5).
- Labhasetwar, V., D.L. Leslie-Pelecky. 2007. „Nanotoxicology, in: Biomed. Appl. Nanotechnol.“ *John Wiley & Sons. Inc*, 227-249.
- Lee, Nan-Yao, Wen-Chien Ko, Po-Ren Hsueh. 2019. „Nanoparticles in the Treatment of Infections Caused by Multidrug-Resistant Organisms.“ *Front Pharmacol.* 2019; 10: 1153.
- Leimbach, A., J. Hacker, U. Dobrindt. 2013. „E. coli as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity.“ *Curr Top Microbiol Immunol.*
- Li W.R., Xie X.B., Shi Q.S., Zeng H.Y., Ou-Yang Y.S., Chen Y. Ben. 2010. «Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*.» *Appl. Microbiol. Biotechnol.* .
- Líbalová, H., P.M. Costa, M. Olsson, L. Farcas, S. Ortelli, M. Blosi, J. Topinka, A.L. Costa, B. Fadeel. 2018. «Toxicity of surface-modified copper oxide nanoparticles in a mouse macrophage cell line: Interplay of particles, surface coating and particle dissolution.» *Chemosphere.* 196.
- Lin, X., J. Li, S. Ma, G. Liu, K. Yang, M. Tong, D. Lin. 2014. «Toxicity of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles to *Escherichia coli*: Effects of Particle Size, Crystal Phase and Water Chemistry.» *PLoS ONE* 9(10): e110247.
- Linlin Wang, Chen Hu, Longquan Shao. 2017. «The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future.» *Volume* 2017:12 , 1227-1249.
- Lu, Z., K. Rong, J. Li, H. Yang, R. Chen. 2013. «Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria.» *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1465-1471.
- Mahmoodi, Shirin, Asghar Elmi, Somayeh Hallaj-Nezhadi. 2018. „Copper Nanoparticles as Antibacterial Agents.“ *Mahmoodi et al., J Mol Pharm Org Process Res* 2018, 6:1.
- Marradi, M., F. Chiodo, I. García, S. Penadés. 2013. «Glyconanoparticles as multifunctional and multimodal carbohydrate systems.» *Chem. Soc. Rev.* 42, 4728-4745.

- Meißner, T., K. Oelschlägel, A. Potthoff. 2014. „Dispersion of nanomaterials used in toxicological studies: a comparison of sonication approaches demonstrated on TiO<sub>2</sub> P25.“ *J. Nanopart. Res.* 16.
- Mourdikoudis, Stefanos, Roger M. Pallares, Nguyen T. K. Thanh. 2018. «Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties.» *Nanoscale* 10, 12871-12934.
- Murdock, R.C., L. Braydich-Stolle, A. M. Schrand, J. J. Schlager, S. M. Hussain. 2007. «Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique.» *Toxicological Sciences.* 101 (2), 239-253.
- Niemeyer, C.M. 2001. «Nanoparticles, Proteins, and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science.» *Angewandte Chemie International Edition* 40.
- Parvekar, P, J Palaskar, S Metgud, S. Dutta. 2020. «The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*.» *Biomater Investig Dent.*, 105-109.
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B. 2012. «Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world.» *J Nanopart Res* 14/9.
- Pons, T., H.T. Uyeda, I.L. Medintz, H. Mattoussi. 2006. «Hydrodynamic dimensions, electrophoretic mobility, and stability of hydrophilic quantum dots.» *J Phys Chem B.*
- Raffi, M., S. Mehrwan, T.M. Bhatti, J.I. Akhter, A. Hameed. 2010. «Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*.» *Ann Microbiol* 60: 75-80.
- Ray, P.C. 2011. «Size and Shape Dependent Second Order Nonlinear Optical Properties of Nanomaterials and Its Application in Biological and Chemical Sensing.» *Chem Rev.* 110 , 5332-5365.
- Salomoni, R., P. Léo, A.F. Montemor, B.G. Rinaldi, M. Rodrigues. 2017. *Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*.*
- Seil J.T., Webster T.J. 2012. «Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature.» *Int. J. Nanomed.*
- Silva, L.P., A.P. Silveira, C.C. Bonatto, I.G. Reis, P.V. Milreu. 2017. «Nanostructures for Antimicrobial Therapy: Nanostructures in Therapeutic Medicine Series.» *Silver Nanoparticles as Antimicrobial Agents: Past, Present, and Future*, 577-596.
- Theuretzbach, U., K. Outtersson, A. Engel, A. Karlén. 2020. „The global preclinical antibacterial pipeline.“ *Nat Rev Microbiol*, 275-285.

- Thibault G. Sanaa, Christoph Baumannb, Andreas Merdesc, Chantal Sosciaa, Thomas Ratteid, Abderrahman Hachania,e, Cerith Jonese, Keiryn L. Bennettb, Alain Fillouxe, Giulio Superti-Furgab, Romé Voulhouxa, Sophie Blevesa. 2015. «Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 into Epithelial Cells Is Promoted by Interaction of a T6SS Effector with the Microtubule Network.» *ASM Journals, mBio*.
- Vance, M. E., T. Kuiken, E. P. Vejerano, S. P. McGinnis, M. F. Hochella, D. Rejeski, M. S. Hull. 2015. «Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory.» *Beilstein Journal of Nanoechnology. 6: 1769-1780*.
- Wang, James, Michael Woo, Chris Yan. 2017. „Spot Plating Assay for the Determination of Survival and Plating Efficiency of *Escherichia coli* in sub-MIC Levels of Antibiotics.“ *JEMI METHODS*.
- Wang, L., C. Hu, L. Shao. 2017. „The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future.“ *Int. J. Nanomed., 1227-1249*.
- Warnes, S.L., V. Caves, CW. Keevil. 2012. „Mechanism of copper surface toxicity in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* involves immediate membrane depolarization followed by slower rate of DNA destruction which differs from that observed for Gram-positive bacteria.“ *Environ Microbiol. 2012 Jul;14(7), 1730-1743*.
- Yaqoob, A.A., K. Umar, M.N.M Ibrahim. 2020. „Silver nanoparticles: Various methods of synthesis, size affecting factors and their potential applications.“ *Appl. Nanosci*.
- Yin, Iris Xiaoxue, Jing Zhang, Irene Shuping Zhao, May Lei Mei, Quanli Li, Chun Hung Chu. 2020. «The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry.» *International Journal of Nanomedicine 2020:15, 2555–2562*.