



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Kotryna Čekuolytė

Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programa

Magistro darbas

**Sidabro nanodalelių, gautų po *Geobacillus* genties bakterijų indukuotos  
sintezės, priešmikrobinio poveikio analizė**

Darbo vadovė

doc. dr. Eglė Lastauskienė

VILNIUS

2019

Sidabro nanodalelių, gautų po *Geobacillus* genties bakterijų indukuotos sintezės,  
priešmikrobinio poveikio analizė

**Darbas atliktas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų instituto  
Eukariotų molekulinės mikrobiologijos laboratorijoje**

**Darbą atliko:**

**Kotryna Čekuolytė**

**Darbo vadovė:**

**doc. dr. Eglė Lastauskienė**

## TURINYS

Santrumpos .....	5
ĮVADAS .....	6
1. Literatūros apžvalga .....	8
1.1. Odos mikrobiota .....	8
1.2. Odos patogenai .....	10
1.3. Mikrobiotos sąveika su patogenais .....	11
1.4. Bakterijų atsparumas antibiotikams.....	13
1.5. Mielių atsparumas priešgrybeliniams junginiams .....	15
1.6. Alternatyvų antibiotikams paieška .....	16
1.7. Sidabro nanodalelių antimikrobinio veikimo mechanizmas .....	18
1.8. Sidabro nanodalelių aktyvumas bioplėvelių formavimuisi .....	20
1.9. Sidabro nanodalelių gavimo būdai .....	21
1.9.1. Cheminiai sidabro nanodalelių gavimo metodai.....	21
1.9.2. Fizikiniai sidabro nanodalelių gavimo metodai .....	21
1.9.3. Biologinė sidabro nanodalelių sintezė .....	22
1.9.3.1. Bakterijų pritaikymas sidabro nanodalelių gavimui.....	24
1.9.3.2. Grybelių pritaikymas sidabro nanodalelių gavimui .....	25
1.9.3.3. Augalų pritaikymas sidabro nanodalelių gavimui.....	26
1.10. Sidabro nanodalelių antimikrobinio veikimo tyrimai .....	26
2. Medžiagos ir metodai .....	29
2.1. Darbe naudoti mikroorganizmų kamieniai .....	29
2.2. Darbe naudotos medžiagos.....	29
2.3. Darbe naudoti terpės ir buferiai .....	30
2.4. Metodai .....	31
2.4.1. Užląstelinis sidabro nanodalelių susidarymas .....	31
2.4.2. Sidabro nanodalelių antimikrobinio poveikio įvertinimas .....	31
2.4.3. <i>Candida lusitaniae</i> pseudohifų formos paruošimas .....	31
2.4.4. Lašelių testas sidabro nanodalelių MIK nustatymui .....	32
2.4.5. Sidabro nanodalelių poveikis mikroorganizmų augimui.....	33
2.4.5.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> augimo vertinimas laike .....	33
2.4.5.2. <i>Candida lusitaniae</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. lusitaniae</i> pseudohifų <i>Staphylococcus aureus</i> ir <i>Streptococcus pyogenes</i> augimo vertinimas laike .....	33
2.4.6. Sidabro nanodalelių ir elektroporacijos sinergistinio poveikio įvertinimas <i>Candida lusitaniae</i> ir <i>C. guilliermondii</i> mielėms .....	33

2.4.7. Sidabro nanodalelių ir elektroporacijos sinergistinio poveikio <i>C. lusitaniae</i> vizualizacija SEM.....	34
3. Rezultatai ir jų aptarimas.....	35
3.1. <i>Geobacillus</i> sp. bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų sidabro nanodalelių MIK nustatymas prieš odos patogenus lašelių metodu .....	35
3.2. <i>Geobacillus</i> sp. bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų sidabro nanodalelių antimikrobinio poveikio įvertinimas .....	38
3.2.1. Sidabro nanodalelių antimikrobinio poveikio <i>Candida</i> mielėms įvertinimas.....	38
3.2.2. Sidabro nanodalelių antibakterinio poveikio įvertinimas.....	39
3.3. <i>Geobacillus</i> sp. bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų AgNDų antimikrobinio poveikio dinamikos įvertinimas .....	42
3.4. AgNDų ir elektroporacijos sinergistinio poveikio mielių ląstelėms įvertinimas .....	48
Išvados.....	52
Santrauka .....	53
Summary.....	54
Literatūros sąrašas .....	55

## Santrumpos

AFM – atominės jėgos mikroskopija;

AgNDs – sidabro nanodalelės;

aps/min – apsisukimai per minutę;

DLS – dinaminės šviesos sklaida;

EDX – energijos dispersinė rentgeno spektroskopija;

FTIR – infraraudonųjų spindulių spektroskopija;

YPD – mielių ekstrakto-peptono-dekstrozės mitybinė terpė;

KFV – kolonijas formuojantys vienetai;

LB – Luria – Bertani mitybinė terpė;

MIK – minimali inhibicinė koncentracija;

NDs – nanodalelės;

OT – optinis tankis;

PBS – fosfatinis buferinis tirpalas;

ROS – aktyviosios deguonies formos (angl. *reactive oxygen species*);

SEM – skenuojanti elektroninė mikroskopija;

TEM – transmisinė elektroninė mikroskopija;

UV – ultravioletiniai spinduliai;

XRD – rentgeno spindulių difrakcija.

## ĮVADAS

Didėjantis bakterijų ir mielių sukeltamų odos infekcijų skaičius bei augantis mikroorganizmų atsparumas antimikrobinėms medžiagoms yra susirūpinimą keliančios problemos, kurios skatina mokslininkus ieškoti naujų efektyvių antimikrobinių junginių (Liu et al., 2015). Jau nuo senų laikų yra žinoma apie tam tikrų metalų, pavyzdžiui sidabro, antimikrobinį poveikį, todėl metalų nanodalelės gali tapti viena iš alternatyvų dabar naudojamiems antimikrobiniams preparatams. Tarp metalų nanodalelių, sidabro nanodalelės pasižymi vienomis geriausių antimikrobinių savybių (Dakal et al., 2016). Sidabro nanodalelių (AgNDs) antimikrobinės savybės priklauso nuo jų dydžio, paviršiaus modifikacijų ir mikroorganizmo, kuris yra veikiamas, rūšies (Lara et al., 2011). Priešingai nei antibiotikai, sidabro nanodalelės pasižymi kompleksiniu veikimu prieš mikroorganizmus, todėl šiems yra sunkiau įgyti atsparumo mechanizmus (Slavin et al., 2017).

Šiuo metu pagrindiniai metodai metalų, tarp kurių ir sidabro, nanodalelėms gauti yra cheminiai ir fizikiniai, tačiau šie metodai yra brangūs, reikalauja didelių energijos sąnaudų ir nedraugiški aplinkai (Wiley et al., 2005). Dėl šios priežasties mokslininkai yra susidomėję biologine AgNDų sinteze, kaip ekonomiška, aplinką tausojančia alternatyva, kadangi šiam metodui atlikti nereikia aukštų temperatūrų, o proceso metu nesusidaro toksinės atliekos. Biologinei sintezei atlikti galima pasitelkti augalus ir mikroorganizmus. Nustačius optimalias sąlygas ląstelių augimui ir fermento aktyvumui, įvertinus optimalias reakcijos sąlygas, biologinė sintezė tampa nesudėtingu metodu, leidžiančiu gauti itin stabilias AgNDs (Iravani et al., 2014).

Šiame darbe analizuojamas *Geobacillus* sp. genties bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų AgNDų antimikrobinis poveikis prieš odos patogenus: *Candida lusitaniae*, *C. guilliermondii* mieles, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* bakterijas. Taip pat nustatomas ir AgNDų poveikis prieš *C. lusitaniae* pseudohifų formą, kuri pasižymi didesniu atsparumu priešgrybelinei terapijai. Be to, šio darbo metu nustatytas sinergistinis AgNDų ir elektroporacijos poveikis *C. lusitaniae* ir *C. guilliermondii* mielių ląstelėms.

**Darbo tikslas:** nustatyti biosintezės būdu gautų sidabro nanodalelių (*Geobacillus* sp. 18, 25, 95, 612) antimikrobinį poveikį prieš mediciniškai svarbius mikroorganizmus (*Candida lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*).

**Darbo uždaviniai:**

1. Nustatyti keturių *Geobacillus* sp. kamienų sintetinamų AgNDų MIK;
2. Nustatyti, kurios iš keturių *Geobacillus* sp. kamienų sintetintos AgNDs stabdo *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* augimą;
3. Įvertinti *Geobacillus* sp. sintetinamų AgNDų antimikrobinio poveikio prieš odos patogenus dinamiką;
4. Nustatyti AgNDų ir elektroporacijos sinergistinį poveikį *C. lusitaniae* ir *C. guilliermondii* mielių ląstelėms.

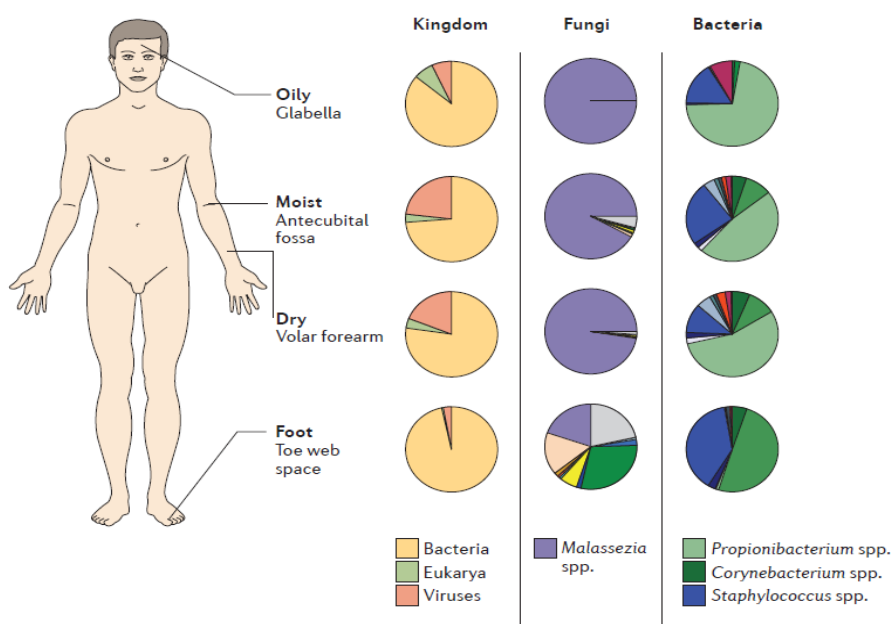
# 1. Literatūros apžvalga

## 1.1. Odos mikrobiota

Oda – didžiausias žmogaus organas, kuris yra kolonizuotas mikroorganizmais: bakterijomis, grybeliais ir virusais. Šie mikroorganizmai sudaro odos mikrobiotą, kuri sudaro fizinį barjerą, apsaugantį žmogaus organizmą nuo patogenų (Scharschmidt ir Fischbach, 2013). Žmogaus odos sritys gali būti suskirstytos pagal jų fiziologines savybes, tai yra, ar jos yra riebaluotos, drėgnos ar sausos. Mikrobiotos sudėties tyrimai skirtingose odos srityse vertingi odos sutrikimų, kurie dažnai pasireiškia tam tikrose specifinėse odos srityse, pavyzdžiui, egzema pasireiškia alkūnės vidinėje dalyje, o žvynelinė – išorinėje, etiologijos supratimui (Kong et al., 2012).

Mikrobinės bendruomenės sudėtis daugiausiai priklauso nuo odos srities fiziologijos. Mikroorganizmų įvairovė skirtingose odos srityse pateikta (**1.1. pav.**). Riebaluotose odos srityse dominuoja lipofilinė *Propionibacterium* rūšys, tuo tarpu drėgnose odos srityse, tokiose kaip alkūnės ir pėdos, dominuoja *Staphylococcus* ir *Corynebacterium* rūšių bakterijos (Oh et al., 2014). Skirtingai nei bakterijų atveju, grybelių bendruomenės sudėtis buvo panaši visose liemens srityse, nepriklausomai nuo odos fiziologijos. Šioje kūno odos srityje dominuoja *Malassezia* genties grybeliai. Priešingai liemens srities atveju, pėdos kolonizuotos didesne įvairove grybelių rūšių: *Malassezia* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Epicoccum* spp. ir kitomis (Findley et al., 2013). Bakterijos gausiausiai kolonizuoja įvairias odos sritis, o grybeliai kolonizuoja mažiau, net ir atsižvelgus į tai, kad pėdose jų įvairovė didžiausia. Ilgalaikiai mikrobiotos tyrimai parodė, kad odos mikroorganizmų bendruomenė išlieka pakankamai stabili stebint ją dvejus metus, net ir esant aplinkos pokyčiams (Oh et al., 2016). Tyrimų duomenimis, riebaluotose odos srityse bakterinės ir grybelinės bendruomenės yra stabiliausios, o pėdų srityje – mažiausiai stabilios (Hannigan et al., 2015).





**1.1. pav.** Odos mikrobiotos sudėties pasiskirstymas skirtingose kūno odos srityse. Išskiriamos keturios odos sritys, reprezentuojančios skirtingas odos fiziologijas: kakta (riebaluota), alkūnės vidinė sritis (drėgna), dilbis (sausas) ir pėdos (pagal Byrd et al., 2018).

Oda turi ženkliai mažiau maistinių medžiagų, nei jomis turtingiausia žmogaus organizmo dalis – žarnynas. Kad galėtų išgyventi tokioje vėsioje, rūgštinėje ir sausoje aplinkoje, odos mikrobiotos gyventojai prisitaikė utilizuoti maistinius šaltinius, kurių yra prakaite, odos išskiriamuose riebaluose ir raginiame odos sluoksnyje. Pavyzdžiui, fakultatyvinis anaerobas *Propionibacterium acnes* gali klestėti anoksinėse riebalinėse liaukose, naudodamas proteazes, kad iš odos baltymų galėtų gauti aminorūgštis arginino (Holland et al., 1979), ir lipazes, kad degraduotų odos riebalų trigliceridus (Bruggemann et al., 2004). Veido sritys mėginiuose, riebalų kiekis skruostuose tiesiogiai koreliavo su *Propionibacterium* spp. gausa (Mukherjee et al., 2016). Auksotrofiniai *Malassezia* ir *Corynebacterium* genčių atstovai patys negali gamintis lipidų, todėl šie taip pat prisitaikė utilizuoti odos lipidus. Skaidydami lipidus, *Corynebacterium* bakterijų genties atstovai gamina rūgštis, kuriomis gaubia savo ląstelių paviršių. *Staphylococcus* spp. taip pat turi įvairias strategijas, leidžiančias išgyventi ant odos paviršiaus. Šios bakterijos yra halotolerantinės ir geba utilizuoti prakaite esančią urėją kaip azoto šaltinį. Kolonizacijos skatinimui, įvairios *Staphylococcus* spp. rūšys gali gaminti adherinus, kurie skatina prisitvirtinimą prie odos paviršiaus, ir proteazes, kurios leidžia pasiimti maistinių medžiagų iš raginio odos sluoksnio (Scharschmidt ir Fischbach, 2013). Apibendrinus, odos gyventojai yra heterogeninė mikroorganizmų grupė, kurių kiekvienas turi prisitaikyti, kad galėtų išgyventi ant odos (Byrd et al., 2018).

## 1.2.Odos patogenai

Mikrobiotos narių tarpusavio sąveika formuoja mikrobine bendruomenę odoje ir apsaugo nuo patogeninių bakterijų kolonizacijos. Šis reiškinys vadinamas „atsparumas kolonizacijai“ (Buffie ir Pamer, 2013). Tačiau esant tam tikroms sąlygoms, bakterijos, kurios yra naudingos šeimininkui, gali tapti jam patogeninės. Dauguma odos ligų yra siejamos su mikrobiotos pakitimais – disbioze (Iebba et al., 2016). Disbiozė dažnai yra skatinama įprastų komensalinių rūšių. Manoma, kad tiek reti, tiek dažni odos sutrikimai atsiranda dėl atskirų rūšių ir dėl pokyčių mikrobine bendruomenėje (Byrd et al., 2018).

*Staphylococcus aureus* yra viena dažniausių odos infekcijų sukėlėjų (de Kraker et al., 2013). *S. aureus* yra gramteigiama, koko formos bakterija, priklausanti *Firmicutes* tipui. Įprastai, ši bakterija yra mikrobiotos dalis, dažniausiai randama viršutiniuose kvėpavimo takuose ir ant odos. Nors *S. aureus* yra komensalinis žmogaus mikrobiotos mikroorganizmas, atsiradus odos pažeidimams ar mikrobiotos pakitimams, ši bakterija gali tapti oportunistiniu patogenu, sukeldama odos infekcijas, tokias kaip abscesas (Masalha et al., 2001). Apie 50–60 % individų laikinai arba visam laikui yra kolonizuoti *S. aureus*, todėl yra gan didelė šios bakterijos sukeltų infekcijų rizika (Wertheim et al., 2005). Be to, jog ši bakterija yra itin paplitusi pasaulyje, *S. aureus* pasižymi gebėjimu įgyti atsparumą antibiotikams. *S. aureus* atsparumas antibiotikams pasiekė epidemijos lygį (Chambers ir Deleo, 2010).

Kitas odos ligų sukėlėjas yra *Streptococcus pyogenes*. *S. pyogenes* yra gramteigiama koko formos bakterija, priklausanti *Firmicutes* tipui. Nepaisant riboto paplitimo, lyginant su kitais patogenais, daugybė infekcijų, kurias sukelia *S. pyogenes*, yra mirtinos (Walker et al., 2014). *S. pyogenes* įprastai kolonizuoja pacientų gerkles ar odą. Streptokokų sukeltos infekcijos gali būti tiek lokaliai, pavyzdžiui, tonzilitas ar faringitas, tiek invazinės, pavyzdžiui, nekrozuojantis fascitas (Cunningham, 2000). Vis dažniau yra pranešama apie vaistams atsparius *S. pyogenes* kamienus visame pasaulyje (Walker, 2015).

Dar vienas dažnas odos ligų sukėlėjas yra *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* yra gramneigiama lazdelės formos bakterija, priklausanti *Proteobacteria* tipui. *P. aeruginosa* dažnai siejama su oportunistinėmis odos infekcijomis, tačiau taip pat randama ir sveikuose pacientuose. *P. aeruginosa* sukelia tiek lokalias odos ligas, tiek sisteminės gyvybei pavojingas ligas. Daugumai šio patogeno sukeltų infekcijų būdingi aiškūs simptomai (Wu et al., 2011). Tarp infekcijų, sukeltų gramneigiamų lazdelių, *P. aeruginosa* jų sukelia daugiausiai, ypač sunkiai sergantiems ar imunokompresiniams pacientams (El Zowalaty et al.,

2015). Šio patogeno atsparumas antimikrobinėms medžiagoms ženkliai susiaurina *P. aeruginosa* bakterijos sukeltamų ligų gydymą (Fujii et al., 2014).

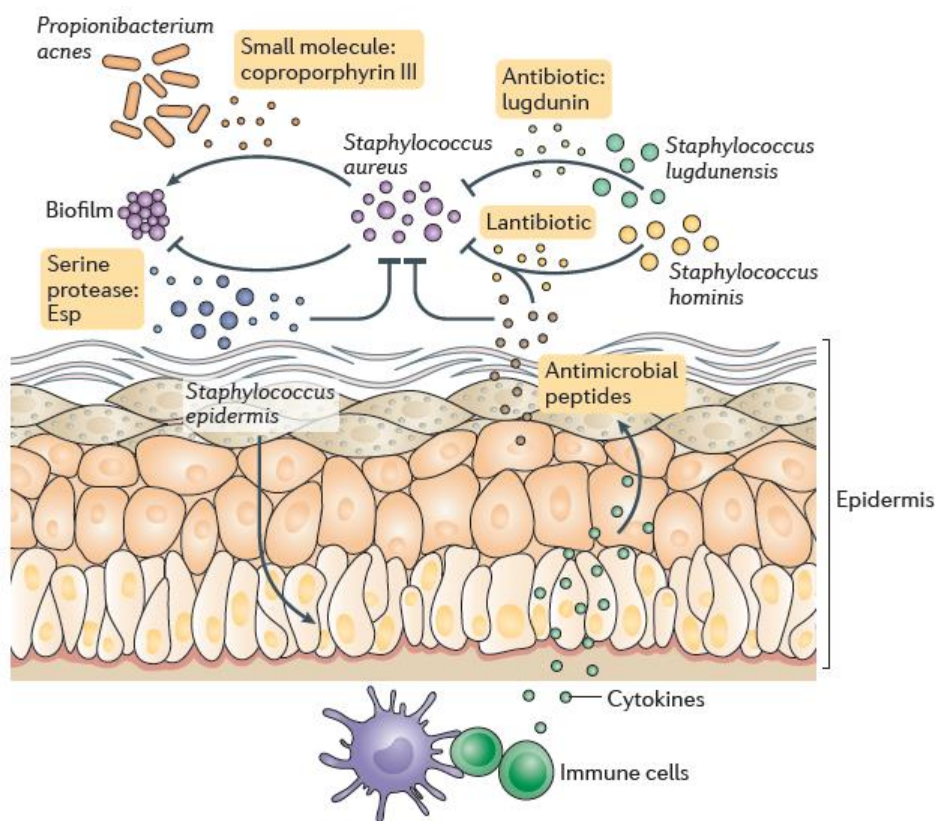
Nors ir grybeliai yra dalis komensalinės odos mikrobiotos, kai kurios rūšys taip pat yra ir patogeninės. Skaičiuojama, kad apie 20–25 % žmonių populiacijos pasaulyje yra paveikti grybelinių odos infekcijų (Havlickova et al., 2008). Grybeliniai odos patogenai gali būti suskirstyti į dvi grupes: dermatofitai ir mielės, kurioms priklauso *Candida* genties rūšys. Tarp 200 žinomų *Candida* rūšių, tik kelios, pvz., *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. lusitaniae* ir *C. guilliermondii* gali tapti patogeninės (Findley et al., 2013; Mohandas ir Ballal, 2011). *C. albicans* yra *Candida* rūšis, kuri dažniausiai siejama su simptominėmis odos infekcijomis (Havlickova et al., 2008). Dažniausi *Candida* odos infekcijų simptomai yra odos sustorėjimas ir raudonė (Kashem ir Kaplan, 2016).

Keletas fizinių ir imunologinių faktorių skatina *Candida* odos infekcijas. *Candida* teikia pirmenybę uždarams odos sritims, kur kaupiasi drėgmė ir CO<sub>2</sub>, o oda nuolat patiria trintį (Allen ir King, 1978). Pavyzdžiui, tokios sąlygos atsiranda naujagimiuose, dėvinčiuose sauskelnės, kur padidėjusio pH ir iš išmatų atsirandančių lipazių ir proteazių kombinacija dažniausiai priveda prie antrinių *Candida* infekcijų, kurias sukelia virškinamojo trakto *C. albicans*, kurios baigiasi sauskelnių dermatitu (Bonifaz et al., 2016). Pasikartojančios *Candida* sukeltos odos ir gleivinių paviršiaus infekcijos siejamos su chronine gleivinės kandidoze, kuri dažniausiai pasireiškia žmonėms su įgimtu ar įgytu imunodeficitu (Kashem ir Kaplan, 2016), po gydymo antibiotikais ar sužalojimais, kurie priklauso nuo individualių rizikos veiksnių, priklausomai nuo epitelio paviršiaus (Hofs et al., 2016). Padidėjusi *Candida* kolonizacija taip pat siejama su kitais odos sutrikimais, pavyzdžiui, atopiniu dermatitu ir žvyneline (Taheri Sarvtin et al., 2014).

### 1.3. Mikrobiotos sąveika su patogenais

Mikroorganizmų bendruomenės sudėtis, stabilumas ir funkcijos yra palaikomos šeimininko faktoriais bei sąveikomis tarp šių mikroorganizmų. Mikroorganizmai gali veikti konkurencingai, kad pašalintų vieni kitus, arba priešingai, sinergistiškai, dėl abipusės naudos. Mikrobiotos narių tarpusavio sąveika formuoja mikrobinę bendruomenę odoje ir apsaugo nuo patogeninių bakterijų kolonizacijos. Šis reiškinys vadinamas „atsparumas kolonizacijai“ (Buffie ir Pamer, 2013). Odos atveju, *Staphylococcus aureus* yra vienas pagrindinių atsparumo kolonizacijai tyrimų objektų. *S. aureus* kolonizuoja trečdalis populiacijos nosies šnerves, o jo buvimas yra siejamas su didele infekcijų rizika (Weidenmaier et al., 2012).

Kadangi *S. aureus* bakterijos dažnai turi atsparumą antibiotikams (Miller, 2010), o vakcinos kūrimas parodė žemą efektyvumą (Jansen et al., 2013), alternatyvios bakterijos šalinimo strategijos, ypač tos, kurios susijusios su komensaliniais mikroorganizmais, yra aktyviai tiriamos (Pamer, 2016). Pirmasis mikroorganizmas, kuris buvo identifikuotas kaip inhibuojantis *S. aureus* bioplėvelių formavimąsi odoje, buvo *S. epidermidis* kamienai, kurie išskiria serino proteazes (Ling et al., 2015). Šios proteazės suardo *S. aureus* baltymus, kurie yra itin svarbūs bioplėvelės formavimuisi ir adhezijai prie šeimininko epitelio (Sugimoto et al., 2013). Kai proteazių aktyvumas buvo derinamas su antimikrobinu  $\beta$ -defensino aktyvumu, atsiradęs baktericidinis aktyvumas buvo pakankamas, kad sunaikintų bioplėvelėse esančią *S. aureus* (1.2. pav.) (Iwase et al., 2010).



**1.2. pav.** Odos komensalų sąveika su *Staphylococcus aureus*. Odoje identifikuotos daugelis sąveikų tarp mikroorganizmų ir šeimininko. Antibiotikai, kuriuos gamina koaguliazėi neigiamas *S. lugdunensis* stabdo *S. aureus* kolonizaciją. *S. epidermidis* slopina *S. aureus* bioplėvelių formavimąsi gamindamas serino proteazes (Esp). Be to, *S. epidermidis* skatina keratinocitus gaminti antimikrobinius peptidus, kurie efektyviai nužudo *S. aureus*. *S. hominis* gaminamų lantibiotikų sinergistinis poveikis su žmogaus antimikrobinu peptidu sumažina *S. aureus* kolonizaciją. Priešingai *S. aureus* inhibicijai, *Propionibacterium acnes* gamina molekules, kurios skatina *S. aureus* agregaciją ir bioplėvelės formavimąsi (pagal Byrd et al., 2018).

Kitas odos mikroorganizmas, kontroliuojantis *S. aureus* augimą, yra *S. lugdunensis*. Šis mikroorganizmas inhibuoja *S. aureus* augimą gamindamas antibiotiką lugduniną (**1.2. pav.**) (Zipperer et al., 2016). Tyrimai rodo, kad net po daugelio generacijų, *S. aureus* neįgavo atsparumo lugduninui ar išvengė serino proteazių degradacijos. Šis atsparumo trūkumas yra ryškus kontrastas nuo tradicinių antibiotikų, kuriems mikroorganizmas įgavęs atsparumą ir pabrėžia, kad natūraliai mikrobiotos ir odos išskiriami junginiai gali būti dar veiksmingesnė priemonė, stabdanti oportunistinių patogenų augimą (Byrd et al., 2018).

Koaguliazei neigiami *Staphylococcus* spp., *S. epidermidis* ir *S. hominis* produkuoja lantibiotikus, kurie sinergistiškai veikia su žmogaus antimikrobiniu peptidu katelicidinu ir inhibuoja *S. aureus* augimą. Lantibiotikus gaminančių kamienų mažiau randama atopinio dermatito pacientuose, kurie yra dažnai kolonizuojami *S. aureus*. Vietinė šias antimikrobines medžiagas išskiriančių kamienų terapija sumažino *S. aureus* kolonizaciją atopinio dermatito pacientuose, todėl tai gali tapti potencialia probiotine gydymo strategija (Nakatsuji et al., 2017).

Patogeninio mikroorganizmo eliminavimas nėra vienintelė apsaugos nuo infekcijų strategija. *In vitro* tyrimuose *S. aureus* pakeitė virulentinę formą į komensalinę, kai kartu buvo komensalinė *Corynebacterium striatum*. Šis *S. aureus* elgesio pakeitimas atveria terapeutinę galimybę ne žudyti patogeną, o pakeisti jo elgesį (Ramsey et al., 2016).

Ne visi mikroorganizmai slopina *S. aureus* augimą. Priešingai, išsiaiškinta, kad kai kurios *Propionibacterium* genties rūšys skatina *S. aureus* agregaciją ir bioplėvelių formavimąsi, priklausomai nuo jų kiekio, augimo fazės ir pH (**1.2. pav.**) (Wollenberg et al., 2014).

Taip pat yra pavyzdžių sąveikų tarp kitų mikroorganizmų. *Corynebacterium accolens* modifikuoja vietinę odos aplinką, inhibuodama oportunistinio patogeno *Streptococcus pneumoniae* augimą. Šis atsakas yra priklausomas nuo *C. accolens* lipazių aktyvumo, dėl kurio iš odos paviršiuje esančių trigliceridų išlaisvinamos antibakterinėmis savybėmis pasižymintios riebiosios rūgštys (Bomar et al., 2016).

#### **1.4. Bakterijų atsparumas antibiotikams**

Neabejotinai antibiotikai yra vienas iš svarbiausių žmonijos atradimų, siekiant kovoti su infekcijomis ir mikroorganizmais, išgelbėjęs milijonus žmonių gyvybių (Levy, 1992). Nuo jų atradimo pradžios, jų įvairovė didėjo. XX a. viduryje antibiotikai buvo įvardijami kaip

„stebuklingi vaistai“, nes tuo metu vyravo optimistinis įsitikinimas, kad vartojant juos ilgainiui bus pamirštos užkrečiamosios ligos (Aminov, 2010).

Didėjantis antibiotikų poreikis įvairiuose sektoriuose sumažino antibiotikų kainą, o kartu ir padidino jų vartojimą. Masiškas ir neatsakingas antibiotikų vartojimas tapo labai svarbia atsparių kamienų atsiradimo priežastimi (Chopra et al., 2002). Šiuo metu pagrindinis būdas kovoti su ligomis, kurias sukelia antibiotikams atsparios bakterijos, yra modifikuoti esamus antibiotikus, išvengiant atsiradusio atsparumo mechanizmo (Davies ir Davies, 2010). Atsparumas antibiotikams atsiranda labai greitai, todėl tai kelia didelį susirūpinimą (Levy, 1998). Laikoma, kad atsparumas antibiotikams išsivysto tada, kai vaistas netenka gebėjimo efektyviai slopinti bakterijų augimo. Bakterijos tampa atsparios antibiotikui ir gali daugintis esant teraputinėms antibiotiko koncentracijoms. Įprastai, antibiotikai yra efektyvūs prieš bakterijas, bet kai mikrobai tampa jiems mažiau jautrūs arba atsparūs, reikia didesnių nei įprasta vaisto koncentracijų, kad jis būtų efektyvus (Levy, 1997).

Bakterijos turi įrankius, leidžiančius atsirasti atsparumui vaistui. **1.1. lentelėje** pateikti skirtingi atsparumo mechanizmai dažniausiai vartojamiems vaistams. Atsparumo procesai atsiranda dėl genų mutacijų (Brown ir Laxminarayana, 2001). Natūrali atranka nėra vienintelis būdas atsparumo vystymuisi, kadangi bakterijos geba tiesiogiai perkelti genetinę medžiagą tarpusavyje, perduodant viena kitai plazmidės su mutavusiais genais, taip didėjant atsparių bakterijų skaičiui (Lowy, 2003). Pastebėta, jog atsparumo antibiotikams lygis tiesiogiai koreliuoja su antibiotiko vartojimo lygiu (Goossens et al., 2005). Atsparumas antibiotikui taip pat gali atsirasti, jei vartotojai baigia vartoti antibiotikus anksčiau, nei paskirtas kursas. Taip lieka nepaveiktų bakterijų, kurios gali tapti atsparesnės antibiotikui (Levy, 1997). Ilgainiui, bakterijų kamienai ar rūšys gali įgyti daugybinius atsparumus skirtingoms antibiotikų klasėms (PSO, 2001). Atsparumas vieno tipo antibiotikui nebūtinai reiškia, kad bakterijos bus atsparios tik tam antibiotikui, jos gali būti atsparios ir kitiems tos klasės vaistams, kurie struktūriškai yra panašūs, pavyzdžiui, dėl atsparumo tetraciklinui, bakterijos gali būti atsparios ir oksitetraciklinui, chlortetraciklinui, doksiciklinui ir minociklinui (Chopra ir Roberts, 2001).

**1.1. lentelė.** Atsparumo mechanizmai dažniausiai vartojamiems antibiotikams

<b>Antibiotikų klasė</b>	<b>Pavyzdžiai</b>	<b>Atsparumo mechanizmai</b>
P-laktamai	Penicilinai, cefalosporinai, monobaktamai	Hidrolizė, efluksas, taikinio pakeitimas
Aminoglikozidai	Gentamicinas, streptomocinas, spektinomocinas	Fosforilinimas, acetilinimas, efluksas, taikinio pakeitimas
Glikopeptidai	Vankomicinas, teikoplaninas	Pakeičiama peptidoglikano sintezė
Tetraciklinai	Minociklinas, tigeciklinas	Monoksigenacija, efluksas, taikinio pakeitimas
Makrolidai	Eritromicinas, azitromicinas	Hidrolizė, glikozilinimas, fosforilinimas, efluksas, taikinio pakeitimas
Fenikoliai	Chloramfenikolis	Acetilinimas, efluksas, taikinio pakeitimas
Sulfonamidai	Sulfametoksazolas	Efluksas, taikinio pakeitimas
Rifamicinai	Rifampinas	ADP-ribozilinimas, efluksas, taikinio pakeitimas
Lipopeptidai	Daptomicinas	Taikinio pakeitimas
Katijoniniai peptidai	Kolistinas	Taikinio pakeitimas, efluksas

### **1.5. Mielių atsparumas priešgrybeliniams junginiams**

Nors ir atsparumo priešgrybeliniams vaistams lygis nėra toks didelis, kaip bakterijų atsparumas skirtingiems antibiotikams, grybelių atsparumas priešgrybelinėms medžiagoms kelia didelį susirūpinimą mokslininkams ir gydytojams. Invazinių grybelinių infekcijų gydymas yra limituotas, nes pacientai, esantys didžiausioje rizikos grupėje, dažnai turi ir kitų ligų ar sutrikimų, tokių kaip imunosupresija, kurie gali sumažinti terapijos efektyvumą net ir nesant atsparumo vaistui. Be jokios abejonės yra reikalingos naujos gydymo strategijos, kadangi susirūpinimą kelia ne tik didėjantis atsparumas priešgrybeliniams vaistams, bet ir jų nepageidaujami šalutiniai poveikiai ir toksiškumas pacientui, kurie taip pat mažina terapijos efektyvumą (Wiederhold, 2017).

Atsparumas priešgrybelinėms medžiagoms gali būti pirminis arba antrinis. Pirminis atsparumas reiškia, jog grybelio atsparumas vaistui atsiranda dar prieš poveikį vaistu, pavyzdžiui, *Candida krusei* yra natūraliai atsparus flukonazolui, o *Cryptococcus neoformans* yra atsparus echinokandinui (White et al., 1998). Antrinis atsparumas priešgrybelinėms medžiagoms gali atsirasti po poveikio šiais vaistais, pavyzdžiui, ne *C. albicans* izoliatų ir *Aspergillus fumigatus* atsparumas azolui ir *C. glabrata* atsparumas echinokandinui (Vallabhaneni et al., 2015; Verweij et al., 2016) Kai kurios grybelių rūšys yra atsparios tam tikriems vaistams, pavyzdžiui, *C. lusitaniae* atsparumas amfotericinui B, o kai kurios rūšys turi mikrobiologinį atsparumą visiems kliniškai naudojamiems priešgrybeliniams preparatams, pavyzdžiui, *Lomentospora prolificans* ir *Fusarium solani* (Lackner et al., 2014; Walsh et al., 2004). Taip pat atsiranda naujų rūšių, kurios pasižymi atsparumu skirtingoms priešgrybelinių medžiagų klasėms, pavyzdžiui, *C. auris* (Lockhart et al., 2017). Faktoriai, lemiantys atsparumą priešgrybelinėms medžiagoms, pateikti

### 1.3. pav.

#### Grybelio faktoriai:

- vaisto kaupimo mažinimas ląstelės viduje
- vaisto afiniškumo mažinimas jo taikiniui
- metabolizmo pokyčiai kaip atsakas į vaisto poveikį
- ląstelės atsakas į stresą
- bioplėvelių formavimasis

#### Šeimininko faktoriai:

- imunosupresija
- infekcijos vieta
- infekcijos sunkumas
- gydymo pradžia

#### Su vaistais susiję faktoriai:

- vaisto rūšis
- dozė
- farmakokinetika
- sąveikos su kitais vaistais

#### Aplinkos veiksniai

**1.3. pav.** Pagrindiniai faktoriai, lemiantys atsparumo priešgrybelinėms medžiagoms atsiradimą (pagal Pai et al., 2018).

## 1.6. Alternatyvų antibiotikams paieška

Infekcijų, kurias sukelia antibiotikams atsparūs bakterijų kamienai, gydymas šiuo metu yra viena sunkiausiai valdomų sveikatos problemų pasaulyje. Atsparių patogenų sukeltos infekcijos pasižymi aukštu mirtingumu ir sukelia dideles sveikatos priežiūros kainas (Carlet et al., 2011). Dar visai neseniai antibiotikai buvo naudojami išskirtinai žmonių ligų gydymui, tačiau dabar jie naudojami ir kituose sektoriuose (žemės ūkio, maisto pramonėse, veterinarijoje), kas ženkliai didina atsparumo antibiotikams problematiką (Radhouani et al., 2014). Ši stiprėjanti problema priverčia ieškoti naujų alternatyvių metodų, kurie galėtų kontroliuoti antibiotikams atsparių bakterijų kamienų sukeltą ligas (de Castro et al., 2014).



Mokslininkų grupės visame pasaulyje ieško naujų antimikrobinių medžiagų iš skirtingų šaltinių – tiek biologinių, tokių kaip mikroorganizmai, augalai ir gyvūnai, tiek nebiologinių. Tyrimai rodo, kad dėl konkurencingo gyvenimo mikroaplinkoje iš mikroorganizmų išgaunamos medžiagos yra vienos efektyviausių (De Souza Candido et al., 2014; Roy et al., 2013). Tarp ištirtų alternatyvų antibiotikams yra iš augalų išgautos medžiagos (Savoia, 2012), bakteriofagai ir fagų lizinai (Burrowes et al., 2011), RNR paimta terapija (Kole et al., 2012), probiotikai (Shanahan, 2010) ir iš įvairių šaltinių išskirti antimikrobiniai peptidai (Li et al., 2012). Tarp potencialių antimikrobinių agentų yra išskiriamos ir metalų nanodalelės, kurios pasižymi geromis antimikrobinėmis savybėmis (Slavin et al., 2017).

Metalų nanodalelės, kurios daugelio atliktų tyrimų metu pademonstravo stiprų antibakterinį aktyvumą, yra vienos perspektyviausių antimikrobinių medžiagų. Vyrauja hipotezė, jog antibakterinės nanodalelių savybės turi potencialo sumažinti arba pašalinti atsparių bakterijų evoliuciją, kadangi nanodalelės turi kompleksinį veikimą prieš mikroorganizmus, tokiu būdu išvengiant atsparių kamienų vystymosi (Slavin et al., 2017).

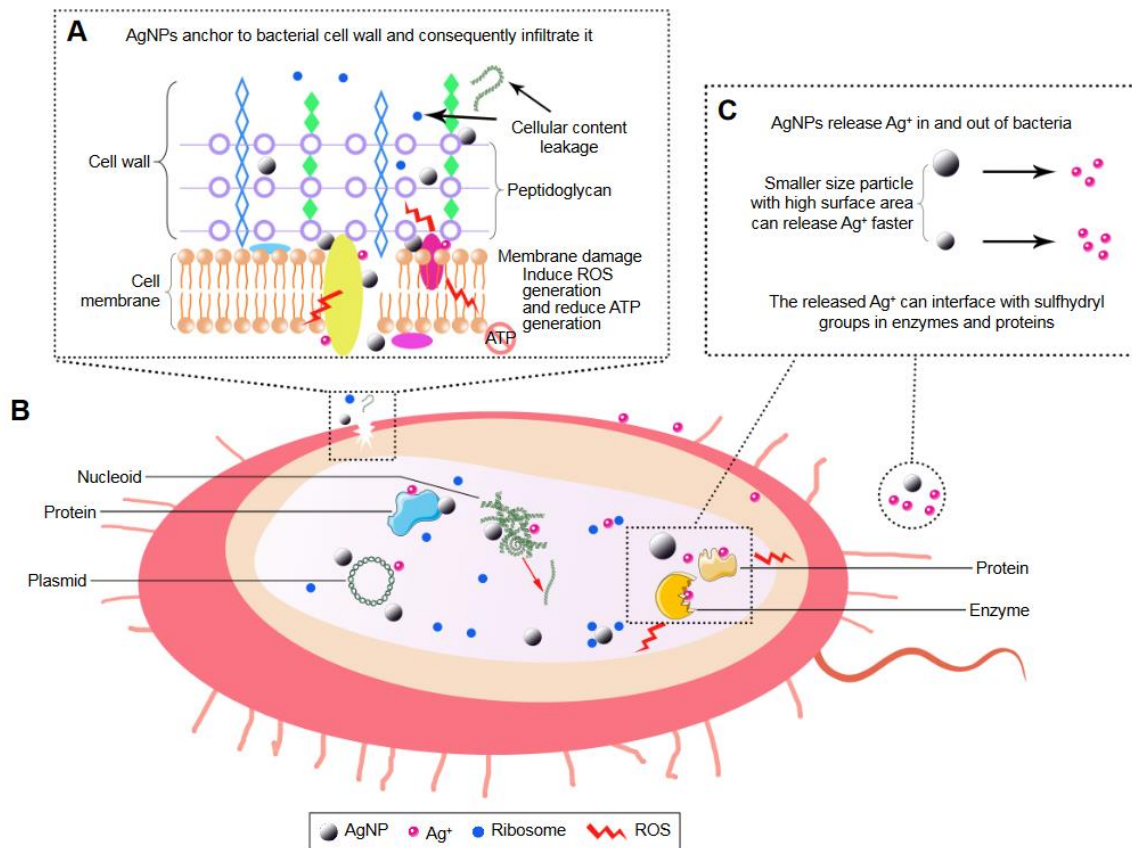
Didelis nanodalelių paviršiaus plotas, palyginus su jų tūriu, leidžia joms glaudžiai sąveikauti su mikroorganizmų membranomis. Galimybė modifikuoti nanodalelių paviršius leidžia kurti dar efektyvesnius antibakterinius agentus. Per paskutinį dešimtmetį tradicinės bei biogeninės nanodalelės susilaukė visame pasaulyje daugiau dėmesio dėl inovatyvumo kovojant su didėjančiu atsparumu antimikrobinėms medžiagoms. Metalų nanodalelės pasižymi sinergistiniu poveikiu su šiuo metu taikoma antimikrobine terapija, todėl galima mažinti jų koncentracijas ir taip apeiti atsparumo ir šalutinio poveikio problemas (Gupta et al., 2016).

Keletas metalų, metalų oksidų, metalų halogenidų ir metalų junginių nanodalelių formų buvo aprašytos kaip turinčios antimikrobinį aktyvumą (Beyth et al., 2015). Tai nanodalelės, turinčios Ag, Au, Zn, Cu, Ti, Mg, Ni, Ce, Se, Al, Cd, Y, Pd ir Fe. Tarp metalų nanodalelių, aukso nanodalelės pasižymi vidutinėmis antibakterinėmis savybėmis, nebent jų paviršius yra modifikuojamas. Sidabro nanodalelės pasižymi geriausiomis savybėmis prieš bakterines infekcijas (Dakal et al., 2016).  $Al_2O_3$  nanodalelės paskatina horizontalią genų pernašą bakterijose, o tai didina atsparumą antibiotikams (Ansari et al., 2014). Aukštas CuO nanodalelių toksiškumas sukelia oksidacinius pažeidimus, o ZnO ir  $TiO_2$  nanodalelių sukeltos DNR pažeidimai riboja šių nanodalelių efektyvumą. Nepaisant to, nanodalelės gali tapti alternatyviu antimikrobinio metodu kovai su bioplėvelių formavimusi ir sunkių bakterinių infekcijų gydymui (Oktar et al., 2015). Nanodalelių sukeltas mikrobu pašalinimas gali būti mikrobiocidinis, kai nanodalelės yra atsakingos už mikroorganizmo nužudymą, arba

mikrobiostatinis, kai bakterijų augimas yra sustabdomas, metabolinė veikla yra nutraukiama, taip sustiprinant šeimininko imuninės sistemos potencialą nužudyti patogenus (Hemeg, 2017).

### 1.7. Sidabro nanodalelių antimikrobinio veikimo mechanizmas

Sidabro nanodalelės (AgNDs) pasižymi kompleksiniu veikimu prieš mikroorganizmus (**1.4. pav.**). Nanodalelių toksiškumas taip pat priklauso nuo jų kompozicijos, dydžio, paviršiaus modifikacijų, vidinių savybių ir mikroorganizmo, kuris yra veikiamas, rūšies (Lara et al., 2011).



**1.4. pav.** Antibakterinis AgNDų poveikis. **A** AgNDs gali prisitvirtinti prie bakterinės ląstelės sienelės ir į ją įsiskverbti. Šis veiksmas gali sukelti membranos pažeidimus ir ląstelės turinio nutekėjimą. Be to AgNDs arba Ag<sup>+</sup> gali prisijungti prie ląstelės sienelėje esančių baltymų, kurie yra susiję su transmembraninės ATP gamyba. **B** AgNDs gali patekti į ląstelės vidų, o tada AgNDs ir iš jų išleisti Ag<sup>+</sup> gali sąveikauti su ląstelės struktūriniais elementais ir biomolekulėmis, pavyzdžiui, baltymais, fermentais, lipidais ir DNR. Padidėjęs ROS kiekis lemia panašų į apoptozę atsaką, lipidų peroksidaciją ir DNR pažeidimą. **C** AgNDs gali išleisti Ag<sup>+</sup> ląstelės viduje bei išorėje, o šie gali sąveikauti su baltymais ir fermentais (pagal Qing et al., 2018)).

Nanodalelių dydis yra vienas svarbiausių veiksnių, lemiančių jų efektyvumą prieš mikroorganizmus. AgNDs, turinčios didesnę paviršiaus plotą, gali geriau kontaktuoti su

mikroorganizmais (Rai et al., 2009). Priklausomai nuo jų dydžio, nanodalelės gali pereiti pro ląstelės membranas arba prisitvirtinti prie jų paviršiaus. Jos yra itin toksiškos bakteriniams kamienams, o jų efektyvumas didėja mažėjant jų dydžiui (Agnihotri et al., 2014).

Aukštą antibakterinį aktyvumą lemia sidabro katijonų ( $\text{Ag}^+$ ) išleidimas iš AgNDų (Priyadarshini et al., 2013).  $\text{Ag}^+$  į bakterijas patenka pro ląstelės sienelę, todėl ląstelės sienelė trūksta, denatūruoja baltymai ir išstinka mikroorganizmų mirtis. Kadangi  $\text{Ag}^+$  yra įkrauti teigiamai ir yra ženkliai mažesni už AgNDs, jie lengvai gali sąveikauti su bakterijų ląstelėse esančiomis elektronais turtingomis biomolekulėmis, turinčiomis sieros, fosforo arba azoto.  $\text{Ag}^+$ , išleisti iš AgNDų, gali įsiskverbti į tokius bakterinės ląstelės komponentus kaip peptidoglikanas, DNR ir baltymai, ir tokiu būdu sutrukdyti jų tolimesnę replikaciją.  $\text{Ag}^+$  prisitvirtina prie bakterinių baltymų ir taip stabdo jų gyvybines funkcijas (Ma et al., 2011). Mikroorganizmų ląstelių sienelėse AgNDs formuoja duobutes, pereina į bakterinės ląstelės vidų, kur gali būti kaupiamos, o tai sukelia bakterinių ląstelių mirtį (Dibrov et al., 2002).

Vienas iš pagrindinių AgNDų veikimo mechanizmų, stabdančių mikrobų augimą, AgNDų gebėjimas skatinti laisvųjų radikalų (ROS) gamybą, kas buvo patvirtinta ir AgNDų elektronų sukinio rezonansu (ESR) (Kim et al., 2007). ROS gamyba yra gana akivaizdi, kadangi gyvosiose sistemose jie gali atakuoti membranų lipidus, po ko seka membranų disociacija, pažeidimai ir galiausiai mikrobų augimo slopinimas (Mendis et al., 2005). Atsirandančių ROS pavyzdžiai būtų superoksidas ( $\text{O}_2^-$ ), hidroksilas ( $\cdot\text{OH}$ ), peroksidai ( $\text{RCOO}\cdot$ ) ir vandenilio peroksidas ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Gulcin, 2012). Besigaminantys ROS gali išardyti membranas ir pažeisti jų pralaidumą. Mikroorganizmų augimo slopinimas atsiranda dėl elektrostatiškų sąveikų, AgNDų adsorbcijos ir skverbimosi pro bakterines ląstelių sienelės. Ląstelės replikacija ir mikrobų vystymasis ROS aplinkoje sustoja. Tačiau šis procesas gali toliau vykti, aplinkoje esant antioksidantų, tokių kaip fermentai ar nefermentiniai komponentai, kurie neutralizuoja laisvuosius radikalus (Rice-Evans et al., 1997).

AgNDų antibakterinis poveikis taip pat pasireiškia kvėpavimo grandinės fermento dehidrogenazės inaktyvavimu ir po to sekančios ROS gamybos. Šie procesai slopina ląstelių kvėpavimo procesą ir augimą (Quinteros et al., 2016). AgNDs gali sutrikdyti antioksidantinių fermentų, tokių kaip glutationo (GSH), superoksido dismutazės ir katalazės, raišką, kas pagreitina ROS kaupimąsi (Yuan et al., 2017). Padidėjęs ROS kiekis lemia apoptozę, lipidų peroksidaciją ir DNR pažaidas (Korshed et al., 2016).

AgNDų sąveika su ribosomomis lemia jų denatūraciją ir sukelia transliacijos ir baltymų sintezės inhibiciją. AgNDs taip pat efektyviai sąveikauja su  $\beta$ -galaktozidazės

karboksilo ir tiolio grupėmis, stabdo viduląstelines biologines funkcijas, kas lemia ląstelių žūtį (You et al., 2012).

Tyrimais įrodyta, jog antibakterinis AgNDų poveikis prieš gramneigiamas bakterijas yra stipresnis nei prieš gramteigiamas. Šis fenomenas gali būti paaiškintas ląstelių sienelių storio skirtumu: gramteigiamų bakterijų sienelių storis yra apie 30 nm, tuo tarpu gramneigiamų bakterijų sienelių storis siekia 3-4 nm (Van Der Wal et al., 1997). Išorinis gramneigiamų bakterijų sluoksnis yra sudarytas iš lipopolisacharidų, o vidinis sluoksnis – linijinių polisacharidų grandinių, taip formuojant erdvinį tinklą su baltymais. AgNDs yra kaupiamos dėl traukos tarp neigiamai įkrautų polisacharidų ir silpnai teigimai įkrautų AgNDų. Tai stabdo ląstelės sienelės replikaciją (Tho et al., 2013).

### **1.8. Sidabro nanodalelių aktyvumas bioplėvelių formavimuisi**

Bioplėvelės yra mikroorganizmų bendruomenės, prisitvirtinusios prie kieto paviršiaus. Kai susiformuoja bioplėvelės, mikroorganizmai tampa atsparesni antimikrobinėms medžiagoms, pavyzdžiui, antibiotikams, o tai sukelia rimtas pasekmes (Stoodley et al., 2002). Tyrimais buvo įrodytas AgNDų aktyvumas prieš bioplėvelių formavimąsi. Išanalizavus AgNDų sąveiką su *Pseudomonas putida* bioplėvelėmis, nustatyta, kad po AgNDų poveikio bioplėvelės yra suardomos (Franci et al., 2015). Du et al. (2016) tyrė AgNDų aktyvumą prieš *E. coli* bioplėvelių formavimąsi. 10 µg/ml koncentracijos AgNDs pademonstravo aktyvumą prieš bioplėvelių formavimąsi (Du et al., 2016).

AgNDs imobilizavus ant titano paviršiaus galima sumažinti bakterinių bioplėvelių formavimąsi *in vitro*. Ši modifikacija leidžia inhibuoti bakterijų adheziją ir *icaAD* transkripciją. Be to, nepriklausomas imobilizuotų AgNDų aktyvumas prieš bioplėvelių formavimąsi gali apsaugoti nuo kai kurių *in vitro* vykstančių su bioplėvelės formavimusi susijusių ciklų ir sumažinti su implantais siejamų infekcijų *in vivo* (Qin et al., 2014). Kitame tyrime, AgNDs buvo inkorporuotos į poruotus titano implantus. Antimikrobiniai testai parodė stiprų antimikrobinį poveikį prieš meticilinui atsparias *S. aureus*, tarp kurių buvo ir trukdymas formotis bioplėvelėms (van Hengel et al., 2017). Šie tyrimai rodo, kad implantams gali būti suteiktas aktyvumas prieš bioplėvelių formavimąsi, į juos inkorporavus AgNDs (Qing et al., 2018).

## **1.9. Sidabro nanodalelių gavimo būdai**

### **1.9.1. Cheminiai sidabro nanodalelių gavimo metodai**

Vienas iš dažniausių AgNDų sintezės būdų yra cheminė redukcija, naudojant organinius ir neorganinius reduktorius. Įvairūs reduktoriai, tokie kaip, natrio citratas, askorbatas, natrio borohidridas ( $\text{NaBH}_4$ ), elementinis vandenilis, Toleno reagentai, N, N-dimetilforminadas (DMF) ir kiti, naudojami sidabro jonų ( $\text{Ag}^+$ ) redukcijai vandeniniuose ir nevandeniniuose tirpaluose. Šie reduktoriai redukuoja  $\text{Ag}^+$  iki elementinio sidabro ( $\text{Ag}^0$ ), kuris aglomeruojasi į oligomerinius klasterius. Šie klasteriai toliau formuojasi iki koloidinių sidabro dalelių (Wiley et al., 2005). Labai svarbu naudoti apsauginius agentus, kad metalų nanodalelių gamybos metu jos būtų stabilizuotos ir apsaugotos nuo absorbcijos ar prisijungimo prie nanodalelių paviršiaus, taip išvengiant jų aglomeracijos (Oliveira et al., 2005). Surfaktantų, pavyzdžiui, tiolių, aminių, rūgščių ar alkoholių, buvimas stabilizuoja dalelių augimą ir apsaugo jas nuo sedimentacijos, aglomeracijos ar paviršiaus savybių netekimo (Iravani et al., 2014).

Polimeriniai junginiai, tokie kaip, polivinilo alkoholis, polietilenglicerolis ir kiti, yra efektyvūs apsauginiai agentai AgNDų stabilizavimui. Kim su kolegomis (2006) paskelbė sferinių kontroliuojamo dydžio AgNDų sintezę, kai naudojant poliolių ir modifikuotą pirmtakų įpurškimo techniką buvo gautos itin vienodo dydžio dalelės. Pirmtakų įpurškimo technikos metu, įpurškimų dažnis ir reakcijos temperatūra yra labai svarbūs faktoriai, leidžiantys gauti vienodos formos ir dydžio AgNDs.  $17 \pm 2$  nm dydžio AgNDs buvo gautos atliekant 2,5 ml/s injekcijas 100 °C temperatūroje. Pirmtakų tirpalo įpurškimas į karštą tirpalą yra efektyvus būdas indukuoti greitą nukleaciją per trumpą laiką, užtikrinant mažų AgNDų gamybą su mažesniu dydžio pasiskirstymu (Kim et al., 2006).

### **1.9.2. Fizikiniai sidabro nanodalelių gavimo metodai**

Fizikiniai metodai pranašesni už cheminius AgNDų gavimo būdus, nes nereikia naudoti tirpiklių, o gaunamos AgNDs pasižymi vienodomis savybėmis. Pagrindiniai fizikiniai AgNDų gavimo būdai yra evaporacijos kondensacijos ir lazerinės abliacijos metodai.

Evaporacijos kondensacijos metodas yra paremtas sidabro garinimo ir greito susidariusių garų kondensavimo principu. Sidabras yra garinamas iki 1300–1400 °C įkaitintoje atmosferinio slėgio vamzdinėje krosnyje (Ku ir Maynard, 2006). Atmosferinio slėgio vamzdinės krosnies naudojimas AgNDų gavimui turi trūkumų, nes vamzdinė krosnis užima daug vietos, sunaudoja didelius energijos kiekius, kelia aplinkos temperatūrą. Be to, reikia

nemažai laiko, kol pasiekiamas terminis stabilumas. Įprastai vamzdinei krosniai reikia daugiau nei keliolikos kilovatų energijos ir užtrunka keletą dešimčių minučių, kol pasiekiami stabili reikalinga temperatūra (Kmis et al., 2000; Magnusson et al., 1999).

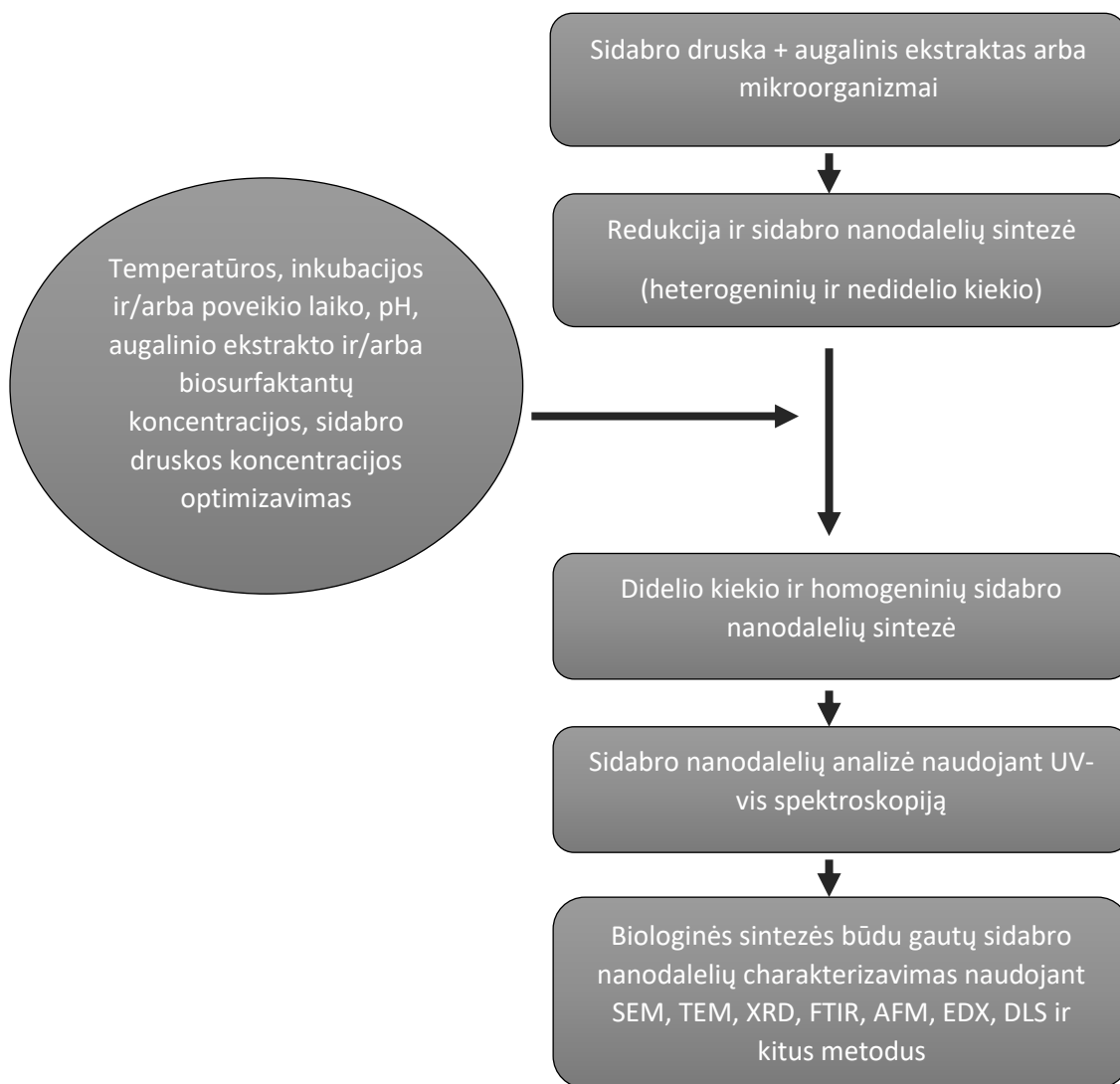
AgNDs gali būti gaunamos ir lazerinės abliacijos būdu, naudojant birias metalines žaliavas tirpale (Mafune et al., 2002). Abliacijos efektyvumas ir gautų nanodalelių savybės priklauso nuo daugelio parametų, tokių kaip, lazerio bangos ilgis, lazerio impulsų trukmės, lazerio sklaidos, abliacijos trukmės ir fakto, ar skystoje terpėje yra paviršiaus aktyvių medžiagų (Kim et al., 2005).

Palyginus su kitais AgNDų gavimo metodais, vienas svarbiausių lazerinės abliacijos metodo privalumas yra tas, jog tirpaluose nenaudojami cheminiai reagentai. Taigi šiuo būdu gaminami gryni ir neužteršti metalų koloidai (Tsuji et al., 2002). Lazerinės abliacijos metodu panaudojus 800 nm ilgio bandą ir femtosekundžių trukmės impulsus, gautos sferinės formos 20–50 nm diametro AgNDs. Formavimosi efektyvumas ir gautų nanodalelių dydis buvo palygintas su dalelėmis, gautomis naudojant nanosekundžių trukmės lazerio impulsus. Rezultatai rodo, kad formavimosi efektyvumas naudojant femtosekundes yra ženkliai mažesnis nei naudojant nanosekundžių trukmės impulsus, tačiau naudojant femtosekundžių trukmės impulsus gaunamos vienos dydžio nanodalelės. Be to, naudojant femtosekundžių trukmės impulsus vandenyje, lazerinės abliacijos efektyvumas ženkliai mažesnis nei ore, tuo tarpu naudojant nanosekundžių trukmės impulsus, abliacijos efektyvumas vandenyje ir ore buvo panašus (Tsuji et al., 2003).

### **1.9.3. Biologinė sidabro nanodalelių sintezė**

Cheminiai ir fizikiniai metodai sidabro nanodalelių gamybai teršia aplinką ir daug kainuoja. Tad yra svarbu kurti naujus metodus, kuriems nebūtų reikalinga brangi įranga, kurie tautosotų aplinką: taikant šiuos metodus nebūtų naudojamos ar gaunamos kaip šalutiniai produktai toksinės chemijos medžiagos ir aukšta temperatūra. Išvardintos problemos privertė mokslininkus ieškoti potencialo organizmuose. Nanodalelių gamybai galima panaudoti tiek prokariotines ląsteles, tiek eukariotus (grybus ir augalus) (Mohanpuria et al., 2008). Bakterijos gali būti panaudotos aukso, sidabro, kadmio, cinko, magnetito ir geležies NDų gamybai; mielių ląstelės – sidabro, švino ir kadmio NDs; grybai – aukso, sidabro ir kadmio NDs; dumbliai – sidabro ir aukso NDs; augalai – sidabro, aukso, paladžio, cinko oksido, platinos ir magnetito NDs gauti (Debaditya ir Gupta, 2005; Senapati, 2005).

Įvertinus organizmo tipą, paveldimas ir genetines organizmo savybes, optimalias sąlygas ląstelių augimui ir fermento aktyvumui, optimalias reakcijos sąlygas ir parinkus tinkamą biokatalizatoriaus būseną, biologinė sintezė gali būti pritaikyta itin stabilių ir gerai charakterizuotų NDų sintezei. NDų dydis ir morfologija gali būti kontroliuojami keičiant kai kurias sąlygas, tokias kaip, substrato ir biomasės koncentracijos, pH, šviesa, temperatūra, buferio stiprumas, elektronų donoras (pvz.: gliukozė ar fruktozė), maišymo greitis ir reakcijos laikas (Iravani et al., 2014). Apibendrinta sidabro nanodalelių sintezės schema biologinėse sistemose pateikta **1.5. pav.**



**1.5. pav.** Sidabro nanodalelių biologinėse sistemose sintezės schema (pagal Siddiqi et al., 2018).

### 1.9.3.1. Bakterijų pritaikymas sidabro nanodalelių gavimui

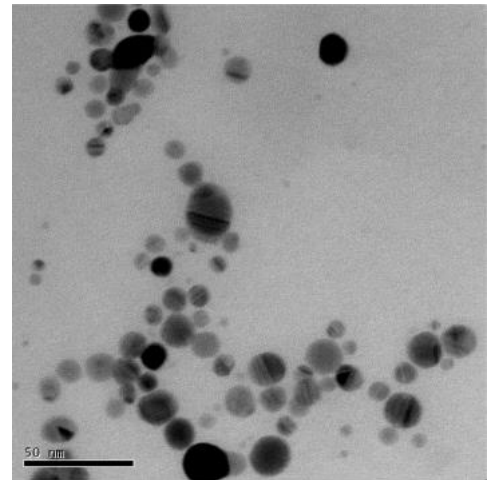
Itin stabilios AgNDs (40 nm skersmens) gali būti gaunamos bioredukcijos būdu naudojant vandeninius sidabro jonus ir nepatogeninių bakterijų, *Bacillus licheniformis*, kultūros supernatantą (Kalishwaralal et al., 2008). Saifuddin et al. (2009) pritaikė kombinuotą AgNDų sintezės būdą, kombinuojant *B. subtilis* kultūros supernatantą ir mikrobangų švitinimą vandenyje. Jų darbe, ekstraląstelinė AgNDų (5–50 nm) sintezė buvo vykdoma naudojant *B. subtilis* supernatantus, bet tam, kad būtų pagerinta reakcijos išeiga ir sumažinta pagamintų sidabro nanodalelių agregacija, jie naudojo mikrobangų švitinimą, kuris suteikė tolygų šildymą AgNDų paviršiuje ir leido dalelėms bręsti be agregacijos (Saifuddin et al., 2009).

AgNDų biosintezėi redukuojant vandeninius  $\text{Ag}^+$  jonus buvo pritaikyti ir *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli* ir *Enterobacter cloacae* bakterijų kultūrų supernatantai. Sintezės procesas buvo gana greitas – AgNDs susiformavo praėjus 5 min po sidabro jonų kontakto su ląstelių filtratu. Šiuose tyrimuose parodyta, jog už redukcijos procesą greičiausiai yra atsakingas fermentas nitratų reduktazė (Shahverdi et al., 2007).

Taip pat AgNDų biosintezė buvo pasiekta *Lactobacillus* kamienus paveikus sidabro jonais. AgNDs susidarė *Lactobacillus* kamienų bakterijų viduje (Korbekandi et al., 2012; Nair ir Pradeep, 2002). Dėl cukrų ir fermentų ląstelės sienelėje AgNDų nukleacija įvyko ląstelių paviršiuje, o vėliau metalo branduoliai buvo transportuojami į ląstelės vidų, kur jie agregavosi ir susiformavo didesnio dydžio dalelės. Korbekandi su kolegomis (2012) pademonstravo bioreduktyvią AgNDų sintezę *L. casei* subsp. *casei* kambario temperatūroje. Biosintezės būdu gautos AgNDs buvo beveik sferinės formos, pavienės (25–50 nm) arba agregatuose (100 nm), prisijungusios prie biomasės paviršiaus arba jų viduje, arba išorėje. Patvirtinta, jog metalo jonų redukcija ir AgNDų stabilizacija vyko dėl fermentinių procesų. Elektroninės mikroskopijos analizė parodė, kad dėl metalo jonų bioredukcijos fermentų, esančių citoplazminėje membranoje ir citoplazmoje, AgNDs susiformavo citoplazminės membranos paviršiuje, citoplazmos viduje ir ląstelės išorėje (Korbekandi et al., 2012).



Dėl atsparumo aukštomis metalų jonų koncentracijoms, užlaštelinės AgNDų sintezės indukcijai buvo panaudotos ir *Geobacillus stearothermophilus* rūšies bakterijos. Panaudojus *G. stearothermophilus* sekretomus ir pridėjus 1 mM koncentracijos sidabro nitrato buvo gautos sferinės, 5–35 nm skersmens AgNDs (**1.6. pav.**) (Fayaz et al., 2011). Ghasemi et al. (2018) taip pat panaudojo *G. stearothermophilus* bakterijų sekretomus AgNDų sintezei. Jų gautos AgNDų buvo sferinės formos, 15–50 nm skersmens (Ghasemi et al., 2018). Tikslus AgNDų susidarymo mechanizmas *G. stearothermophilus* bakterijose nėra žinomas, tačiau spekuliuojama, kad šių bakterijų į terpę išskiriami baltymai vaidina svarbų vaidmenį sidabro jonų redukcijai ir AgNDų formavimuisi (Fayaz et al., 2011).



**1.6. pav.** Sidabro nanodalelės, gautos panaudojus *G. stearothermophilus* sekretomus (Fayaz et al., 2011).

### 1.9.3.2. Grybelių pritaikymas sidabro nanodalelių gavimui

5–50 nm skersmens AgNDs gali būti gautos ekstraląsteline biosinteze naudojant *Fusarium oxysporum* pelėsį. Gautos AgNDs neflokuliuoja net praėjus keliems mėnesiams po reakcijos. Pelėsio baltymai stabilizuoja gautą nanomedžiagą, dėl ko ši pasižymi ilgalaikiu stabilumu tirpale. Gautų AgNDų morfologija yra įvairi, dauguma dalelių yra sferinės, bet gaunamos ir trikampės formos dalelės. *F. oxysporum* bioredukcijos reakcija vyksta dėl nuo NADH priklausomos reduktazės (Ahmad et al., 2017). *F. oxysporum* paveikimas sidabro jonais lemia nitratų reduktazės sekretavimą į terpę ir vėliau vykstantį itin stabilų AgNDų formavimąsi (Kumar et al., 2007). Kepurės baltymų stabilumas priklauso nuo pH. Aukštesnėse pH reikšmėse (>12), AgNDs išliko stabilios, tačiau jos agregavo žemose pH reikšmėse (<2), kadangi baltymai denatūravo. Kumar et al. (2007) pademonstravo *in vitro* fermentinę AgNDų skirtingų cheminių kompozicijų, dydžių ir morfologijų sintezę, naudojant nuo NADH priklausomą  $\alpha$ -niratų reduktazę, išskirtą iš *F. oxysporum* ir fitochelatiną. Esant nitratų reduktazėms, sidabro jonai buvo redukuojami, kas lėmė stabilų vandenyje tirpių 10–25 nm skersmens AgNDų formavimąsi ir jų stabilizaciją kepurės peptidais (Kumar et al., 2007). Buvo patvirtinta, jog metalo jonų redukcija ir gautų nanodalelių stabilizacija vyksta dėl fermentinių procesų. Taip pat sužinota daugiau apie sintezės reakcijos vietą. Palyginus su ankstesniais darbais, paskelbta,

jog nanodalelių gamyba *F. oxysporum* atveju yra viduląstelinė, AgNDs kaupiamos pūslelėse, kurios transportuojamos ir sekretuojamos egzocitozės būdu į ląstelės išorę (Korbekandi et al., 2013).

Stabilios AgNDs gali būti gautos naudojant *Aspergillus flavus* grybelius. Gautos nanodalelės dėl prie paviršiaus prisitvirtinančių grybelio sekretuojamų stabilizuojančių medžiagų yra stabilios vandenyje ilgiau nei 3 mėn. be žymios agregacijos (Vigneshwaran et al., 2006). Taip pat buvo tirta ir ekstraląstelinė *Aspergillus fumigatus* AgNDų (5–25 nm) biosintezė. Dauguma gautų AgNDų buvo sferinės formos su šiek tiek trikampių formų priemaišų (Bhainsa ir D'Souza, 2006).

### 1.9.3.3. Augalų pritaikymas sidabro nanodalelių gavimui

AgNDų sintezė, naudojant augalus, yra labai ekonomiška, todėl gali tapti ekologiška ir vertinga didelių mastų AgNDų produkcijos alternatyva (Iravani, 2011). *Camelia sinensis* (žalioji arbata) ekstraktas yra naudojamas kaip redukuojantis ir stabilizuojantis agentas AgNDs biosintzei (Vilchis-Nestor et al., 2008). Fenolio rūgšties tipo biomolekulės, pavyzdžiui, kofeinas ir teofilinas, esančios *C. sinensis* ekstrakto, yra atsakingos už AgNDų formavimąsi ir stabilizaciją. Juodosios arbatos lapų ekstraktas taip pat buvo panaudotas AgNDų gamybai. Gautos nanodalelės buvo stabilios ir skirtingų formų, tokių kaip, sferos, trapezoidai, prizmės ir lazdelės. Šių AgNDų sintezėje dalyvavo polifenoliai ir flavonoidai (Begum et al., 2009).

Liucernos (*Medicago sativa*), citrinžolės (*Cymbopogon flexuosus*) ir pelargonijos (*Pelargonium graveolens*) ekstraktai taip pat gali būti panaudoti žaliajai AgNDų sintzei. Be to, didelio tankio, ypač stabilios AgNDs (16–40 nm) buvo greitai susintetintos *Datura metel* (stambiažiedė durnaropė) lapų ekstraktus paveikus sidabro jonais. Šio augalo ekstraktuose randama biomolekulių, tokių kaip, alkaloidai, baltymai ir fermentai, aminorūgštys, alkoholio junginiai ir polisacharidai, kurie gali būti naudojami kaip reduktoriai reaguojant su sidabro jonais. Dėl šios priežasties jie yra naudojami kaip pastoliai tiesioginiam AgNDų susiformavimui tirpale (Kesharwani et al., 2009).

### 1.10. Sidabro nanodalelių antimikrobinio veikimo tyrimai

AgNDs pasižymi puikiomis antimikrobinėmis savybėmis prieš platų mikroorganizmų spektrą (Wei et al., 2015). AgNDų savybės priklauso nuo jų dydžio, formos,

jų dangalo ir morfologijos, o šie savo ruožtu priklauso nuo paruošimo būdo, tirpiklio pobūdžio, koncentracijos, reduktoriaus stiprumo ir temperatūros (Husen ir Siddiqi, 2014). Be to, AgNDų amžius taip pat yra svarbus faktorius jų toksiškumui. Pastebėta, kad 6 mėn. senumo vandeninio tirpalo AgNDs yra labiau toksiškos dėl į tirpalą išskirtų Ag<sup>+</sup> jonų (Kittler et al., 2010).

Biologiniu būdu susintetintos nanodalelės yra labiau toksiškos nei kitais būdais gautos nanodalelės. AgNDs lėtai apgaubia mikroorganizmų ląsteles ir patenka į jų vidų, slopindamos jų gyvybinius procesus (Brayner, 2008). Metalų nanodalelės yra toksiškesnės už atskirus metalų atomus (Jayasree et al., 2006). Manoma, kad AgNDų citotoksiškumas pasireiškia dėl reaktyvių deguonies formų (ROS) produkcijos. Kim ir Ryu (2013) gyvūnų audinių ir ląstelių kultūrų *in vitro* tyrimais parodė padidėjusį oksidacinį stresą, apoptozę ir genotoksiškumą po poveikio AgNDs (Kim ir Ryu, 2013).

Das su kolegomis (2011) paskelbė, jog mažo dydžio AgNDs, gautos sintezei naudojant iš šilkverpių išskirtą fermentą šilko sericiną, puikiai stabdo kai kurių bakterijų augimą. Nustatyta, jog šios nanodalelės yra efektyvios tiek prieš gramteigiamas, tiek prieš gramneigiamas bakterijas, o jų MIK reikšmės yra tarp 0,001 ir 0,008 mM prieš *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ir *E. coli* (Das et al., 2011).

Kadangi AgNDų toksiškumo tyrimai buvo atlikti skirtingomis sąlygomis su skirtingo dydžio ir savybių AgNDs, negalima nustatyti tiesioginės koreliacijos jų toksiškumui. Hackenber et al. (2011) parodė sumažėjusį mezenchiminių žmogaus ląstelių gyvybingumą su 10 µg/ml 50 nm dydžio AgNDs (Hackenberg et al., 2011), kai tuo tarpu kiti mokslininkai parodė, kad net ir didesnės koncentracijos AgNDų (100 µg/ml) tirpalas nėra toksiškais ląstelėms (Samberg et al., 2012).

Vijay Kumar su kolegomis (2014) išgavo AgNDs naudojant gulsčiosios glemžūnės (*Boerhavia diffusa*) augalo ekstraktą ir testavo jas prieš tris žuvies patogenus. Rezultatai parodė, kad AgNDs buvo efektyviausios prieš *Flavobacterium branchiophilum* (MIK 50 µg/ml) (Vijay Kumar et al., 2014). Latha su kolegomis (2016) pagamino AgNDs naudojant riešutinės justicijos (*Adhatoda vasica*) ekstraktą ir tyrė jų antimikrobinį aktyvumą prieš *Vibrio parahaemolyticus*. *V. parahaemolyticus* yra paplitęs jūros gėrybių ir žuvų enteropatogenas, siejamas su krevečių ir įvairių žuvų mirtingumu. Antibiotikų naudojimas padarė *Vibrio* bakterijas jiems atsparias. AgNDs (koncentracija 50 µg/ml) yra ypač toksiškos prieš *V. parahaemolyticus*, bet netoksiškos krevetėms (*Artemia nauplii*). AgNDs tapo efektyvia priemone, galinčia išsaugoti krevetes ir žuvis nuo žūties (Latha et al., 2016).

Iš pelargonijų (*Pelargonium endlicherianum*) ekstrakto gautos AgNDs parodė, kad augimo stabdymo efektas gramteigiamoms ir gramneigiamoms bakterijoms padidėjo, kai šios buvo paveiktos labai mažomis AgNDs dozėmis (7,81–6,25 ppm) (Karatoprak et al., 2017).

AgNDs gautos iš baziliko (*Ocimum tenuiflorum*), kiauļiauogės (*Solanum trilobatum*), slyvinio gvazdikmedžio (*Syzygium cumini*), azijinės centelės (*Centella asiatica*) ir apelsino (*Citrus sinensis*) turi antibakterinį ir antioksidacinį veikimą prieš *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ir *K. pneumoniae*. Didžiausias AgNDs aktyvumas buvo parodytas prieš *S. aureus* ir *E. coli*. Koloidinių AgNDs antimikrobinis aktyvumas buvo didesnis nei pačių lapų ekstraktų (Logeswari et al., 2015).

Owaid su kolegomis (2015) pagamino AgNDs naudojant vandeninį *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus* grybo ekstraktą, kuris veikė tiek kaip redukuojantis, tiek kaip stabilizuojantis agentas. Šių AgNDų antimikrobinis aktyvumas buvo tirtas keturioms patogeninėms *Candida* rūšims: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* ir *C. pseudotropicalis*. 60 µg/šulinėlyje AgNDų koncentracija pademonstravo padidintą inhibiciją visoms tirtoms *Candida* rūšims. Tačiau grynas 20–40 µg/šulinėlyje koncentracijos grybo ekstraktas buvo neaktyvus visiems mikrobams (Owaid et al., 2015). Veikimo mechanizmas paaiškintas kaip teigiamą krūvį turinčių sidabro jonų sąveika su neigiamai įkrautomis mikroorganizmų ląstelių membranomis. Dėl elektrostatinės traukos tarp Ag<sup>+</sup> ir ląstelės membranų, sidabro jonai patenka į mikrobines ląsteles, sukeldami jų mirtį (Logaranjan et al., 2016).

Allahverdiyev su kolegomis (2011) parodė, kad AgNDų ir antibiotikų kombinacija sumažina jų toksiškumą žmogaus ląstelėms, kadangi reikia mažesnių jų dozių (Allahverdiyev et al.c, 2011). Be to, šios kombinacijos sugrąžina vaisto gebėjimą nužudyti atsparias jam bakterijas (Singh et al., 2013). Taigi tiek vienu AgNDų, gautų iš bakterinių kamienų, naudojimas, tiek jų kombinacija su antibiotikais, gali tapti nauju efektyviu būdu kovoti su atspariomis patogenų rūšimis. Tačiau tyrimais parodyta, kad *E. coli* gali įgyti atsparumą AgNDs dėl genetinių mutacijų po 225 kartų (Graves et al., 2015). Tad reikia imtis priemonių, kad būtų išvengta per dažno mikroorganizmų veikimo šiomis nanodalelėmis.

## 2. Medžiagos ir metodai

### 2.1. Darbe naudoti mikroorganizmų kamienai

Šiame darbe AgNDų sintezei buvo naudoti keturi *Geobacillus* genties bakterijų kamienai: *Geobacillus* sp. 18, *Geobacillus* sp. 25, *Geobacillus* sp. 95 ir *Geobacillus* sp. 612. Šie kamienai gauti iš Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų instituto Eukariotų molekulinės mikrobiologijos laboratorijos kolekcijos. Gautų AgNDų antimikrobinis poveikis buvo tirtas prieš *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* mieles, kurios buvo izoliuoti nuo paciento su atopinio dermatito diagnoze odos (Lastauskienė et al., 2014), bei *S. aureus* (ATCC29213), *P. aeruginosa* (ATCC27853) (*P. aeruginosa* p42) ir *S. pyogenes* (ATCC12384).

### 2.2. Darbe naudotos medžiagos

1. Agarozė (ROTH, Vokietija)
2. Ampicilino natrio druska (ROTH, Vokietija)
3. D(+)-gliukozės monohidratas (ROTH, Vokietija)
4. D-sorbitolis (ROTH, Vokietija)
5. Etanolis (MERCK, Vokietija)
6. Gliutraldehidas (SIGMA, Vokietija)
7. Kalio chloridas (BDH, Vokietija)
8.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (BDH, Vokietija)
9. Mėsos ekstraktas (MERCK, Vokietija)
10. Mielių ekstraktas (ROTH, Vokietija)
11.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (MERCK, Vokietija)
12. Natrio chloridas (MERCK, Vokietija)
13. Peptonas (ROTH, Vokietija)
14. Propidžio jodidas (SIGMA, Vokietija)
15. Sidabro nitratas (ROTH, Vokietija)
16. Triptonas (OXOID, Anglija)
17. Vario sulfatas ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) (LACHEMA, Čekija)

### 2.3. Darbe naudoti terpės ir buferiai

*Geobacillus* genties bakterijų kultivavimui skirta terpė:

- triptonas 1 %;
- mėsos ekstraktas 0,5 %;
- NaCl 0,5 %.

Agarizuotai terpei gauti pridedama 1,5 % agaro. Terpė autoklavuojama 30 min 121 °C.

Mielių ekstrakto peptono dekstrozės (YPD) terpė:

- gliukozė 2 %;
- peptonas 2 %;
- mielių ekstraktas 1 %.

Agarizuotai YPD terpei gauti pridedama 1,5 % agaro. Autoklavuojama 30 min 112 °C.

*C. lusitaniae* pseudohifų auginimui, po autoklavavimo pridedama 1 mM CuSO<sub>4</sub>.

Luria-Bertani (LB) terpė:

- peptonas 1 %;
- mielių ekstraktas 0,5 %;
- NaCl 0,5 %.

Agarizuotai LB terpei gauti pridedama 1,5 % agaro. Autoklavuojama 30 min 121 °C.

1 × PBS buferis (1 l):

- 8 g NaCl;
- 200 mg KCl;
- 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;
- 240 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Pirmiausia druskos yra ištirpinamos 800 ml distiliuotame vandenyje. Gautu tirpalo pH reguliuojamas 1 M HCl iki pH reikšmės 7,4. Pripilama vandens, jog galutinis tūris gautųsi 1 l. Autoklavuojama 15 min 112 °C.

1 M sorbitolio tirpalas:

1 l tirpalui pagaminti 800 ml distiliuotame vandenyje ištirpinama 182,18 g D-sorbitolio.

Ištirpinus, pripilama vandens, jog galutinis tūris būtų 1 l. Autoklavuojama 15 min 112 °C.

## 2.4. Metodai

### 2.4.1. Užląstelinis sidabro nanodalelių susidarymas

Užląstelinis AgNDų susidarymas indukuojamas naudojant *Geobacillus* sp. 18, *Geobacillus* sp. 25, *Geobacillus* sp. 95 ir *Geobacillus* sp. 612 kamienų sekretomus. *Geobacillus* kamienų ląstelės auginamos *Geobacillus* bakterijų kultivavimui skirtoje terpėje. Ląstelės auginamos 48 h, 180 aps/min greičiu 55 °C temperatūroje. Po kultivavimo bakterijų sekretomai atskiriami centrifugavimo pagalba (10 min, 16000 g). Surinktos bakterijų sekretomų frakcijos sumaišomos su 2 mM AgNO<sub>3</sub>. Toliau vėl vykdoma inkubacija 48 h, 200 aps/min greičiu 55 °C. Po inkubacijos laiko, mėginiai yra centrifuguojami 10 min 3000 g greičiu, kad būtų pašalinti terpės komponentai, o vėliau centrifuguojama dar kartą 15 min 16000 g greičiu, kad būtų surinktos AgNDs. Surinktos AgNDs plaunamos pakartotinai jas centrifuguojant ir resuspenduojant distiliuotame vandenyje. Atlikus mažiausiai penkias plovimo serijas, AgNDs yra džiovinamos 55 °C temperatūroje, kol sausas svoris nebekinta (apie 16 h). Išdžiovintos AgNDs pasveriamos ir paruošiamos tolimesniems darbams.

### 2.4.2. Sidabro nanodalelių antimikrobinio poveikio įvertinimas

Mielių ar bakterijų ląstelės auginamos iki kol pasiekia eksponentinę fazę (apie 12–14 h) skystoje YPD arba LB terpėje 35 °C arba 37 °C temperatūroje aeruojant 130 aps/min arba 180 aps/min atitinkamai. Ląstelės praskiedžiamos, kad suspensijoje būtų apie  $7 \times 10^3$  KfV/ml. Plokštelėje į šulinėlius supilama skysta YPD arba LB terpė, paruošta ląstelių suspensija ir keturių skirtingų sidabro nanodalelių tirpalas, jog AgNDs koncentracija būtų 100 µg/ml arba 10 µg/ml (bendras tūris 200 µl). Kontrolė – 100 µl YPD arba LB terpės ir 100 µl paruoštos ląstelių suspensijos. Plokštelė laikoma 35 °C arba 37 °C termostate 48 h. Po inkubacijos šulinėlių turinys perkeliamas ant agarazuotos YPD arba LB terpės, kurios vėliau laikomos 35 °C arba 37 °C termostate 48 h. Po inkubacijos, suskaičiuojamas užaugusių kolonijų skaičius. Visi eksperimentai nepriklausomai kartojami tris kartus.

### 2.4.3. *Candida lusitaniae* pseudohifų formos paruošimas

*C. lusitaniae* auginama 48 h 10 ml skystos YPD terpės aeruojant 130 aps/min 35 °C temperatūroje. Mielių suspensija praskiedžiama, kad galutinė koncentracija būtų  $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$  KfV/ml. 100 µl paruoštos mielių ląstelių suspensijos užsėjama ant

agarizuotos YPD terpės su 1 mM CuSO<sub>4</sub>. Lėkštelės inkubuojamos 5 paras 35 °C termostate. Susidariusi pseudohifų forma tikrinama mikroskopuojant.

#### 2.4.4. Lašelių testas sidabro nanodalelių MIK nustatymui

Mikroorganizmų kultūra auginama per naktį skystoje LB (*P. aeruginosa*, *S. pyogenes*, *S. aureus*), YPD (*C. lusitaniae* ir *C. guilliermondii*) arba YPD su 1 mM CuSO<sub>4</sub> (*C. lusitaniae* pseudohifai) terpėje 30 °C arba 37 °C temperatūroje aeruojant 130 aps/min arba 180 aps/min. Užauginta mikroorganizmų kultūra plaunama tris kartus jas centrifuguojant ir resuspenduojant distiliuotame vandenyje. Paruošta mikroorganizmų kultūros suspensija išpilstoma po 100 µl į plokštelės šulinėlius. Toliau pridedama po 100 µl šešių skirtingų koncentracijų AgNDų tirpalo (100 µg/ml, 50 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml ir 0,1 µg/ml bakterijoms, 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml mielėms ir 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 20 µg/ml pseudohifams). Kontrolė – 100 µl mikroorganizmų suspensija ir 100 µl distiliuoto vandens. Plokštelė dedama į 30 °C arba 37 °C temperatūros termostatą ir paliekama 4 h. Po inkubacijos, iš kiekvieno šulinėlio po 5 µl yra perkeliama ant agarizuotos LB (bakterijų atveju), YPD (mielių atveju) arba YPD su 1 mM CuSO<sub>4</sub> (mielių pseudohifų atveju) terpės. Iš kontrolės mėginių padaromas išorinis rėmelis, kad būtų aiškiai matomos testo ribos (**2.1. pav.**). Rezultatai vertinami po 24 h (bakterijų atveju) arba po 48 h (mielių ir mielių pseudohifų atveju).



**2.1. pav.** Lašelių metodo pavyzdys. Išorinis rėmelis – bandymo kontrolės.



## **2.4.5. Sidabro nanodalelių poveikis mikroorganizmų augimui**

### **2.4.5.1. *Pseudomonas aeruginosa* augimo vertinimas laike**

Augimo vertinimui yra naudojamas *P. aeruginosa* kamienas, turintis pAKlux2 plazmidę su liuciferazės genu (Addgene plazmidė #14080). Bakterijų kultūra yra kultivuojama iki  $OD_{600} = 1$  skystoje LB terpėje su 10  $\mu\text{g/ml}$  koncentracijos ampicilinu 37 °C aeruojant 180 aps/min. Į plokštelėje esančius šulinėlius supilama LB terpė su ampicilinu, paruošta bakterijų suspensija ir sidabro nanodalelės, jog galutinė AgNDs koncentracija būtų 100  $\mu\text{g/ml}$  (bendras tūris 200  $\mu\text{l}$ ). Kontrolės – 200  $\mu\text{l}$  LB su ampicilinu, LB terpė su 100  $\mu\text{g/ml}$  koncentracijos AgNDs ir 100  $\mu\text{l}$  LB terpės su ampicilinu ir 100  $\mu\text{l}$  bakterijų ląstelių suspensijos. Bakterijų augimo stebėjimas atliekamas BioTek Synergy 2 plokštelių skaitytuve, kuris matuoja liuminescenciją, 4 h matavimą atliekant kas 4 min.

### **2.4.5.2. *Candida lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* pseudohifų, *Staphylococcus aureus* ir *Streptococcus pyogenes* augimo vertinimas laike**

Bakterijų kultūros yra kultivuojamos 37 °C temperatūroje skystoje LB terpėje aeruojant 180 aps/min, o mielių kultūros – 30 °C temperatūroje skystoje YPD aeruojant 130 aps/min, mielių pseudohifų – 37 °C temperatūroje skystoje YPD su 1 mM  $\text{CuSO}_4$  aeruojant 130 aps/min iki  $OD_{600} = 1$ . Į plokštelėje esančius šulinėlius supilama LB arba YPD (YPD su 1 mM  $\text{CuSO}_4$ ) skysta terpė, paruošta bakterijų arba mielių suspensija ir AgNDs, kad galutinė jų koncentracija būtų 100  $\mu\text{g/ml}$  (bendras tūris 200  $\mu\text{l}$ ). Kontrolės – 200  $\mu\text{l}$  LB arba YPD (YPD su 1 mM  $\text{CuSO}_4$ ) terpės, 100  $\mu\text{l}$  LB arba YPD (YPD su 1 mM  $\text{CuSO}_4$ ) terpės ir 100  $\mu\text{l}$  bakterijų arba mielių suspensijos ir LB arba YPD (YPD su 1 mM  $\text{CuSO}_4$ ) terpė su 100  $\mu\text{g/ml}$  koncentracijos AgNDs. Mikroorganizmų augimo stebėjimas atliekamas plokštelių skaitytuve, matuojant optinį jų tankį (bangos ilgis 600 nm) 4 h matavimą atliekant kas 10 min.

### **2.4.6. Sidabro nanodalelių ir elektroporacijos sinergistinio poveikio įvertinimas *Candida lusitaniae* ir *C. guilliermondii* mielėms**

Mielių kultūros yra kultivuojamos 30 °C temperatūroje skystoje YPD terpėje aeruojant 130 aps/min iki  $OD_{600} = 1$ . Toliau jos yra paruošiamos elektroporacijai: tris kartus praplaunamos jas centrifuguojant ir resuspenduojant distiliuotu vandeniu ir tris kartus centrifuguojant ir resuspenduojant 1 M sorbitoliu. Paruošta ląstelių suspensija prieš pat

elektroporaciją sumaišoma su sidabro nanodalelėmis, jog galutinė AgNDų koncentracija būtų 5 µg/ml (bendras tūris 80 µl) 1,5 ml mėgintuvėliuose. Paruoštas ląstelių ir AgNDų mišinys perkeliamas į elektroporacijai skirtą kiuvetę. Elektroporuojuama vienu 100 µs trukmės impulsu prie 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15 kV/cm įtampos. Po elektroporacijos ląstelių ir AgNDų mišinys perkeliamas į 1,5 ml mėgintuvėlius. Kontrolės – 80 µl mielių ląstelių suspensija, mielių ląstelių suspensija su galutinės koncentracijos 2 mM AgNO<sub>3</sub> (bendras tūris 80 µl) ir mielių suspensija su galutinės koncentracijos 5 µg/ml AgNDs (bendras tūris 80 µl). Po 5 min ląstelės dažomos 5 µl 50 µg/ml propidžio jodidu. Inkubuojama 5 min ir fluorescencija registruojama Amnis® FlowSight® tėkmės citometru (sužadavimo bangos ilgis 488 nm, propidžio jodido emisijos bangos ilgis 561 nm). Gauti duomenys apdorojami IDEAS® programa.

#### **2.4.7. Sidabro nanodalelių ir elektroporacijos sinergistinio poveikio *C. lusitaniae* vizualizacija SEM**

Ląstelės yra paruošiamos elektroporacijai ir elektroporacija yra atliekama taip pat, kaip aprašyta 2.4.6. skyriuje. Ląstelės elektroporuojamas be ir su AgNDs. Elektroporacijos parametrai – vienas 100 µs impulsas, 10 kV/cm įtampa, kontrolė – neelektroporutos ir AgNDs nepaveiktos ląstelės. Toliau ląstelės ruošiamos SEM. Ląstelės plaunamos pakartotinai jas centrifuguojant ir resuspenduojant tris kartus 1 × PBS buferiu. Ląstelės fiksuojamos 3% gliutraldehidu 2 h 4 °C temperatūroje. Po fiksavimo ląstelės vėl plaunamos centrifuguojant ir resuspenduojant 3 kartus 1 × PBS buferiu. Ląstelės fiksuojamos 3% gliutraldehidu 24–48 val. 4 °C temperatūroje. Po fiksavimo ląstelės plaunamos centrifuguojant 5 min ir resuspenduojant 3 kartus 1 × PBS buferiu. Vėliau iš ląstelių pašalinamas vanduo jas veikiant skirtingos koncentracijos etanolio: 50 %, 70 %, 80 % ir du kartus 95 %. Tarp etanolio koncentracijos keitimų, ląstelės palaikomos atitinkamos koncentracijos etanolyje 10 min kambario temperatūroje, o keičiant etanolio koncentraciją ląstelės yra nucentrifuguojamos. Po to tris kartus ląstelės yra praplaunamos ir resuspenduojamos 100 % etanoliu (ląstelės etanolyje laikomos 15 min). Ląstelių suspensija yra užlašinama ant auksu dengtų silicio plokštelių ir palaikoma, kol etanolis visiškai išgaruoja. Vėliau atliekama SEM (mikroskopas Tescan Vega 3, Čekija).

### 3. Rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1. *Geobacillus* sp. bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų sidabro nanodalelių MIK nustatymas prieš odos patogenus lašelių metodu

*Geobacillus* sp. keturių kamienų AgNDų MIK prieš *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* bakterijas, *C. lusitaniae* ir *C. guilliermondii* mieles ir *C. lusitaniae* pseudohifus buvo nustatytos lašelių metodu, remiantis (Suppi et al., 2015) metodika. Bandytas kiekvienam mikroorganizmui su kiekvieno kamieno AgNDs buvo atlikti po tris kartus. Inhibicinė koncentracija nustatoma pagal augimo inhibiciją, kai ant agarizuotos terpės nebėra stebimas kolonijų formavimas.

*S. aureus* atveju, efektyviausiu veikimo pasižymėjo *Geobacillus* sp. 25 kamieno AgNDs (**3.1. pav. a**). Šio kamieno AgNDų MIK *S. aureus* yra 10 µg/ml. *Geobacillus* sp. 18 ir 612 kamienų AgNDų MIK buvo 20 µg/ml, o *Geobacillus* sp. 95 – 100 µg/ml. Paminėtina, jog *Geobacillus* sp. 18 ir 612 kamienų 10 µg/ml ir *Geobacillus* sp. 95 kamieno 50 µg/ml koncentracijos AgNDs dalinai slopina *S. aureus* augimą, ant agarizuotos terpės matomas pavienių kolonijų, o ne ištisinio gazono, formavimas. Mūsų gauti rezultatai sutampa ir su kitų mokslininkų duomenimis. Jų tyrimų metu nustatyta, jog *Bacillus cereus* bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų AgNDų MIK *S. aureus* yra 12,5 µg/ml (Barros et al., 2018). Šie rezultatai yra panašūs į *Geobacillus* sp. 25 kamieno MIK.

*S. pyogenes* atveju, žemiausia MIK taip pat nustatyta *Geobacillus* sp. 25 kamieno AgNDs (**3.1. pav. b**). Šio kamieno AgNDų MIK *S. pyogenes* yra 20 µg/ml. Tuo tarpu *Geobacillus* sp. 18 kamieno AgNDų MIK yra 50 µg/ml, o *Geobacillus* sp. 95 ir 612 kamienų – 100 µg/ml. Paminėtina, jog *Geobacillus* sp. 25 kamieno 10 µg/ml, *Geobacillus* sp. 18 ir *Geobacillus* sp. 95 kamieno 50 µg/ml koncentracijų AgNDs dalinai slopino *S. pyogenes* augimą. Mūsų žiniomis, AgNDų poveikis *S. pyogenes* bakterijoms buvo tirtas pirmą kartą. Tyrimai, analizuojantys AgNDų poveikį kitoms *Streptococcus* genties rūšims buvo atlikti (Mahmoud et al., 2016). Jų metu autoriai nustatė, kad *B. pumilus* bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų AgNDų MIK prieš *S. bovis* yra 5 µg/ml.

Skirtingai nei kitų bakterijų atveju, *P. aeruginosa* efektyviausiai veikia *Geobacillus* sp. 95 kamieno AgNDs. Šio kamieno AgNDų MIK *P. aeruginosa* yra 10 µg/ml. *Geobacillus* sp. 18 ir 612 kamienų AgNDų MIK *P. aeruginosa* yra 50 µg/ml, o *Geobacillus* sp. 25 – 100 µg/ml. Kitų mokslininkų darbuose nustatyta, kad *B. cereus* bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų AgNDų MIK *P. aeruginosa* yra 3,12 µg/ml, o *Streptomyces* sp.

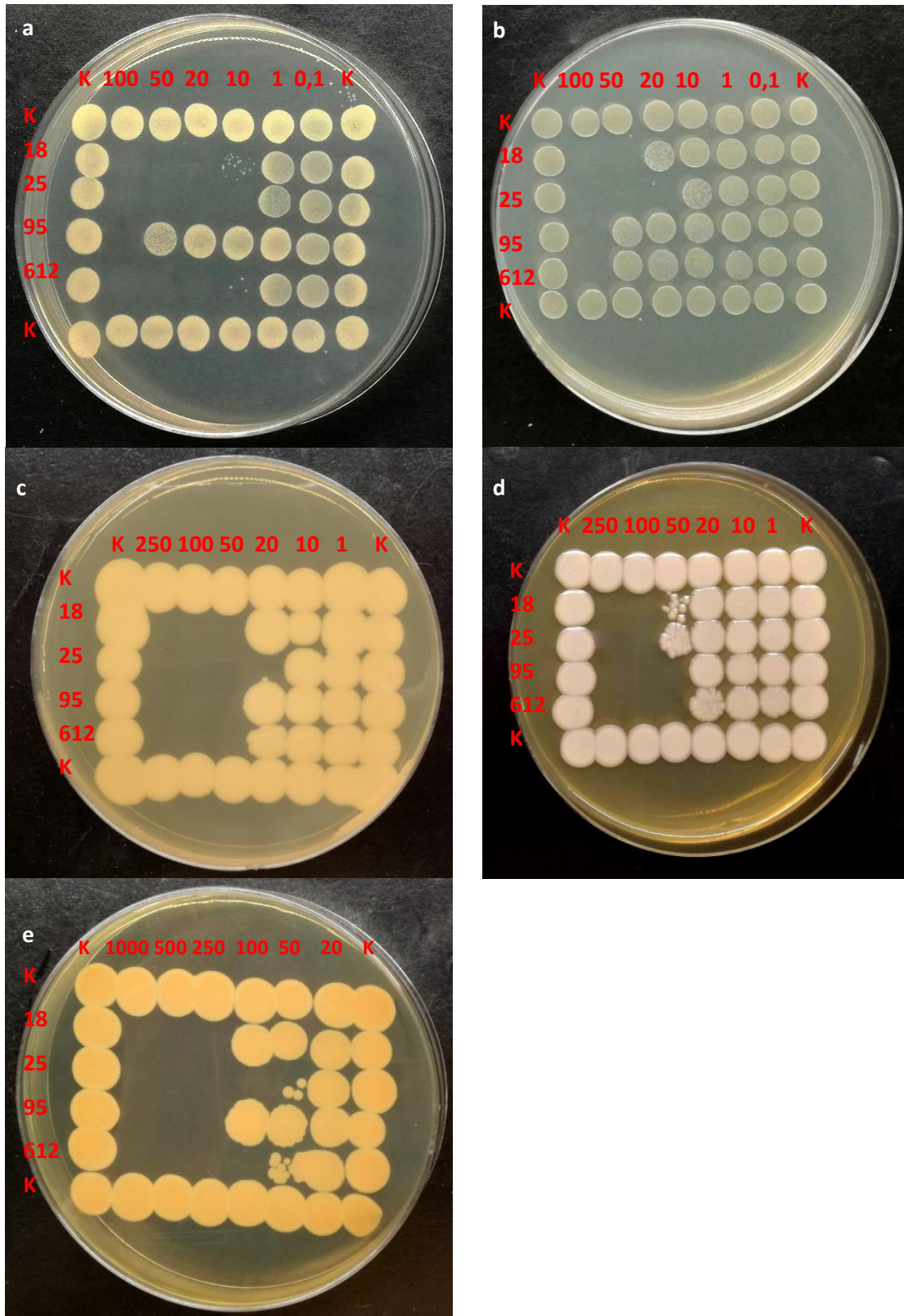
AgNDų MIK yra 10 µg/ml (Barros et al., 2018). *Streptomyces* sp. AgNDų MIK *P. aeruginosa* sutampa su *Geobacillus* sp. 95 kamieno AgNDų.

Vertinant AgNDų priešgrybelinį poveikį nustatyta, kad efektyviausiu priešgrybeliniu aktyvumu prieš *C. lusitaniae* pasižymėjo *Geobacillus* sp. 25 kamieno AgNDs (**3.1. pav. c**). Šio kamieno AgNDų MIK *C. lusitaniae* yra 20 µg/ml. Kitų *Geobacillus* sp. kamienų AgNDų MIK buvo 50 µg/ml.

Kitai mielių rūšiai, *C. guilliermondii*, žemiausios MIK reikšmės nustatytos *Geobacillus* sp. 95 ir 612 kamienų AgNDų (**3.1. pav. d**). Šių kamienų AgNDų MIK *C. guilliermondii* yra 50 µg/ml. *Geobacillus* sp. 18 ir 25 kamienų AgNDų MIK šiam patogeniui yra 100 µg/ml. *Geobacillus* sp. 18 ir 25 kamienų 50 µg/ml AgNDs dalinai slopino *C. guilliermondii* augimą.

Poveikio pseudohifų morfologijai tyrimai parodė, kad *C. lusitaniae* pseudohifų atveju, žemiausios MIK nustatytos *Geobacillus* sp. 25 ir 612 kamienų AgNDs (**3.1. pav. e**). Šių kamienų AgNDų MIK *C. lusitaniae* pseudohifams yra 100 µg/ml. *Geobacillus* sp. 18 ir 95 kamienų AgNDų MIK *C. lusitaniae* pseudohifams yra 250 µg/ml. Tuo tarpu *Geobacillus* sp. 25 ir 612 50 µg/ml koncentracijos AgNDs dalinai slopino pseudohifinės formos augimą.

Mūsų žiniomis, AgNDų poveikis pseudohifinei morfologijai yra vertinamas pirmą kartą. Mielinės formos ląstelių tyrimai buvo atlikti Wypij ir bendraautorių (Wypij et al., 2018), kurie nustatė, jog *Streptomyces xinghaiensis* bakterijų indukuotos sintezės būdu AgNDų MIK *C. albicans* yra 32 µg/ml. Ši MIK reikšmė yra aukštesnė už *Geobacillus* sp. 25 kamieno AgNDų MIK *C. lusitaniae*, tačiau žemesnė už *Geobacillus* sp. 95 ir 612 kamienų AgNDų MIK *C. guilliermondii*. Kaip ir minėta anksčiau, AgNDų antimikrobinis poveikis priklauso tiek nuo AgNDų sintezės būdo, tiek nuo mikroorganizmo, kuris yra veikiamas, rūšies (Lara et al., 2011).

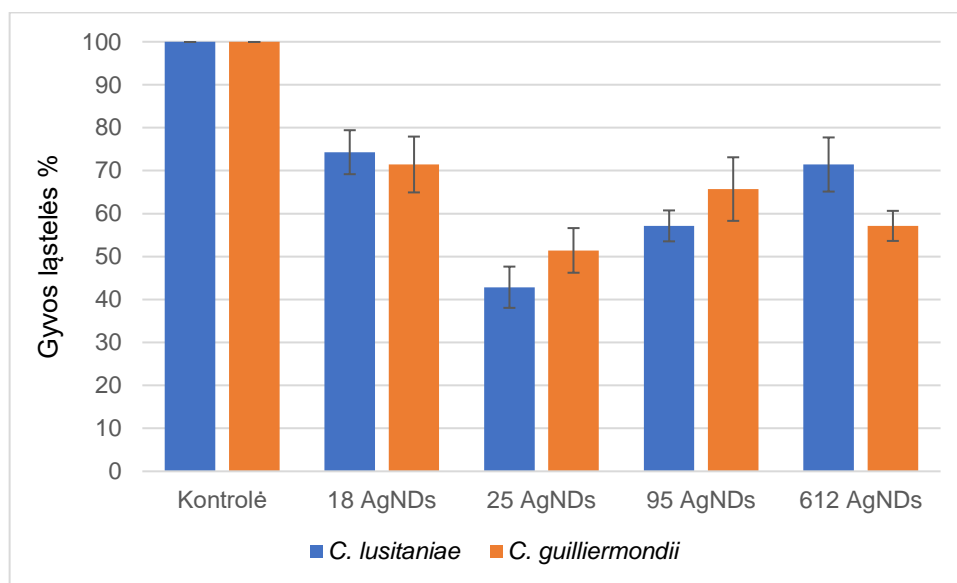


**3.1. pav.** *Geobacillus* sp. bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų AgNDų MIK *S. aureus* (a), *S. pyogenes* (b), *C. lusitaniae* (c), *C. guilliermondii* (d), mielių pseudohifus (e). K – kontrolė, viršuje AgNDų koncentracijos ( $\mu\text{g/ml}$ ), kairėje – konkretaus *Geobacillus* sp. kamieno AgNDs.

### 3.2. *Geobacillus* sp. bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų sidabro nanodalelių antimikrobinio poveikio įvertinimas

#### 3.2.1. Sidabro nanodalelių antimikrobinio poveikio *Candida* mielėms įvertinimas

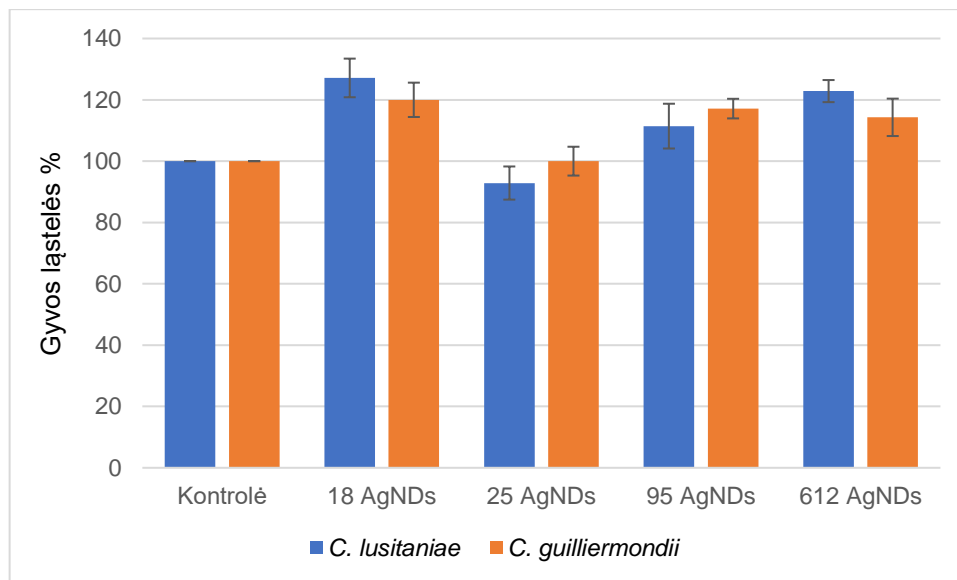
Priešgrybelinio aktyvumo įvertinimo rezultatai parodė, kad skystoje YPD terpėje auginant mielių ląsteles 48 valandas, visų keturių *Geobacillus* sp. kamienų 100 µg/ml koncentracijos AgNDs inhibavo mielių augimą (3.2. pav.). Tiek *C. lusitaniae*, tiek *C. guilliermondii* atveju didžiausiu priešgrybeliniu aktyvumu pasižymėjo *Geobacillus* sp. 25 kamieno AgNDs. *Geobacillus* sp. 25 kamieno AgNDs gyvybingų mielių ląstelių skaičius atitinkamai sumažėjo  $57,14 \pm 4,81$  % ir  $48,57 \pm 5,42$  %, *Geobacillus* sp. 18 kamieno AgNDs –  $25,71 \pm 5,12$  % ir  $28,57 \pm 6,34$  %, *Geobacillus* sp. 95 –  $42,86 \pm 3,66$  % ir  $34,29 \pm 7,35$  %, *Geobacillus* sp. 612 –  $28,57 \pm 6,39$  % ir  $42,86 \pm 3,62$  %.



**3.2. pav.** *Geobacillus* sp. bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų AgNDų (100 µg/ml) poveikis *C. lusitaniae* ir *C. guilliermondii* mielių ląstelėms po 48 h. Kontrolė – pradinis ląstelių skaičius; skaičiais nurodytas *Geobacillus* sp. kamienas.

AgNDų koncentraciją sumažinus 10 kartų, priešgrybelinis AgNDų poveikis išliko. Po 48 h inkubacijos skystoje terpėje su 10 µg/ml koncentracijos *Geobacillus* sp. 25 kamieno AgNDs, *C. lusitaniae* gyvų mielių ląstelių skaičius sumažėjo  $7,14 \pm 5,40$  %, o *C. guilliermondii* atveju, lyginant su pradiniu ląstelių skaičiumi, gyvų ląstelių skaičius išliko panašus, kas taip pat rodo, jog tokios koncentracijos AgNDs slopina mielių augimą (3.3. pav.). Kitų *Geobacillus* sp. kamienų AgNDs taip pat slopino mielių augimą, nors ir ląstelių skaičius

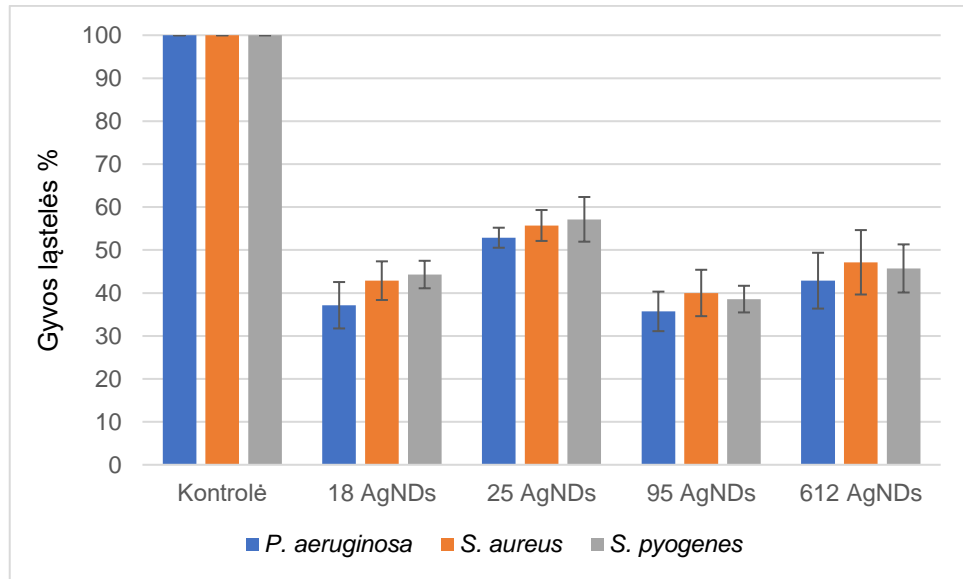
lyginant su pradiniu ląstelių skaičiumi padidėjo 11,43–27,14 %. 48 h auginti kontroliniai mėginiai parodė, kad po 48 h inkubacijos terpėje be AgNDų, ant agarizuotos terpės formuojamas išsivysčiusis mielių gazonas, o po inkubacijos su AgNDs matomos pavienės kolonijos.



**3.3. pav.** *Geobacillus* sp. bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų AgNDų (10 µg/ml) poveikis *C. lusitaniae* ir *C. guilliermondii* mielių ląstelėms po 48 h. Kontrolė – pradinis ląstelių skaičius; skaičiais nurodytas *Geobacillus* sp. kamienas.

### 3.2.2. Sidabro nanodalelių antibakterinio poveikio įvertinimas

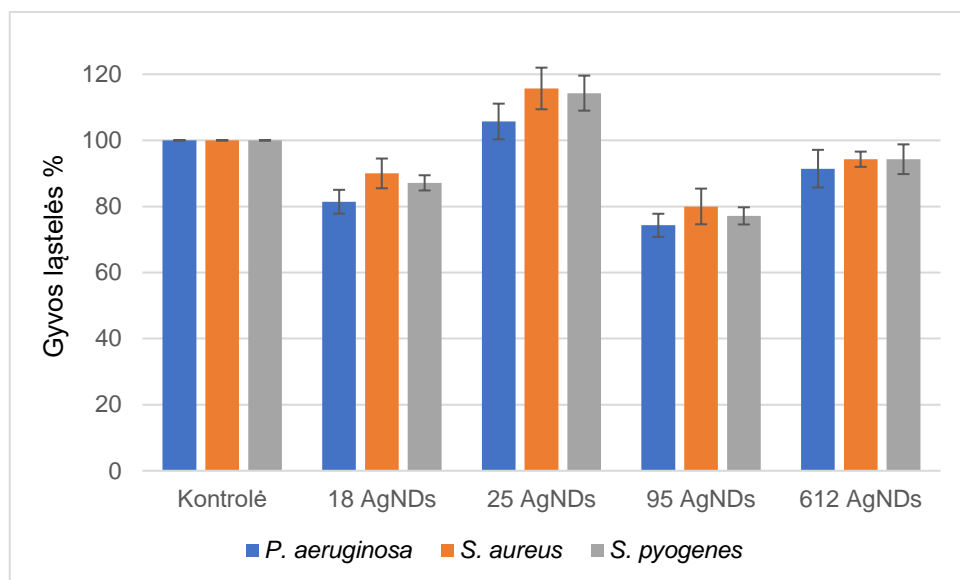
Skystoje LB terpėje su 100 µg/ml koncentracijos AgNDs, po 48 h inkubacijos visų keturių *Geobacillus* sp. kamienų koncentracijos AgNDs inhibavo bakterijų augimą (**3.4. pav.**). Visų bakterijų atveju didžiausiu antibakteriniu aktyvumu pasižymėjo *Geobacillus* sp. 95 kamieno AgNDs. Šio kamieno AgNDs nužudė  $64,29 \pm 4,63$  % *P. aeruginosa* ląstelių lyginant su pradiniu ląstelių skaičiumi, nužudė  $60,0 \pm 5,44$  % *S. aureus* ląstelių ir  $61,43 \pm 3,17$  % *S. pyogenes* ląstelių. *Geobacillus* sp. 18 kamieno AgNDs nužudė atitinkamai  $62,86 \pm 5,49$  %,  $57,14 \pm 4,56$  % ir  $55,71 \pm 3,23$  %, *Geobacillus* sp. 25 kamieno –  $47,14 \pm 2,33$  %,  $44,29 \pm 3,60$  % ir  $42,86 \pm 5,24$  %, o *Geobacillus* sp. 612 –  $57,14 \pm 6,58$  %,  $52,86 \pm 7,56$  % ir  $54,29 \pm 5,61$  % pradinį ląstelių skaičių.



**3.4. pav.** *Geobacillus* sp. bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų AgNDų (100 µg/ml) poveikis *P. aeruginosa*, *S. aureus* ir *S. pyogenes* bakterijų ląstelėms po 48 h. Kontrolė – pradinis ląstelių skaičius; skaičiais nurodytas *Geobacillus* sp. kamienas.

Sumažinus AgNDų koncentraciją iki 10 µg/ml, *Geobacillus* sp. kamienų 18, 95 ir 612 AgNDs inhibavo bakterijų augimą po 48 valandų (**3.5. pav.**). Visų bakterijų atveju didžiausiu antibakteriniu aktyvumu pasižymėjo taip pat *Geobacillus* sp. 95 kamieno AgNDs. Šio kamieno AgNDs nužudė  $25,71 \pm 3,51$  % *P. aeruginosa* ląstelių,  $20,0 \pm 5,42$  % *S. aureus* ląstelių ir  $22,86 \pm 2,69$  % *S. pyogenes* ląstelių, lyginant su pradiniu ląstelių skaičiumi. *Geobacillus* sp. 18 kamieno AgNDs nužudė atitinkamai  $18,57 \pm 3,68$  %,  $10,0 \pm 4,57$  % ir  $12,86 \pm 2,30$  % ląstelių, lyginant su pradiniu ląstelių skaičiumi, *Geobacillus* sp. 612 kamieno –  $8,57 \pm 5,77$  %,  $5,71 \pm 2,37$  % ir  $5,71 \pm 4,52$  %. *Geobacillus* sp. 25 kamieno AgNDs taip pat slopino bakterijų augimą, nors ir gyvų ląstelių skaičius padidėjo, lyginant su pradiniu ląstelių skaičiumi,  $5,71$ – $15,71$  %. 48 h auginti kontroliniai mėginiai parodė, kad po 48 h inkubacijos terpėje be AgNDų, ant agarizuotos terpės formuojamas ištisinis mielių gazonas, o po inkubacijos su AgNDs matomos pavienės kolonijos.





**3.5. pav.** *Geobacillus* sp. bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų AgNDų (10 µg/ml) poveikis *P. aeruginosa*, *S. aureus* ir *S. pyogenes* bakterijų ląstelėms po 48 h. Kontrolė – pradinis ląstelių skaičius; skaičiais nurodytas *Geobacillus* sp. kamienas.

Šie tyrimai parodė, kad *Geobacillus* sp. geba sintetinti antimikrobinio poveikiu pasižyminčias AgNDs. Tai sutampa su kitų autorių atliktais tyrimais, kurie parodė, jog *Bacillus* genties bakterijų indukuotos sintezės būdu gautos AgNDs stabdo gramteigiamų, gramneigiamų bakterijų ir mielių augimą (Mahmoud et al., 2016). Ghasemi et al. (2018) tyrė *G. stearothermophilus* bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų AgNDų antimikrobinį poveikį. Jų tyrimo metu buvo parodyta, kad *S. mutans* ir *S. sobrinus* bakterijų gyvybingumas krenta 97 %, o *C. albicans* ir *C. glabrata* mielių – 20 % (Ghasemi et al., 2018). Ankstesni Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų instituto Eukariotų molekulinės mikrobiologijos laboratorijos darbai taip pat parodė *Geobacillus* sp. indukuotos sintezės būdu gautų AgNDų antimikrobinį poveikį odos patogenams diskų difuzijos metodu (Szczęsniak, 2018). Termofilinių *Geobacillus* sp. bakterijų pritaikymas AgNDų gavimui leidžia išvengti mikrobiologinio užteršimo bei šios bakterijos yra nepavojingos žmogui.

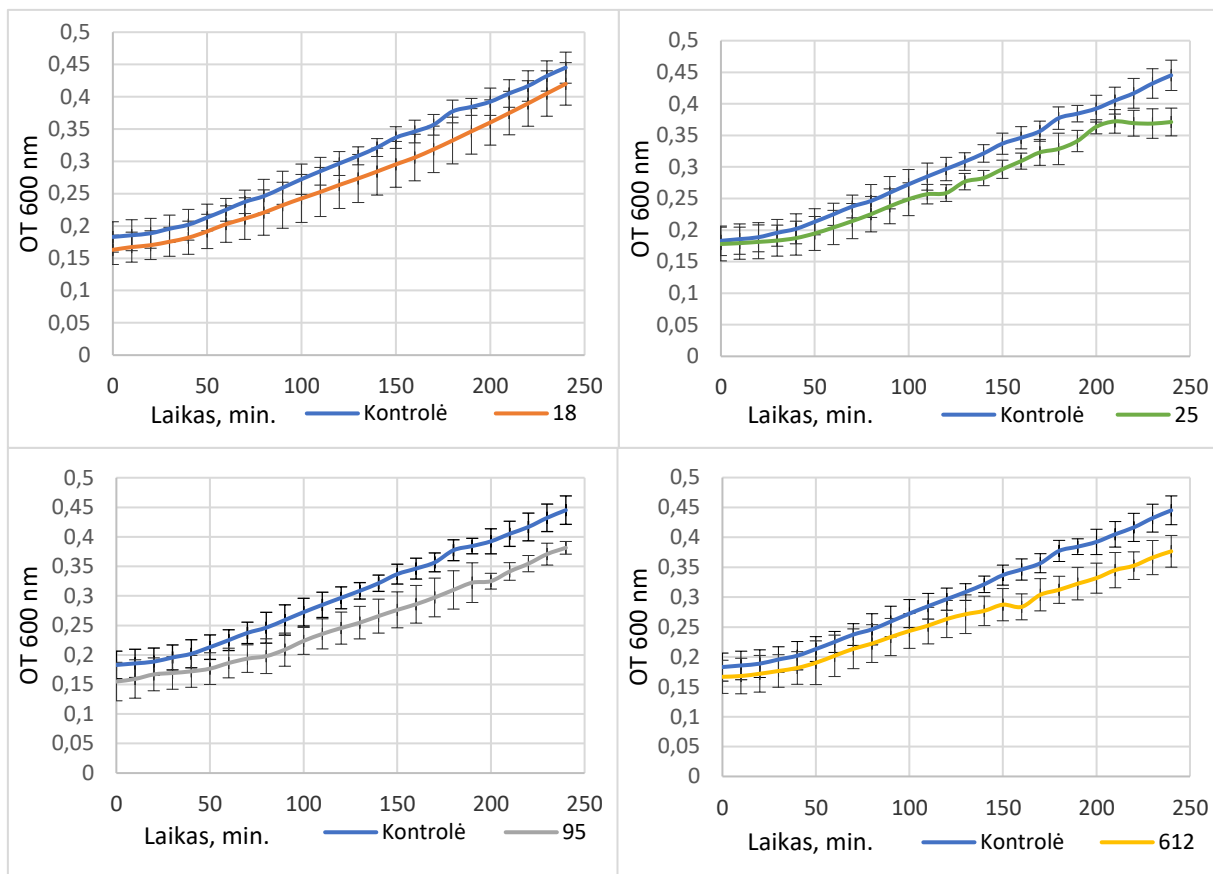
Kitų autorių tyrimuose buvo parodyta, kad antimikrobinio poveikio pasireiškimui yra svarbus AgNDų dydis – mažesnio dydžio AgNDs efektyviau veikia prieš mikroorganizmus (Agnihotri et al., 2014). Tokia hipotezė buvo patvirtina ir šio darbo metu – *Geobacillus* sp. 95 kamieno AgNDų skersmuo yra mažiausias (jų skersmuo yra 39,9 nm) ir jos pasižymėjo efektyviausiu priešmikrobinio veikimu prieš tirtas bakterijų kultūras. Gauti rezultatai parodė, kad AgNDs efektyviau veikia prieš gramneigiamas bakterijas nei prieš gramteigiamas, o tai sutampa su kitų autorių atliktų tyrimų duomenimis (Tho et al., 2013).

Priešingai nei bakterijų atveju, didžiausiu priešgrybeliniu aktyvumu pasižymėjo *Geobacillus* sp. 25 kamieno AgNDs, kurių skersmuo apie 72,77 nm. Tai gali būti paaiškinama tuo, kad AgNDų toksiškumas priklauso ne tik nuo jų dydžio, bet ir jų kompozicijos, vidinių savybių ir mikroorganizmo, kuris yra veikiamas, rūšies (Lara et al., 2011).

### **3.3. *Geobacillus* sp. bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų AgNDų antimikrobinio poveikio dinamikos įvertinimas**

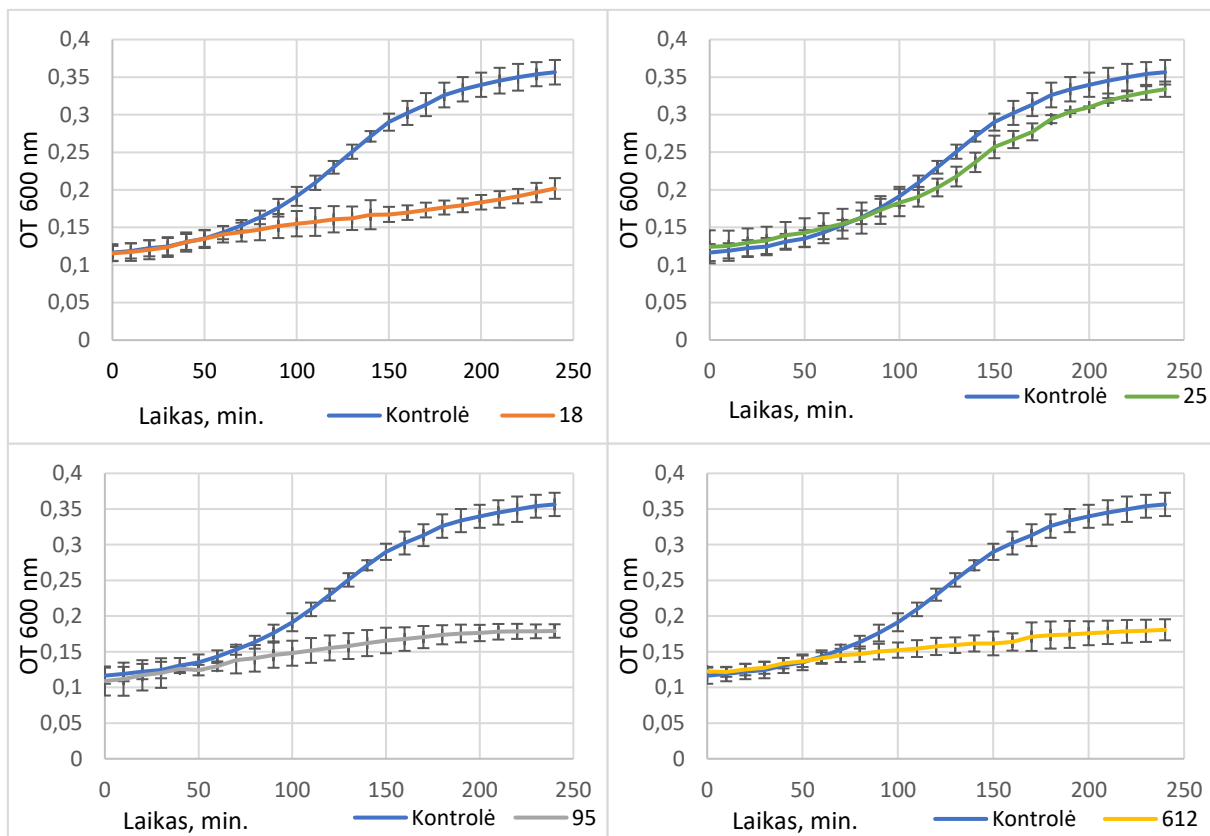
Siekiant išsiaiškinti AgNDų poveikio dinamiką (po kiek laiko pasireiškia antimikrobinis poveikis ir kaip greitai nužudomos ląstelės), tiriamieji kamieniai buvo inkubuojami su 100 µg/ml koncentracijos kiekvieno *Geobacillus* sp. kamieno AgNDs. Vertinimas atliktas pirmas keturias augimo valandas, siekiant nustatyti, kuriuo laiko momentu AgNDs stabdo mikroorganizmų augimą. Augimo vertinimas laike atliktas matuojant tirtų kultūrų OT (600 nm), išskyrus *P. aeruginosa* atveju, kai vertinimas atliktas matuojant liuminescencijos intensyvumą.

*S. aureus* augimo vertinimo laike rezultatai rodo, kad terpėje esant 100 µg/ml koncentracijos AgNDų, *Geobacillus* sp. 18 kamieno AgNDs statistiškai patikimai nestabdo *S. aureus* augimo pirmąsias keturias augimo valandas, *Geobacillus* sp. 25 ir 95 kamienų AgNDs augimą pradeda stabdyti 120 min, o *Geobacillus* sp. 612 – 140 min (**3.6. pav.**).



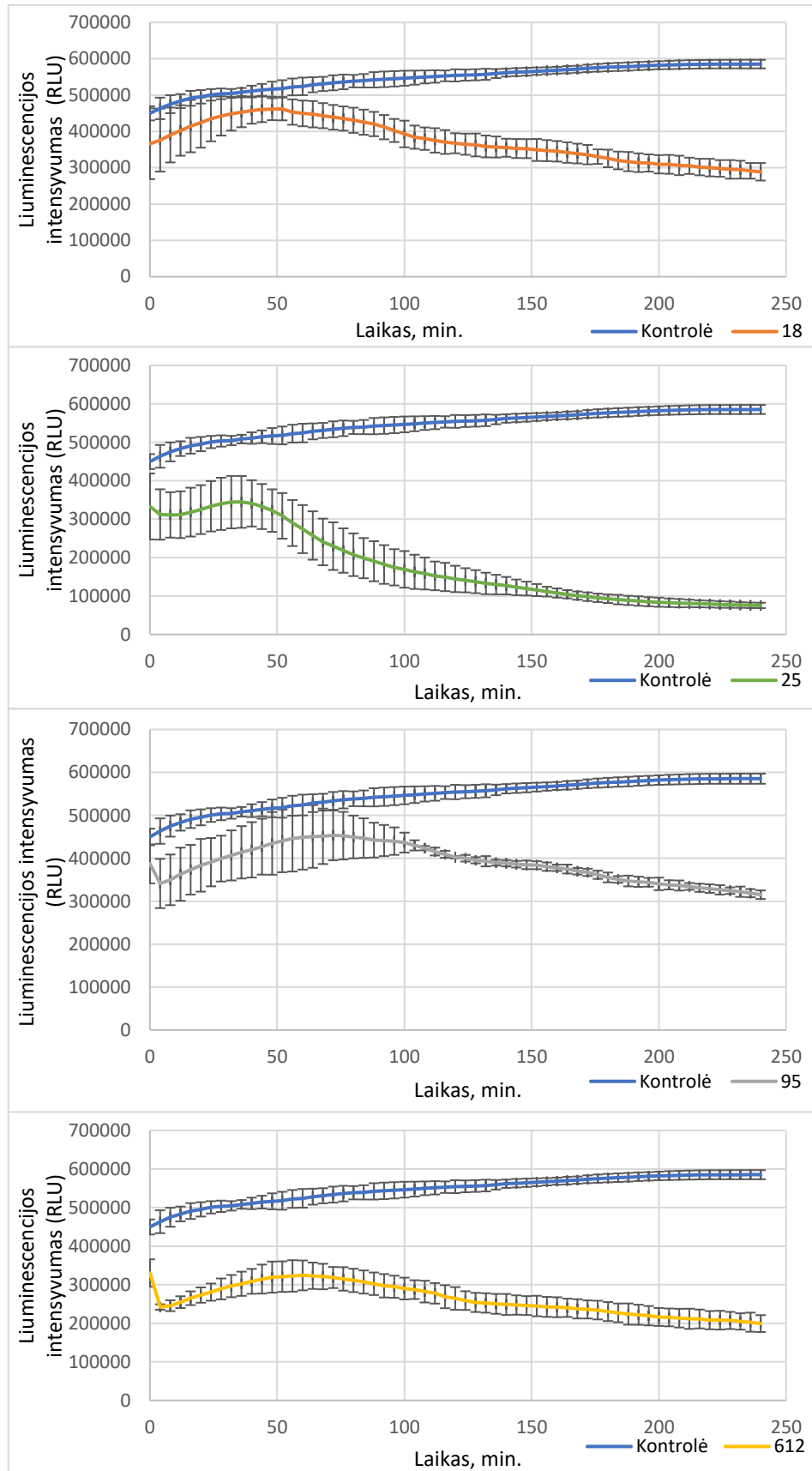
**3.6. pav.** *S. aureus* augimo vertinimas laike pirmąsias keturias augimo valandas. Kontrolė – AgNDs nepaveiktos ląstelės; skaičiais nurodytos konkretaus *Geobacillus* sp. kamieno AgNDs.

*S. pyogenes* atveju, vertinant bakterijų ląstelių augimą laike, kai terpėje yra 100 µg/ml koncentracijos AgNDų, *Geobacillus* sp. 18 ir 612 kamienų AgNDs statistiškai patikimai *S. pyogenes* augimą pradeda stabdyti 90 min, *Geobacillus* sp. 25 kamieno – 120 min, o *Geobacillus* sp. 95 – 100 min (**3.7. pav.**).



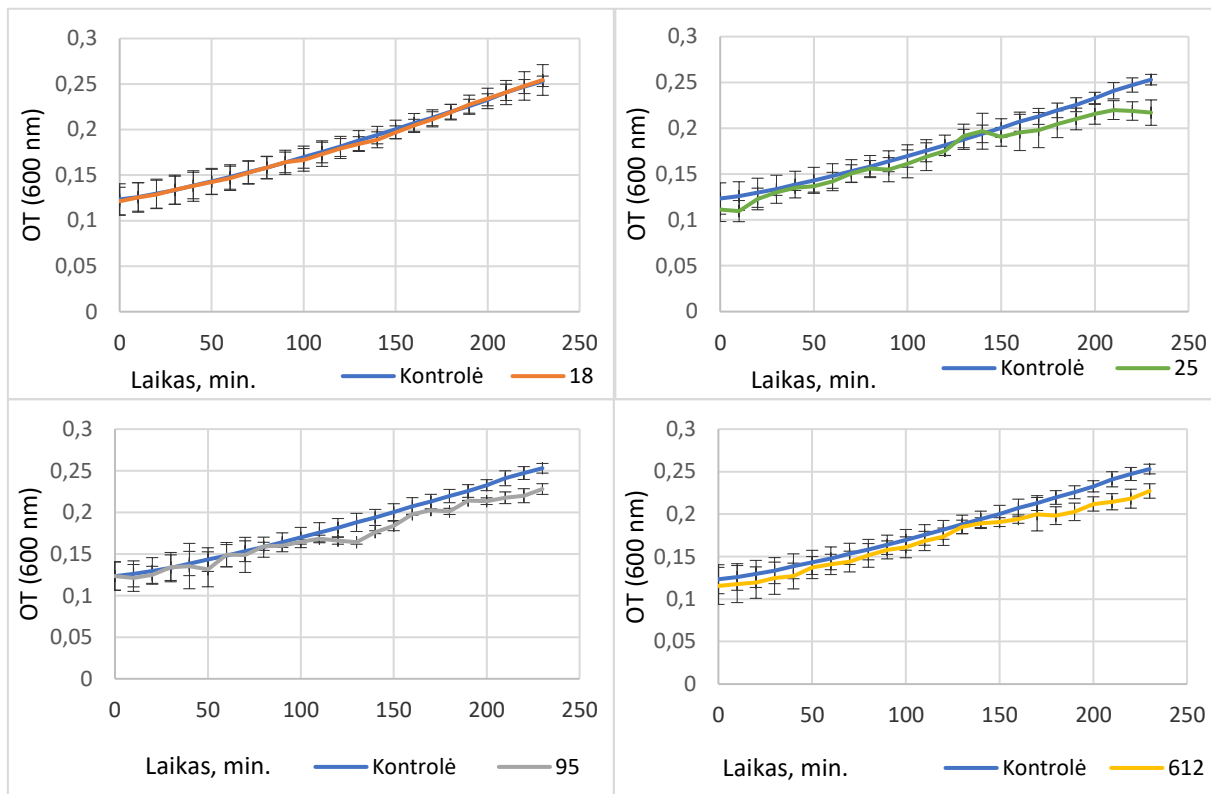
**3.7. pav.** *S. pyogenes* augimo vertinimas laike pirmąsias keturias augimo valandas. Kontrolė – AgNDs nepaveiktos ląstelės; skaičiais nurodytos konkretaus *Geobacillus* sp. kamieno AgNDs.

*P. aeruginosa* augimo dinamikos stebėjimui buvo parinktas kamienas, turintis plazmidę su liuciferazės genu. Liuminescencijos matavimas leidžia tiksliai nustatyti gyvų ląstelių skaičių, kadangi liuminescenciją skleidžia tik gyvos ląstelės. Rezultatai rodo, kad terpėje esant 100 µg/ml AgNDų, *Geobacillus* sp. 18 kamieno AgNDs statistiškai patikimai augimą pradeda stabdyti 56 min, *Geobacillus* sp. 95 kamieno – 84 min, o *Geobacillus* sp. 25 ir 612 kamienų visą matavimo laiką (**3.8. pav.**). Salomoni et al. (2017) taip pat pademonstravo, jog cheminės sintezės būdu gautų AgNDų antimikrobinis poveikis *P. aeruginosa* bakterijoms pasireiškia per pirmąją augimo valandą (Salomoni et al., 2017).



**3.8. pav.** *P. aeruginosa* augimo vertinimas laike pirmąsias keturias augimo valandas. Kontrolė – AgNDs nepaveiktos ląstelės; skaičiais nurodytos konkretaus *Geobacillus* sp. kamieno AgNDs.

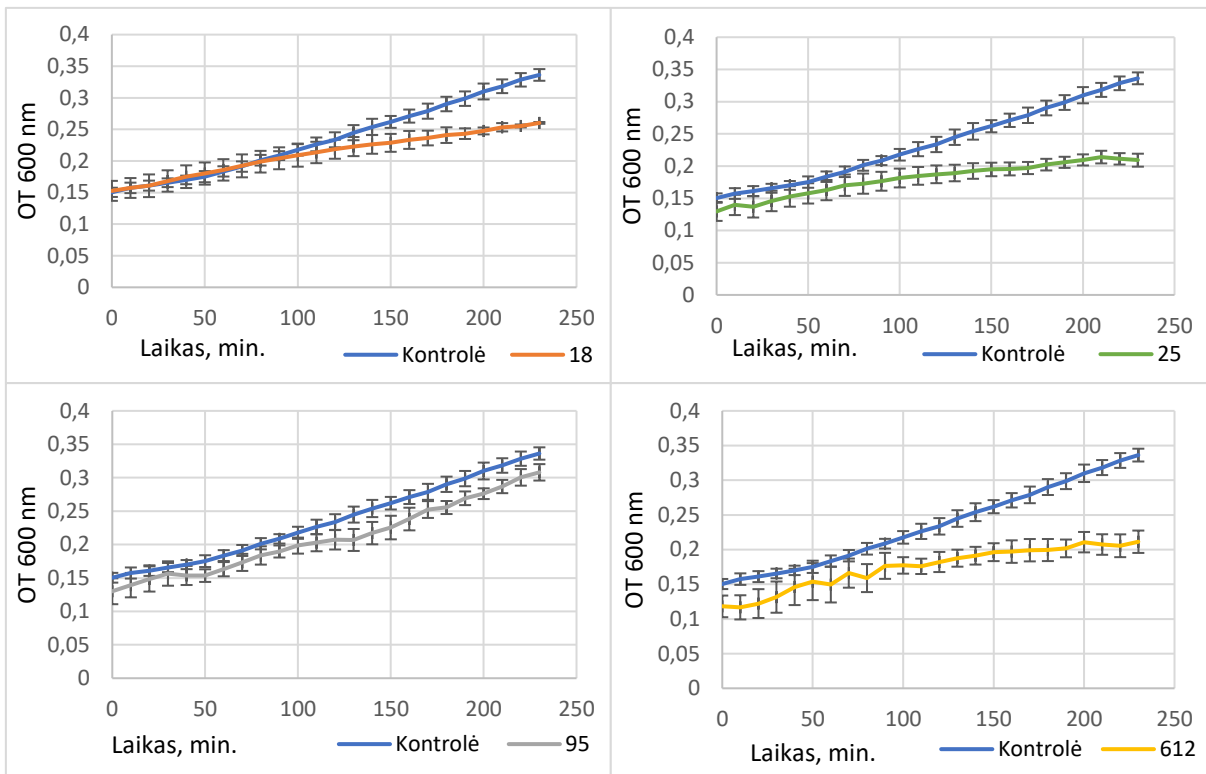
*C. lusitaniae* augimo vertinimo laike rezultatai rodo, kad terpėje esant 100 µg/ml koncentracijos AgNDų, *Geobacillus* sp. 18 statistiškai patikimai nestabdo *C. lusitaniae* augimo pirmąsias keturias augimo valandas, *Geobacillus* sp. 25 kamieno AgNDs statistiškai patikimai augimą pradeda stabdyti – 210 min, o *Geobacillus* sp. 95 ir 612 kamienų – 180 min (**3.9. pav.**).



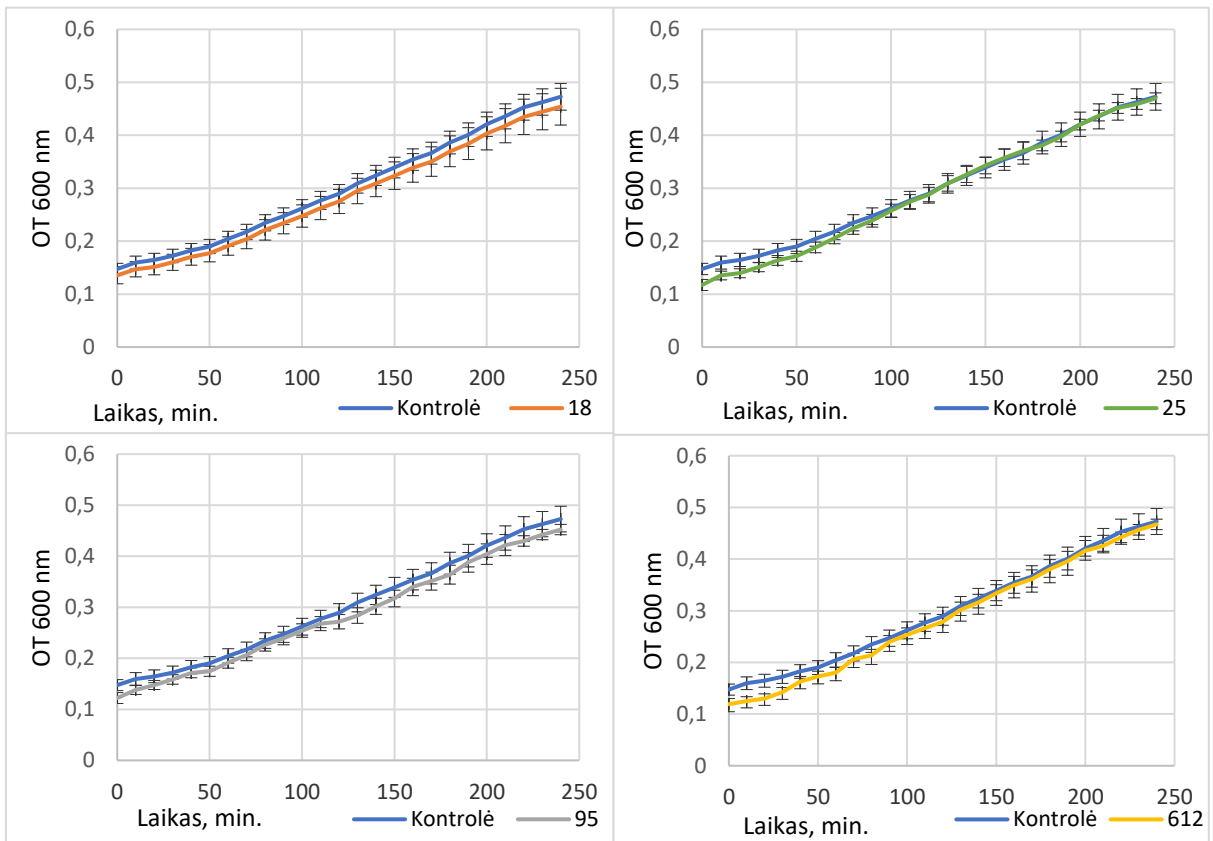
**3.9. pav.** *C. lusitaniae* augimo vertinimas laike pirmąsias keturias augimo valandas. Kontrolė – AgNDs nepaveiktos ląstelės; skaičiais nurodytos konkretaus *Geobacillus* sp. kamieno AgNDs.

Įvertinus *C. guilliermondii* augimą laike nustatyta, kad terpėje esant 100 µg/ml AgNDų, *Geobacillus* sp. 18 kamieno AgNDs statistiškai patikimai pradeda stabdyti *C. guilliermondii* augimą 150 min, *Geobacillus* sp. 25 – 80 min, *Geobacillus* sp. 95 – 130 min, o *Geobacillus* sp. 612 – 90 min (**3.10. pav.**).

*C. lusitaniae* pseudohifų atveju, vertinant jų augimą laike nustatyta, kad terpėje esant 100 µg/ml koncentracijos AgNDų, nei vieno iš keturių tirtų *Geobacillus* sp. kamienų AgNDs statistiškai patikimai nestabdo *C. lusitaniae* pseudohifinės formos augimo per pirmąsias keturias augimo valandas (**3.11. pav.**).



**3.10. pav.** *C. guilliermondii* augimo vertinimas laike pirmąsias keturias augimo valandas. Kontrolė – AgNDs nepaveiktos ląstelės; skaičiais nurodytos konkretaus *Geobacillus* sp. kamieno AgNDs.



**3.11. pav.** *C. lusitaniae* pseudohifų augimo vertinimas laike pirmąsias keturias augimo valandas. Kontrolė – AgNDs nepaveiktos ląstelės; skaičiais nurodytos *Geobacillus* sp. kamieno AgNDs.

Tyrimo rezultatai rodo, jog visų tirtų *Geobacillus* sp. kamienų AgNDų antimikrobinis poveikis prieš patogenus prasideda dar pirmosiomis augimo valandomis (išskyrus *C. lusitaniae* pseudohifų formą). Panašių tyrimų, kuriuose būtų siekiama išsiaiškinti AgNDų poveikio dinamiką (po kiek laiko pasireiškia antimikrobinis poveikis) nėra atlikta, tad šis tyrimas yra pirmasis, parodantis, kuriuo laiko momentu atsiranda antimikrobinis poveikis tirtoms odos patogenų rūšims.

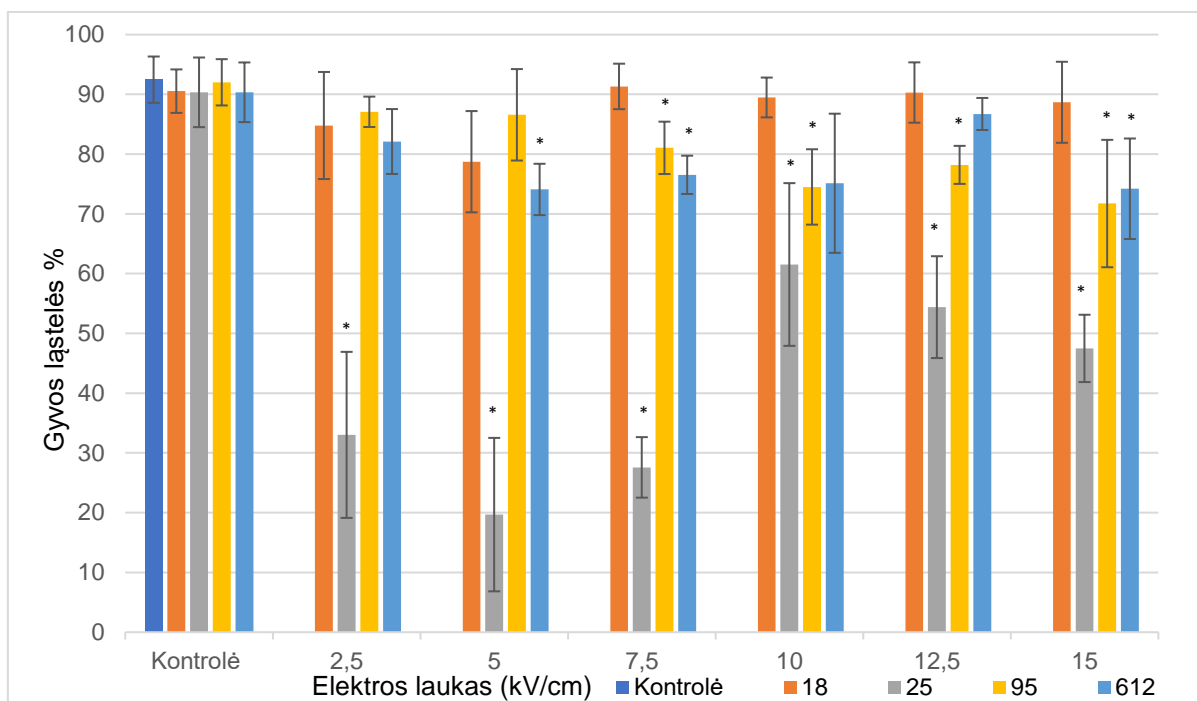
### **3.4. AgNDų ir elektroporacijos sinergistinio poveikio mielių ląstelėms įvertinimas**

Remiantis ankstesnių tyrimų rezultatais, AgNDų ir elektroporacijos sinergistinio poveikio mielių ląstelėms įvertinimui buvo parinkta žema, 5 µg/ml, AgNDų koncentracija, kuri neveikia mielių ląstelių. AgNDų ir elektroporacijos sinergistinio poveikio įvertinimas buvo atliktas su visų keturių *Geobacillus* sp. kamienų sintetinėmis AgNDs vertinant poveikį *C. lusitaniae* ir *C. guilliermondii* mielėms.

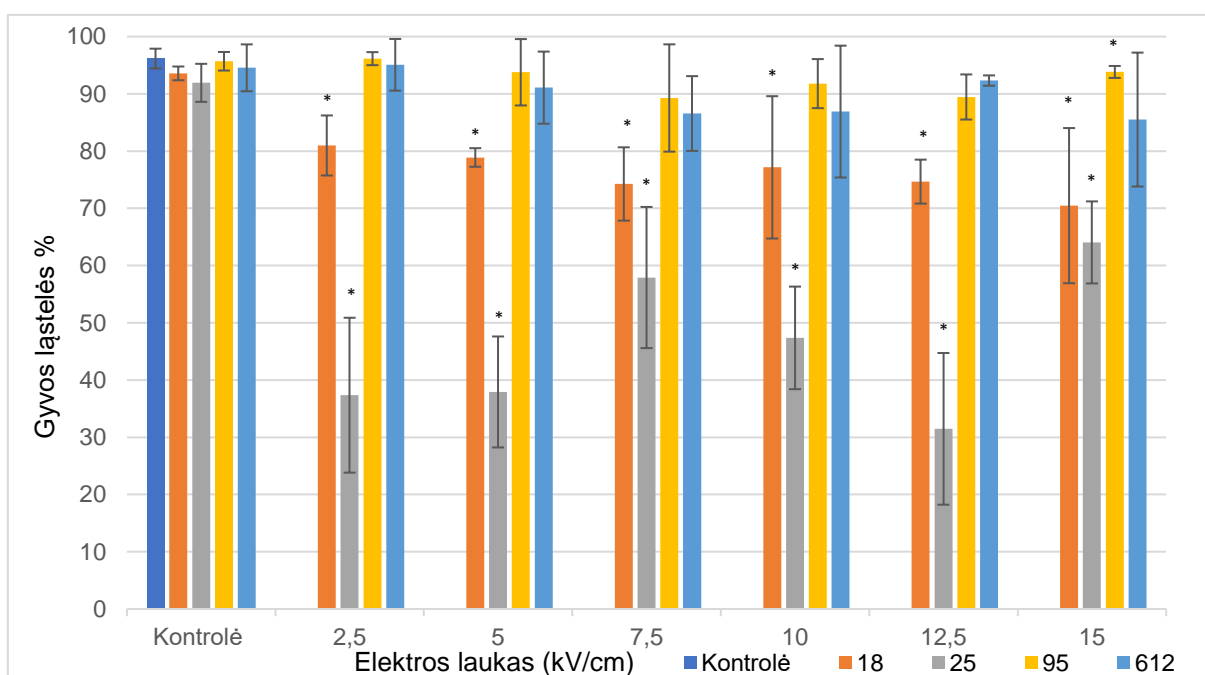
Atlikto eksperimento rezultatai rodo, kad *Geobacillus* sp. 25 kamieno sintetinės AgNDs statistiškai patikimai sumažino gyvybingų *C. lusitaniae* mielių ląstelių skaičių su visomis tirtomis elektroporacijos įtampos reikšmėmis (**3.12. pav.**). Geriausias rezultatas pasiektas ląsteles paveikus 5 kV/cm įtampa. Esant šioms sąlygomis gyvybingų ląstelių skaičius sumažėjo  $78,72 \pm 12,84$  %.

*C. guilliermondii* atveju, dviejų *Geobacillus* sp. kamienų (*Geobacillus* sp. 18 ir 25) sintetinės AgNDs ir elektroporacija statistiškai patikimai sumažino gyvybingų ląstelių skaičių su visomis tirtomis elektroporacijos įtampos reikšmėmis (**3.13. pav.**). Geriausias rezultatas pasiektas ląsteles paveikus *Geobacillus* sp. 25 kamieno AgNDs ir 12,5 kV/cm įtampa. Esant šioms sąlygoms, gyvybingų ląstelių skaičius sumažėjo  $67,27 \pm 13,25$  %. 2 mM koncentracijos AgNO<sub>3</sub> neveikė nei vienos iš tirtų mielių rūšių ląstelių gyvybingumo.





**3.12. pav.** AgNDų ir elektroporacijos sinergistinis poveikis *C. lusitaniae* mielių ląstelėms. Kontrolė – elektroporacija ir AgNDs nepaveiktos ląstelės, skaičiais nurodytas konkretaus *Geobacillus* sp. kamieno AgNDs.



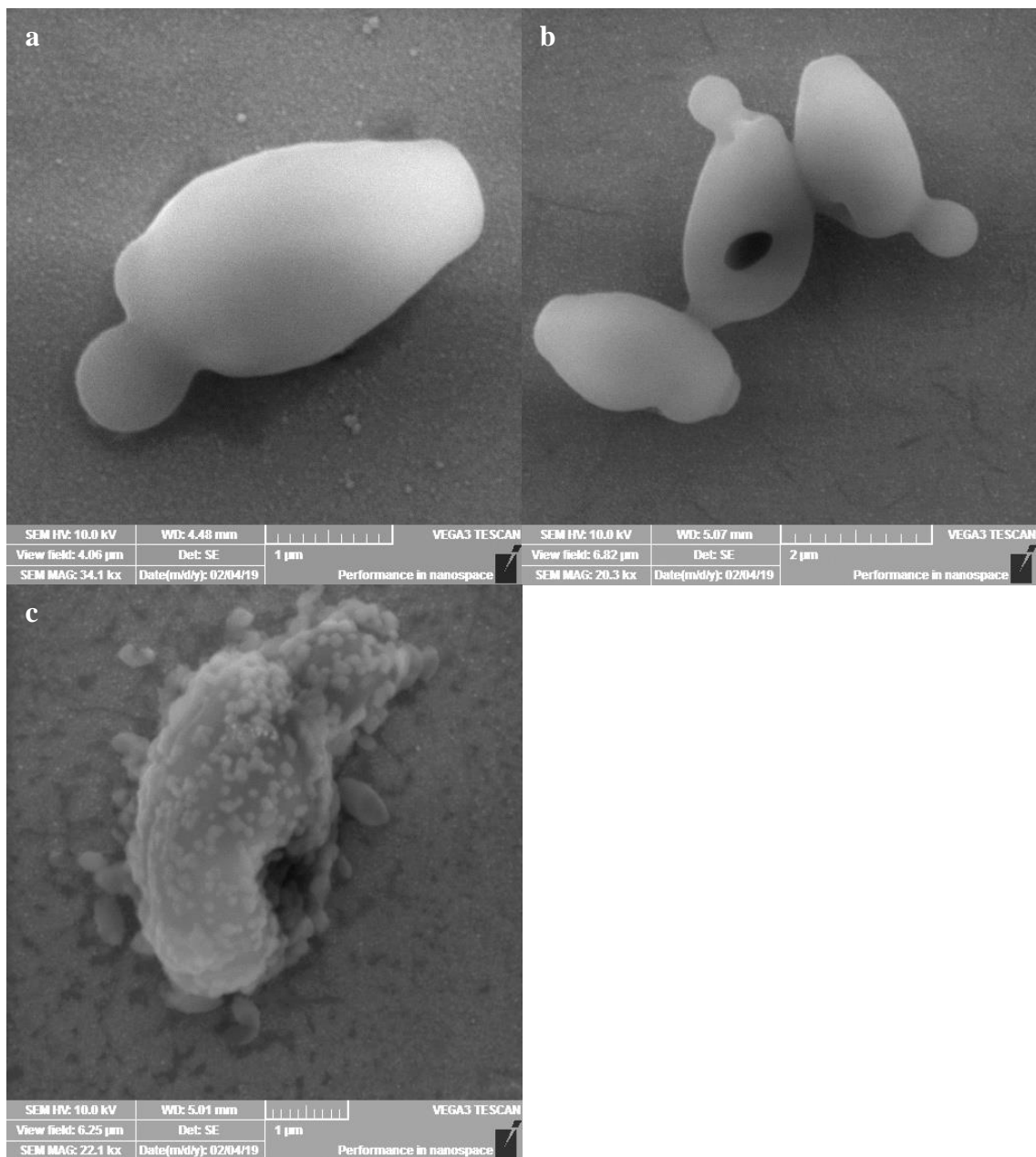
**3.13. pav.** AgNDų ir elektroporacijos sinergistinis poveikis *C. guilliermondii* mielių ląstelėms. Kontrolė – elektroporacija ir AgNDs nepaveiktos ląstelės, skaičiais nurodytas konkretaus *Geobacillus* sp. kamieno AgNDs.

Elektroporacijos parametrai buvo parinkti pagal Novickij et al. (2018) atliktą tyrimą, kuriame *C. albinans* mielių ląstelės buvo paveikiamos elektroporacija. Jų tyrimų

rezultatai rodo, kad *C. albicans* ląsteles paveikus 2,5 ir 5 kV/cm įtampa nužudoma iki 10 % ląstelių, paveikus 7,5 kV/cm įtampa – iki 20 %, 10 kV/cm – apie 30 %, 12,5 kV/cm – apie 70 %, o 15 kV/cm – apie 80 % mielių ląstelių (Novickij et al., 2018). Pritaikius elektroporaciją ir poveikį AgNDs kartu, apie 70 % ląstelių mirštamumas pasiekiamas net ir su mažesnėmis elektroporacijos įtampos reikšmėmis, dėl ko galima daryti išvadą, jog AgNDs ir elektroporacija turi sinergistinį poveikį mielių ląstelėms. Panašių tyrimų, kuriuose būtų tiriamas AgNDų ir elektroporacijos sinergistinis poveikis odos patogenams, nėra atlikta, todėl šį tyrimą galima laikyti pirmuoju.

Bendradarbiaujant su Nacionalinio fizinių ir technologijos mokslų centro mokslininkais, AgNDs ir elektroporacijos sinergistinis poveikis buvo vizualizuojamas SEM. SEM buvo pasirinktos *C. lusitaniae* mielės, *Geobacillus* sp. 25 kamieno AgNDs ir 10 kV/cm elektroporacijos įtampa. Atliktose nuotraukose matoma AgNDs ir elektroporacija nepaveikta mielių ląstelė (**3.14a pav.**). **3.14b pav.** užfiksuotos mielių ląstelės, paveiktos 10 kV/cm elektroporacijos įtampa. Be to, **3.14c pav.** užfiksuota mielių ląstelė, paveikta elektroporacijos įtampa ir AgNDs. **3.14b, c pav.** matomas stiprus ląstelės sienelės ir membranos pažeidimas po elektrinio lauko poveikio, kuris veda prie ląstelių žūties. Be to, **3.14c pav.** matoma, jog AgNDs tolygiai padengia mielių ląstelės paviršių.

Elektroporacijos įtampa ląstelėse padaro hidrofilies poras ląstelių membranose taip padidindama membranų pralaidumą medžiagoms, kurios neturi transmembraninių transporto mechanizmų (Delemotte ir Tarek, 2012). Kadangi AgNDs į ląstelių vidų patenka pro ląstelės sienelę ir citoplazminę membraną, elektroporacijos padarytos poros galimai pagerina AgNDų patekimą į ląstelių vidų. Be to, galimas variantas, jog prie poros pakraščių prisitvirtinusios AgNDs stabilizuoja elektroporacijos padarytas poras, taip neleisdamos joms užsiverti, dėl ko ląstelės žūva. Šiems teiginiams patvirtinti yra reikalingi tolimesni tyrimai.



**3.14. pav.** *C. lusitaniae* SEM nuotraukos. a) nepaveiktos ląstelės; b) 10 kV/cm elektroporacijos įtampa paveiktos ląstelės; c) *Geobacillus* sp. 25 kamieno AgNDs ir 10 kV/cm elektroporacijos įtampa paveiktos ląstelės.

## Išvados

1. Nustatytos *Geobacillus* sp. AgNDų MIK: *Geobacillus* sp. 25 kamieno AgNDų MIK *S. aureus* yra 10 µg/ml, *S. pyogenes* ir *C. lusitaniae* yra 20 µg/ml, *C. lusitaniae* pseudohifams yra 100 µg/ml; *Geobacillus* sp. 95 kamieno AgNDų MIK *P. aeruginosa* yra 10 µg/ml, *C. guilliermondii* yra 50 µg/ml; *Geobacillus* sp. 612 kamieno AgNDų MIK *C. guilliermondii* yra 50 µg/ml, *C. lusitaniae* pseudohifams yra 100 µg/ml;
2. Visų naudotų *Geobacillus* sp. kamienų sintetamos AgNDs slopina *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *S. aureus*, *S. pyogenes* ir *P. aeruginosa* augimą. Mielių atveju efektyviausiai veikia *Geobacillus* sp. 25 kamieno AgNDs, o bakterijų atveju – *Geobacillus* sp. 95 kamieno AgNDs;
3. Per pirmąsias keturias augimo valandas *C. lusitaniae* augimą efektyviausiai stabdo *Geobacillus* sp. 95 ir 612 (nuo 180 min) kamienų AgNDs; *C. guilliermondii* – *Geobacillus* sp. 612 (nuo 90 min) kamieno AgNDs; *S. aureus* – *Geobacillus* sp. 25 ir 95 (nuo 120 min) kamienų AgNDs; *S. pyogenes* – *Geobacillus* sp. 18 ir 612 (nuo 90 min) kamienų AgNDs; *P. aeruginosa* – *Geobacillus* sp. 25 ir 612 (visą laiką) kamienų AgNDs; *C. lusitaniae* pseudohifų augimo *Geobacillus* sp. visų keturių kamienų AgNDs nestabdo per pirmąsias keturias matavimo valandas.
4. Elektroporaciją ir AgNDs kartu rodo sinergistinį efektą eliminuojant *C. lusitaniae* ir *C. guilliermondii* mielių ląsteles.

## Santrauka

Kotryna Čekuolytė

Sidabro nanodalelių, gautų po *Geobacillus* genties bakterijų indukuotos sintezės, priešmikrobinio poveikio analizė

Kylantis bakterijų ir mielių atsparumas antimikrobinėms medžiagoms bei didėjantis odos infekcijų skaičius skatina mokslininkus ieškoti naujų antimikrobinų junginių. Sidabro nanodalelės pasižymi puikiomis antimikrobinėmis savybėmis prieš įvairius patogeninius mikroorganizmus. Sidabro nanodalelių antimikrobinės savybės priklauso nuo jų dydžio, kompozicijos, paviršiaus modifikacijų ir mikroorganizmo, prieš kurį veikiama, savybių. Be to, sidabro nanodalelės pasižymi kompleksiniu poveikiu prieš mikroorganizmus, pažeisdamos jų ląstelių sienelės ir membranas, sutrikdydamos jų baltymų ir DNR sintezę bei skatindamos ROS gamybą. Šio darbo metu parodyta, jog *Geobacillus* sp. bakterijų indukuotos sintezės būdu gautos sidabro nanodalelės turi antimikrobinį poveikį prieš odos patogenus: *Candida lusitaniae* ir *C. guilliermondii* mieles, *C. lusitaniae* mielių pseudohifų formą bei *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* ir *Pseudomonas aeruginosa* bakterijas. Mielių atveju efektyviausiai veikė *Geobacillus* sp. 25 kamieno sidabro nanodalelės, tuo tarpu bakterijų atveju – *Geobacillus* sp. 95 kamieno sidabro nanodalelės. Be to, buvo nustatytos *Geobacillus* sp. kamienų gaminamų sidabro nanodalelių MIK minėtiems mikroorganizmams. Šiame darbe taip pat išanalizuota sidabro nanodalelių poveikio dinamika patogenams, siekiant išsiaiškinti, kuriuo laiko momentu prasideda jų antimikrobinis poveikis. Nustatyta, kad visų *Geobacillus* sp. kamienų AgNDų antimikrobinis poveikis prasideda per pirmąsias keturias augimo valandas (išskyrus *C. lusitaniae* pseudohifų formai). Taip pat, buvo nustatytas ir *Geobacillus* sp. bakterijų indukuotos sintezės būdu gautų sidabro nanodalelių bei elektroporacijos sinergistinis poveikis *Candida* genties mielių ląstelėms.

## Summary

Kotryna Čekuolytė

### The Analysis of Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles Synthesized by Bacteria of Genus *Geobacillus*

The growing resistance to the antimicrobial treatment and the increasing number of bacterial and fungal skin diseases are the key problems promoting the research of the new antifungal and antibacterial compounds. Silver nanoparticles have excellent antimicrobial properties against various pathogenic microorganisms. The properties of silver nanoparticles depend from their size, composition, surface modifications, and the properties of microorganism to which they are exposed. In addition, silver nanoparticles have a complex effect against microorganisms, damaging their cell walls and membranes, disrupting their protein and DNA synthesis, and promoting the production of ROS. This thesis describes the antimicrobial effects of silver nanoparticles synthesized by bacteria of genus *Geobacillus* against skin pathogens: *Candida lusitaniae* and *C. guilliermondii* yeasts, the pseudohyphae of *C. lusitaniae*, and *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. In the case of yeasts, the most effective were *Geobacillus* sp. 25 strain silver nanoparticles, whereas in the case of bacteria, *Geobacillus* sp. 95 strain silver particles were the most effective. In addition, the MIC values of *Geobacillus* sp. silver nanoparticles for the mentioned microorganisms were evaluated. This thesis also analyzes the dynamics of the effect of silver nanoparticles on pathogens to find out at what point in time their antimicrobial activity begins. It was determined that the antimicrobial effect of all *Geobacillus* sp. Silver nanoparticles begins within first four hours of growth (except for the pseudohyphae of *C. lusitaniae*). The synergistic effect of silver nanoparticles obtained by *Geobacillus* sp. bacteria induced synthesis and electroporation on yeast cells of the genus *Candida* was also established.

## Literatūros sąrašas

- Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*. <https://doi.org/10.1039/c3ra44507k>
- Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M. I., & Sastry, M. (2017). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Nature*, 28, 313–318. <https://doi.org/10.1038/d41586-017-07273-x>
- Allahverdiyev, A. M., Kon, K. V., Abamor, E. S., Bagirova, M., & Rafailovich, M. (2011). Coping with antibiotic resistance: Combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. <https://doi.org/10.1586/eri.11.121>
- Allen, A. M., & King, R. D. (1978). OCCLUSION, CARBON DIOXIDE, AND FUNGAL SKIN INFECTIONS. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)91084-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(78)91084-X)
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Ansari, M. A., Khan, H. M., Khan, A. A., Ahmad, M. K., Mahdi, A. A., Pal, R., & Cameotra, S. S. (2014). Interaction of silver nanoparticles with *Escherichia coli* and their cell envelope biomolecules. *Journal of Basic Microbiology*, 54(9), 905–915. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300457>
- Barros, C., Fulaz, S., Stanisic, D., & Tasic, L. (2018). Biogenic Nanosilver against Multidrug-Resistant Bacteria (MDRB). *Antibiotics*. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030069>
- Begum, N. A., Mondal, S., Basu, S., Laskar, R. A., & Mandal, D. (2009). Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.01.012>
- Beyth, N., Hourri-Haddad, Y., Domb, A., Khan, W., & Hazan, R. (2015). Alternative antimicrobial approach: Nano-antimicrobial materials. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2015/246012>
- Bhainsa, K. C., & D'Souza, S. F. (2006). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.11.026>
- Bhattacharya, D., & Gupta, R. K. (2005). Nanotechnology and potential of microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1080/07388550500361994>
- Bomar, L., Brugger, S. D., Yost, B. H., Davies, S. S., & Lemon, K. P. (2016). *Corynebacterium accolens* Releases Antipneumococcal Free Fatty Acids from Human Nostril and Skin Surface Triacylglycerols. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mbio.01725-15>
- Bonifaz, A., Rojas, R., Tirado-Sánchez, A., Chávez-López, D., Mena, C., Calderón, L., & María, P. O. R. (2016). Superficial Mycoses Associated with Diaper Dermatitis. *Mycopathologia*. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0020-9>
- Brayner, R. (2008). The toxicological impact of nanoparticles. *Nano Today*. [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(08\)70015-X](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(08)70015-X)

- Brown, G. M., & Laxminarayana, R. (2001). Economics of Antibiotic Resistance : A Theory of Optimal Use Economics of Antibiotic Resistance : A Theory of Optimal Use. *Journal of Environmental Economics and Management*, 42(2), 183–206.
- Brüggemann, H., Henne, A., Hoster, F., Liesegang, H., Wiezer, A., Strittmatter, A., ... Gottschalk, G. (2004). The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1100330>
- Buffie, C. G., & Pamer, E. G. (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri3535>
- Burrowes, B., Harper, D. R., Anderson, J., McConville, M., & Enright, M. C. (2011). Bacteriophage therapy: Potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. <https://doi.org/10.1586/eri.11.90>
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
- Carlet, J., Collignon, P., Goldmann, D., Goossens, H., Gyssens, I. C., Harbarth, S., ... Voss, A. (2011). Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60401-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60401-7)
- Chambers, H. F., & Deleo, F. R. (2010). Waves of resis. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 629–641. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>.Waves
- Chopra, R., Alderborn, G., Podczec, F., & Newton, J. M. (2002). The influence of pellet shape and surface properties on the drug release from uncoated and coated pellets. *International Journal of Pharmaceutics*. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00104-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00104-7)
- Cunningham, M. W. (2000). Pathogenesis of group a streptococcal infections. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.470-511.2000>
- Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., & Yadav, V. (2016). Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>
- Das, R., Gang, S., & Nath, S. S. (2011). Preparation and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. <https://doi.org/10.4236/jbnt.2011.24057>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia (Madrid, Spain)*. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- de Castro, A. P., Fernandes, G. da R., & Franco, O. L. (2014). Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00489>
- de Kraker, M. E. A., Jarlier, V., Monen, J. C. M., Heuer, O. E., van de Sande, N., & Grundmann, H. (2013). The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: Trends from the European antimicrobial resistance surveillance system. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12028>
- De Souza Cândido, E., E Silva Cardoso, M. H., Sousa, D. A., Viana, J. C., De Oliveira-Júnior, N. G., Miranda, V., & Franco, O. L. (2014). The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. *Peptides*. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.02.003>



- Delemotte, L., & Tarek, M. (2012). Molecular dynamics simulations of lipid membrane electroporation. *Journal of Membrane Biology*. <https://doi.org/10.1007/s00232-012-9434-6>
- Du, J., Singh, H., & Yi, T. H. (2016). Antibacterial, anti-biofilm and anticancer potentials of green synthesized silver nanoparticles using benzoin gum (*Styrax benzoin*) extract. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1666-x>
- El Zowalaty, M. E., Al Thani, A. A., Webster, T. J., El Zowalaty, A. E., Schweizer, H. P., Nasrallah, G. K., ... Ashour, H. M. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*: Arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiology*. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.48>
- Findley, K., Oh, J., Yang, J., Conlan, S., Deming, C., Meyer, J. A., ... Segre, J. A. (2013). Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature12171>
- Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., & Galdiero, M. (2015). Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules20058856>
- Fujii, A., Seki, M., Higashiguchi, M., Tachibana, I., Kumanogoh, A., & Tomono, K. (2014). Community-acquired, hospital-acquired, and healthcare-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Respiratory Medicine Case Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2014.03.002>
- Ghasemi, S. M., Dormanesh, B., Hosseini Abari, A., Aliasghari, A., & Farahnejad, Z. (2018). Comparative characterization of silver nanoparticles synthesized by spore extract of *Bacillus subtilis* and *Geobacillus stearothermophilus*. *Nanomed. J.*, 5(1), 46–51. <https://doi.org/10.22038/NMJ.2018.05.007>
- Goossens, H., Ferech, M., Vander Stichele, R., & Elseviers, M. (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: A cross-national database study. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)70799-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)70799-6)
- Graves, J. L., Tajkarimi, M., Cunningham, Q., Campbell, A., Nonga, H., Harrison, S. H., & Barrick, J. E. (2015). Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. *Frontiers in Genetics*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00042>
- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>
- Gupta, A., Landis, R. F., & Rotello, V. M. (2016). Nanoparticle-Based Antimicrobials: Surface Functionality is Critical. *F1000Research*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7595.1>
- Hackenberg, S., Scherzed, A., Kessler, M., Hummel, S., Technau, A., Froelich, K., ... Kleinsasser, N. (2011). Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.001>
- Hannigan, G. D., Meisel, J. S., Tyldsley, A. S., Zheng, Q., Hodkinson, B. P., SanMiguel, A. J., ... Grice, E. A. (2015). The Human Skin Double-Stranded DNA Virome: Topographical and Temporal Diversity, Genetic Enrichment, and Dynamic Associations with the Host Microbiome. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mbio.01578-15>

- Havlickova, B., Czaika, V. A., & Friedrich, M. (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x>
- Hemeg, H. A. (2017). Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *International Journal of Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S132163>
- Höfs, S., Mogavero, S., & Hube, B. (2016). Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5514-0>
- Holland, K. T., Greenman, J., & Cunliffe, W. J. (1979). Growth of Cutaneous Propionibacteria on Synthetic Medium; Growth Yields and Exoenzyme Production. *Journal of Applied Bacteriology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1979.tb01198.x>
- Husen, A., & Siddiqi, K. S. (2014). Phytosynthesis of nanoparticles: Concept, controversy and application. *Nanoscale Research Letters*. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-229>
- Ian, C., & Marilyn, R. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Mole.* <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232>
- Iebba, V., Totino, V., Gagliardi, A., Santangelo, F., Cacciotti, F., Trancassini, M., ... Schippa, S. (2016). Eubiosis and dysbiosis: The two sides of the microbiota. *New Microbiologica*.
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*.
- Iravani, Siavash. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*. <https://doi.org/10.1039/c1gc15386b>
- Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., ... Mizunoe, Y. (2010). *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature09074>
- Jansen, K. U., Girgenti, D. Q., Scully, I. L., & Anderson, A. S. (2013). Vaccine review: “*Staphylococcus aureus* vaccines: Problems and prospects.” *Vaccine*, 31(25), 2723–2730. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.04.002>
- Jayasree, L., Janakiram, P., & Madhavi, R. (2006). Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). *Journal of the World Aquaculture Society*. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2006.00066.x>
- Kalishwaralal, K., Deepak, V., Ramkumarpandian, S., Nellaiah, H., & Sangiliyandi, G. (2008). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis*. *Materials Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2008.06.051>
- Kashem, S. W., & Kaplan, D. H. (2016). Skin Immunity to *Candida albicans*. *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.04.007>
- Kesharwani, J., Yoon, K. Y., Hwang, J., & Rai, M. (2009). Phytofabrication of silver nanoparticles by leaf extract of *Datura metel*: Hypothetical mechanism involved in synthesis. *Journal of Bionanoscience*. <https://doi.org/10.1166/jbns.2009.1008>
- Kim, D., Jeong, S., & Moon, J. (2006). Synthesis of silver nanoparticles using the polyol process and the influence of precursor injection. *Nanotechnology*. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/16/004>

- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., ... Cho, M. H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
- Kim, Soohee, & Ryu, D. Y. (2013). Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *Journal of Applied Toxicology*. <https://doi.org/10.1002/jat.2792>
- Kim, Sungil, Yoo, B. K., Chun, K., Kang, W., Choo, J., Gong, M. S., & Joo, S. W. (2005). Catalytic effect of laser ablated Ni nanoparticles in the oxidative addition reaction for a coupling reagent of benzylchloride and bromoacetonitrile. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2004.10.038>
- Kittler, S., Greulich, C., Diendorf, J., Köller, M., & Epple, M. (2010). Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chemistry of Materials*. <https://doi.org/10.1021/cm100023p>
- Kmis, F. E., Fissan, H., & Rellinghaus, B. (2000). Sintering and evaporation characteristics of gas-phase synthesis of size-selected PbS nanoparticles. *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*. [https://doi.org/10.1016/S0921-5107\(99\)00298-6](https://doi.org/10.1016/S0921-5107(99)00298-6)
- Kole, R., Krainer, A. R., & Altman, S. (2012). RNA therapeutics: Beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd3625>
- Kong, H. H., Oh, J., Deming, C., Conlan, S., Grice, E. A., Beatson, M. A., ... Segre, J. A. (2012). Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.131029.111>
- Korbekandi, H., Ashari, Z., Irvani, S., & Abbasi, S. (2013). Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using *Fusarium oxysporum*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*.
- Korbekandi, H., Irvani, S., & Abbasi, S. (2012). Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/jctb.3702>
- Korshed, P., Li, L., Liu, Z., & Wang, T. (2016). The molecular mechanisms of the antibacterial effect of picosecond laser generated silver nanoparticles and their toxicity to human cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160078>
- Ku, B. K., & Maynard, A. D. (2006). Generation and investigation of airborne silver nanoparticles with specific size and morphology by homogeneous nucleation, coagulation and sintering. *Journal of Aerosol Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2005.05.003>
- Kumar, S. A., Abyaneh, M. K., Gosavi, S. W., Kulkarni, S. K., Pasricha, R., Ahmad, A., & Khan, M. I. (2007). Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO<sub>3</sub>. *Biotechnology Letters*. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9256-7>
- Lackner, M., Hagen, F., Meis, J. F., Van Den Ende, A. H. G. G., Vu, D., Robert, V., ... De Hoog, G. S. (2014). Susceptibility and diversity in the therapy-refractory genus *scedosporium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

<https://doi.org/10.1128/AAC.03211-14>

- Lara, H. H., Garza-Treviño, E. N., Ixtepan-Turrent, L., & Singh, D. K. (2011). Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology*. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-30>
- Lastauskiene, E., Zinkevičiene, A., Girkontaite, I., Kaunietis, A., & Kvedariene, V. (2014). Formic acid and acetic acid induce a programmed cell death in pathogenic *Candida* species. *Current Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0585-9>
- Latha, M., Priyanka, M., Rajasekar, P., Manikandan, R., & Prabhu, N. M. (2016). Biocompatibility and antibacterial activity of the *Adathoda vasica* Linn extract mediated silver nanoparticles. *Microbial Pathogenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.01.013>
- Levy, S B. (1997). Antibiotic resistance: an ecological imbalance. *Ciba Foundation Symposium*.
- Levy, S B. (1998). The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American*.
- Levy, Stuart B. (1992). From Tragedy the Antibiotic Age is Born. In *The Antibiotic Paradox*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-6042-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-6042-9_1)
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., & Su, Z. (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.001>
- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., ... Lewis, K. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature14098>
- Liu, Y., Qin, R., Zaat, S. A. J., Breukink, E., & Heger, M. (2015). Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *Journal of Clinical and Translational Research*.
- Lockhart, S. R., Etienne, K. A., Vallabhaneni, S., Farooqi, J., Chowdhary, A., Govender, N. P., ... Litvintseva, A. P. (2017). Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw691>
- Logaranjan, K., Raiza, A. J., Gopinath, S. C. B., Chen, Y., & Pandian, K. (2016). Shape- and Size-Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aloe vera Plant Extract and Their Antimicrobial Activity. *Nanoscale Research Letters*. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1725-x>
- Logeswari, P., Silambarasan, S., & Abraham, J. (2015). Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. *Journal of Saudi Chemical Society*. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.04.007>
- Lowy, F, D. (2003). Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI200318535>.In
- Ma, J., Zhang, J., Xiong, Z., Yong, Y., & Zhao, X. S. (2011). Preparation, characterization and antibacterial properties of silver-modified graphene oxide. *Journal of Materials Chemistry*. <https://doi.org/10.1039/c0jm02806a>
- Mafuné, F., Kohno, J., Takeda, Y., Kondow, T., & Sawabe, H. (2002). Structure and Stability

- of Silver Nanoparticles in Aqueous Solution Produced by Laser Ablation. *The Journal of Physical Chemistry B*. <https://doi.org/10.1021/jp001803b>
- Magnusson, M. H., Deppert, K., Malm, J. O., Bovin, J. O., & Samuelson, L. (1999). Gold nanoparticles: Production, reshaping, and thermal charging. *Journal of Nanoparticle Research*. <https://doi.org/10.1023/A:1010012802415>
- Mahmoud, W. M., Abdelmoneim, T. S., & Elazzazy, A. M. (2016). The impact of silver nanoparticles produced by *Bacillus pumilus* as antimicrobial and nematicide. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01746>
- Masalha, M., Borovok, I., Schreiber, R., Aharonowitz, Y., & Cohen, G. (2001). Analysis of transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7260-7272.2001>
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.03.016>
- Miller, L. G. (2010). Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. In *Antimicrobial Resistance*. <https://doi.org/10.1159/000298753>
- Mohammed Fayaz, A., Girilal, M., Rahman, M., Venkatesan, R., & Kalaichelvan, P. T. (2011). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using thermophilic bacterium *Geobacillus stearothermophilus*. *Process Biochemistry*, 46(10), 1958–1962. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.003>
- Mohandas, V., & Ballal, M. (2011). Distribution of *Candida* Species in different clinical samples and their virulence: Biofilm formation, proteinase and phospholipase production: A study on hospitalized patients in Southern India. *Journal of Global Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.4103/0974-777x.77288>
- Mohanpuria, P., Rana, N. K., & Yadav, S. K. (2008). Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research*. <https://doi.org/10.1007/s11051-007-9275-x>
- Mukherjee, S., Mitra, R., Maitra, A., Gupta, S., Kumaran, S., Chakraborty, A., & Majumder, P. P. (2016). Sebum and Hydration Levels in Specific Regions of Human Face Significantly Predict the Nature and Diversity of Facial Skin Microbiome. *Scientific Reports*, 6(September 2015), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep36062>
- Nair, B., & Pradeep, T. (2002). Coalescence of Nanoclusters and Formation of Submicron Crystallites Assisted by *Lactobacillus* Strains. *Crystal Growth and Design*. <https://doi.org/10.1021/cg0255164>
- Nakatsuji, T., Chen, T. H., Narala, S., Chun, K. A., Two, A. M., Yun, T., ... Gallo, R. L. (2017). Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Science Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah4680>
- Novickij, V., Švediene, J., Paškevičius, A., Markovskaja, S., Girkontaite, I., Zinkevičienė, A., ... Novickij, J. (2018). Pulsed electric field-assisted sensitization of multidrug-resistant *Candida albicans* to antifungal drugs. *Future Microbiology*. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0245>

- Oh, J., Byrd, A. L., Deming, C., Conlan, S., Kong, H. H., Segre, J. A., ... Young, A. (2014). Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature13786>
- Oh, J., Byrd, A. L., Park, M., Kong, H. H., & Segre, J. A. (2016). Temporal Stability of the Human Skin Microbiome. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.008>
- Oktar, F., Yetmez, M., Fikai, D., Fikai, A., Dumitru, F., & Pica, A. (2015). Molecular Mechanism and Targets of the Antimicrobial Activity of Metal Nanoparticles. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150414141601>
- Oliveira, M. M., Ugarte, D., Zanchet, D., & Zarbin, A. J. G. (2005). Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.05.068>
- Owaid, M. N., Raman, J., Lakshmanan, H., Al-Saeedi, S. S. S., Sabaratnam, V., & Ali Abed, I. (2015). Mycosynthesis of silver nanoparticles by *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus* and its inhibitory effects against *Candida* sp. *Materials Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.04.023>
- Pai, V., Ganavalli, A., & Kikkeri, N. (2018). Antifungal resistance in dermatology. *Indian Journal of Dermatology*. [https://doi.org/10.4103/ijd.ijd\\_131\\_17](https://doi.org/10.4103/ijd.ijd_131_17)
- Pamer, E. G. (2016). Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aad9382>
- Priyadarshini, S., Gopinath, V., Meera Priyadharsshini, N., MubarakAli, D., & Velusamy, P. (2013). Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using novel strain, *Bacillus flexus* and its biomedical application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.018>
- Qin, H., Cao, H., Zhao, Y., Zhu, C., Cheng, T., Wang, Q., ... Chu, P. K. (2014). In vitro and in vivo anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium. *Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.040>
- Qing, Y., Cheng, L., Li, R., Liu, G., Zhang, Y., Tang, X., ... Qin, Y. (2018). Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *International Journal of Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S165125>
- Quinteros, M. A., Cano Aristizábal, V., Dalmaso, P. R., Paraje, M. G., & Páez, P. L. (2016). Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicology in Vitro*. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.08.007>
- Radhouani, H., Silva, N., Poeta, P., Torres, C., Correia, S., & Igrejas, G. (2014). Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment, and human health. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00023>
- Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>
- Ramsey, M. M., Freire, M. O., Gabriliska, R. A., Rumbaugh, K. P., & Lemon, K. P. (2016). *Staphylococcus aureus* Shifts toward commensalism in response to *Corynebacterium*

- species. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01230>
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)
- Roy, A., Mahata, D., Paul, D., Korpole, S., Franco, O. L., & Mandal, S. M. (2013). Purification, biochemical characterization and self-assembled structure of a fengycin-like antifungal peptide from bacillus thuringiensis strain SM. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00332>
- Saifuddin, N., Wong, C. W., & Yasumira, A. A. N. (2009). Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation. *E-Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1155/2009/734264>
- Salomoni, R., Léo, P., Montemor, A. F., Rinaldi, B. G., & Rodrigues, M. F. A. (2017). Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanotechnology, Science and Applications*. <https://doi.org/10.2147/NSA.S133415>
- Samberg, M. E., Lobo, E. G., Oldenburg, S. J., & Monteiro-Riviere, N. A. (2012). Silver nanoparticles do not influence stem cell differentiation but cause minimal toxicity. *Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.18>
- Savoia, D. (2012). Plant-derived antimicrobial compounds: Alternatives to antibiotics. *Future Microbiology*. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.68>
- Scharschmidt, T. C., & Fischbach, M. A. (2013). What lives on our skin: Ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2012.12.003>
- Şeker Karatoprak, G., Aydin, G., Altinsoy, B., Altinkaynak, C., Koşar, M., & Ocsoy, I. (2017). The Effect of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. root extracts on formation of nanoparticles and their antimicrobial activities. *Enzyme and Microbial Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.10.019>
- Senapati, S. (2005). Biosynthesis and Immobilization of Nanoparticles and their Applications. *Ph. D. Thesis*, (July), 1–171.
- Shahverdi, A. R., Minaeian, S., Shahverdi, H. R., Jamalifar, H., & Nohi, A. A. (2007). Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: A novel biological approach. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.02.005>
- Shanahan, F. (2010). Probiotics in Perspective. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.10.025>
- Siddiqi, K. S., Husen, A., & Rao, R. A. K. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology*. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>
- Singh, R., Wagh, P., Wadhvani, S., Gaidhani, S., Kumbhar, A., Bellare, J., & Chopade, B. A. (2013). Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *International Journal of Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S48913>
- Slavin, Y. N., Asnis, J., Häfeli, U. O., & Bach, H. (2017). Metal nanoparticles: Understanding

- the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of Nanobiotechnology*.  
<https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>
- Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., Okuda, K. I., Tajima, A., Iwase, T., & Mizunoe, Y. (2013). Staphylococcus epidermidis Esp degrades specific proteins associated with staphylococcus aureus biofilm formation and host-pathogen interaction. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.01672-12>
- Suppi, S., Kasemets, K., Ivask, A., Künis-Beres, K., Sihtmäe, M., Kurvet, I., ... Kahru, A. (2015). A novel method for comparison of biocidal properties of nanomaterials to bacteria, yeasts and algae. *Journal of Hazardous Materials*, 286, 75–84.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.027>
- Taheri Sarvtin, M., Shokohi, T., Hajheydari, Z., Yazdani, J., & Hedayati, M. T. (2014). Evaluation of candidal colonization and specific humoral responses against *Candida albicans* in patients with psoriasis. *International Journal of Dermatology*.  
<https://doi.org/10.1111/ijd.12562>
- Tho, N. T. M., An, T. N. M., Tri, M. D., Sreekanth, T. V. M., Lee, J. S., Nagajyothi, P. C., & Lee, K. D. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using nelumbo nucifera seed extract and its antibacterial activity. *Acta Chimica Slovenica*, 60(3), 673–678.
- Tsuji, T., Iryo, K., Watanabe, N., & Tsuji, M. (2002). Preparation of silver nanoparticles by laser ablation in solution: Influence of laser wavelength on particle size. *Applied Surface Science*. [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(02\)00936-4](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(02)00936-4)
- Tsuji, T., Kakita, T., & Tsuji, M. (2003). Preparation of nano-size particles of silver with femtosecond laser ablation in water. *Applied Surface Science*.  
[https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(02\)01230-8](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(02)01230-8)
- Vallabhaneni, S., Cleveland, A. A., Farley, M. M., Harrison, L. H., Schaffner, W., Beldavs, Z. G., ... Smith, R. M. (2015). Epidemiology and risk factors for echinocandin nonsusceptible *Candida glabrata* bloodstream infections: Data from a large multisite population-based candidemia surveillance program, 2008-2014. *Open Forum Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv163>
- Van Der Wal, A., Norde, W., Zehnder, A. J. B., & Lyklema, J. (1997). Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(96\)01340-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(96)01340-9)
- van Hengel, I. A. J., Riool, M., Fratila-Apachitei, L. E., Witte-Bouma, J., Farrell, E., Zadpoor, A. A., ... Apachitei, I. (2017). Selective laser melting porous metallic implants with immobilized silver nanoparticles kill and prevent biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomaterials*.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.030>
- Verweij, P. E., Chowdhary, A., Melchers, W. J. G., & Meis, J. F. (2016). Azole resistance in *aspergillus fumigatus*: Can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/civ885>
- Vigneshwaran, N., Kathe, A. A., Varadarajan, P. V., Nachane, R. P., & Balasubramanya, R.



- H. (2006). Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, *Phaenerochaete chrysosporium*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.07.014>
- Vijay Kumar, P. P. N., Pammi, S. V. N., Kollu, P., Satyanarayana, K. V. V., & Shameem, U. (2014). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their anti bacterial activity. *Industrial Crops and Products*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.050>
- Vilchis-Nestor, A. R., Sánchez-Mendieta, V., Camacho-López, M. A., Gómez-Espinosa, R. M., Camacho-López, M. A., & Arenas-Alatorre, J. A. (2008). Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. *Materials Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2008.01.138>
- Walker, M. J. (2015). Emergence of scarlet fever *Streptococcus pyogenes* emm12 clones in Hong Kong is associated with toxin acquisition and multidrug resistance. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng.3147>
- Walker, M. J., Barnett, T. C., McArthur, J. D., Cole, J. N., Gillen, C. M., Henningham, A., ... Nizet, V. (2014). Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group A *Streptococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00101-13>
- Walsh, T. J., Groll, A., Hiemenz, J., Fleming, R., Roilides, E., & Anaissie, E. (2004). Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1111/j.1470-9465.2004.00839.x>
- Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z. S., & Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: Synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.014>
- Weidenmaier, C., Goerke, C., & Wolz, C. (2012). *Staphylococcus aureus* determinants for nasal colonization. *Trends in Microbiology*, 20(5), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.03.004>
- Wertheim, H. F. L., Melles, D. C., Vos, M. C., Van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Verbrugh, H. A., & Nouwen, J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70295-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70295-4)
- White, T. C., Marr, K. A., & Bowden, R. A. (1998). Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*.
- Wiederhold, N. P. (2017). Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infection and Drug Resistance*. <https://doi.org/10.2147/IDR.S124918>
- Wiley, B., Sun, Y., Mayers, B., & Xia, Y. (2005). Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The case of silver. *Chemistry - A European Journal*. <https://doi.org/10.1002/chem.200400927>
- Wollenberg, M. S., Claesen, J., Escapa, I. F., Aldridge, K. L., Fischbach, M. A., & Lemon, K. P. (2014). Propionibacterium-Produced Coproporphyrin III Induces *Staphylococcus aureus* Aggregation and Biofilm Formation. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mbio.01286-14>
- World Health Organization. (2001). Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups. *Alliance for the Prudent Use of Antibiotics*.

<https://doi.org/WHO/CDS/CSR/DRS/2001.10>

- Wu, D. C., Chan, W. W., Metelitsa, A. I., Fiorillo, L., & Lin, A. N. (2011). Pseudomonas Skin Infection. *American Journal of Clinical Dermatology*.  
<https://doi.org/10.2165/11539770-000000000-00000>
- Wypij, M., Czarnecka, J., Świecimska, M., Dahm, H., Rai, M., & Golinska, P. (2018). Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of biogenic silver nanoparticles synthesized from *Streptomyces xinghaiensis* OF1 strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2406-3>
- You, C., Han, C., Wang, X., Zheng, Y., Li, Q., Hu, X., & Sun, H. (2012). The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity. *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1792-8>
- Yuan, Y. G., Peng, Q. L., & Gurunathan, S. (2017). Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: An alternative approach for antimicrobial therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms18030569>
- Zipperer, A., Konnerth, M. C., Laux, C., Berscheid, A., Janek, D., Weidenmaier, C., ... Krismer, B. (2016). Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature18634>