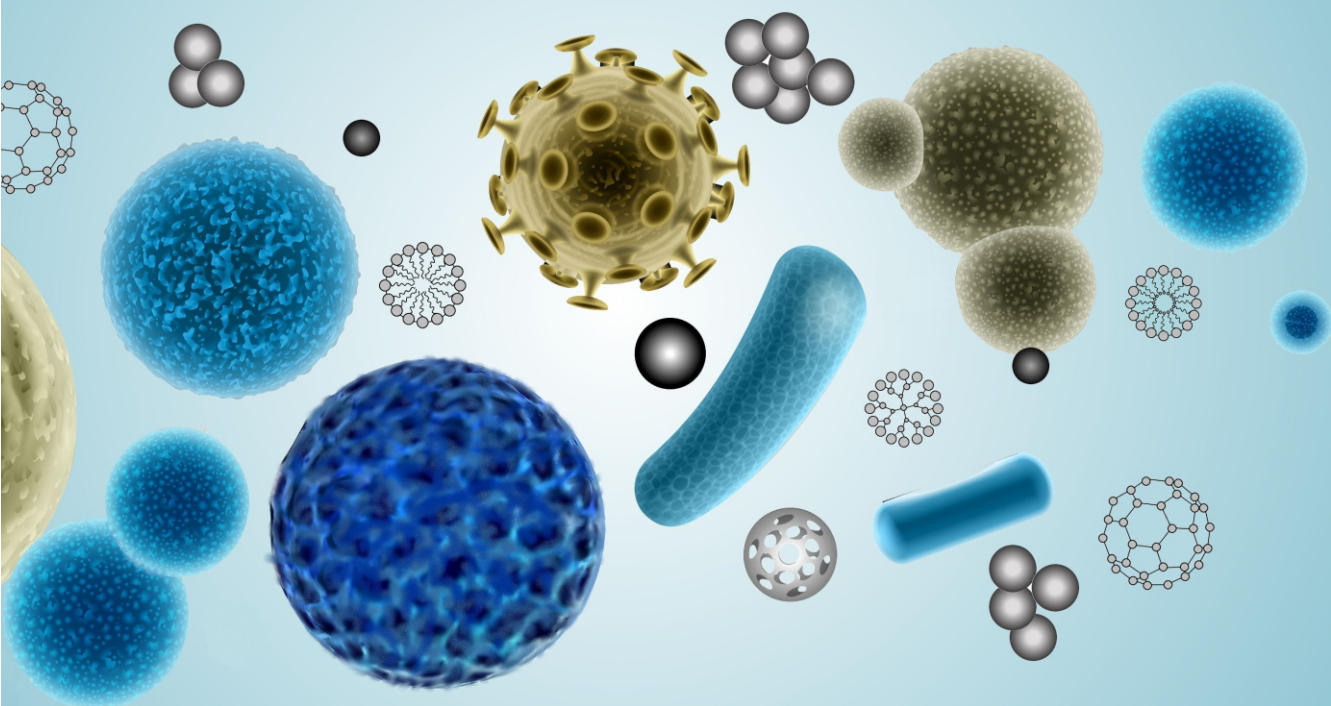


Anna Krzepińska Agata Święciło Katarzyna Matyszczuk

Wpływ nanocząstek na bakterie i grzyby

wybrane zagadnienia



Wpływ nanocząstek
na bakterie i grzyby

wybrane zagadnienia

WUIP

WYDAWNICTWO
UNIwersytetu PRZYRODNICZEGO
W LUBLINIE

Wpływ nanocząstek na bakterie i grzyby

wybrane zagadnienia

Anna Krzepińko
Agata Święciło
Katarzyna Matyszczuk

Lublin 2022

Recenzenci

prof. dr hab. Wiesław Barabasz
dr hab. Magdalena Rzewuska, prof. uczelni

Opracowanie redakcyjne
Ewa Zawadzka-Mazurek

Skład i łamanie
Małgorzata Grzesiak

Projekt okładki
Małgorzata Lużyńska

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie – Wydawnictwo, Lublin 2022



Ten utwór jest dostępny na licencji

[Creative Commons Uznanie autorstwa – Na tych samych warunkach 4.0 Międzynarodowa](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

ISBN 978-83-7259-373-3 online

DOI 10.24326/mon.2022.12

Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin

<https://up.lublin.pl/nauka/wydawnictwo/>

9 ark. wyd.

Spis treści

Spis skrótów nazw mikroorganizmów.....	7
1. Nanocząstki, charakterystyka i metody syntezy	11
1.1. Definicje nanomateriałów	11
1.2. Klasyfikacja i właściwości nanomateriałów	14
1.3. Metody syntezy nanomateriałów	19
1.4. Metody badania właściwości nanomateriałów	23
2. Wybrane metody stosowane do oceny reakcji drobnoustrojów na nanocząstki metali	28
2.1. MIC i MBC jako podstawowe parametry badania oddziaływań nanocząstek na mikroorganizmy	28
2.2. Metody pomiaru in vitro aktywności przeciwdrobnoustrojowej nanocząstek.....	32
2.2.1. Metoda dyfuzyjno-krażkowa.....	33
2.2.2. Metody rozcieńczeń	34
2.2.3. Metoda wyznaczania krzywej zabijania w czasie.....	36
2.2.4. Pomiar OD zawiesin komórkowych.....	36
2.2.5. Cytometria przepływowa	36
2.2.6. Metoda viability-qPCR.....	37
2.3. Badanie przeciwrzybowego działania nanocząstek.....	39
3. Mechanizmy antybakteryjnego działania nanocząstek metali	41
3.1. Oddziaływanie nanocząstek metali ze strukturami powierzchniowymi mikroorganizmów	41
3.1.1. Wielkość i kształt nanocząstek jako czynnik wpływający na toksyczność w stosunku do mikroorganizmów.....	41
3.1.2. Komórki bakterii – interakcje nanocząstek zależne od budowy ściany komórkowej.....	49
3.1.3. Toksyczność NPs dla grzybów i ich interakcje ze ścianą komórkową.....	54
3.2. Wpływ nanocząstek metali na strukturę i składniki biofilmu.....	57
3.3. Interakcje nanocząstek z błoną cytoplazmatyczną mikroorganizmów	59
3.4. Mechanizm przeciwdrobnoustrojowy nanocząstek metali związany z uwalnianiem jonów.....	62

3.5. Mechanizm przeciwdrobnoustrojowy nanometali związany z generowaniem wolnych rodników	67
3.6. Mechanizmy przeciwdrobnoustrojowe nanocząstek metali związane z zaburzeniem procesów metabolicznych, ekspresji genów i biosyntezy białka w komórkach	75
3.6.1. Zmiany metabolizmu w komórkach mikroorganizmów pod wpływem nanocząstek	75
3.6.2. Wpływ nanocząstek metali na aktywność genów i syntezę białek w komórkach mikroorganizmów.....	79
4. Interakcja nanocząstek metali z mikroorganizmami glebowymi.....	78
4.1. Zastosowanie nanocząstek metali w ochronie roślin przed mikroorganizmami patogennymi.....	87
5. Biobójcze działanie nanocząstek na mikroorganizmy chorobotwórcze dla człowieka.....	92
6. Literatura.....	96

Spis skrótów nazw mikroorganizmów

- A. absinthium* – *Artemisia absinthium*
- A. alternata* – *Alternaria alternata*
- A. baumannii* – *Actinobacter baumannii*
- A. brassicicola* – *Alternaria brassicicola*
- A. carbonarius* – *Aspergillus carbonarius*
- A. clavatus* – *Aspergillus clavatus*
- A. flavus* – *Aspergillus flavus*
- A. fumigatus* – *Aspergillus fumigatus*
- A. nidulans* – *Aspergillus nidulans*
- A. niger* – *Aspergillus niger*
- A. nomius* – *Aspergillus nomius*
- A. ochraceus* – *Aspergillus ochraceus*
- A. oryzae* – *Aspergillus oryzae*
- A. parasiticus* – *Aspergillus parasiticus*
- A. pullulans* – *Aureobasidium pullulans*
- A. solani* – *Alternaria solani*
- A. terreus* – *Aspergillus terreus*
- A. versicolor* – *Aspergillus versicolor*
- A. westerdijkiae* – *Aspergillus westerdijkiae*
- B. adolescentis* – *Bifidobacterium adolescentis*
- B. animalis* – *Bifidobacterium animalis*
- B. atrophaeus* – *Bacillus atrophaeus*
- B. bifidum* – *Bifidobacterium bifidum*
- B. breve* – *Bifidobacterium breve*
- B. cereus* – *Bacillus cereus*
- B. cinerea* – *Botrytis cinerea*
- B. japonicum* – *Bradyrhizobium japonicum*
- B. lactis* – *Bifidobacterium lactis*
- B. longum* – *Bifidobacterium longum*
- B. megaterium* – *Bacillus megaterium*
- B. sorokiniana* – *Bipolaris sorokiniana*
- B. subtilis* – *Bacillus subtilis*
- C. albicans* – *Candida albicans*
- C. cassiicola* – *Corynespora cassiicola*
- C. coccodes* – *Colletotrichum coccodes*
- C. cucumerinum* – *Cladosporium cucumerinum*
- C. destructans* – *Cylindrocarpum destructans*
- C. difficile* – *Clostridioides difficile*
- C. dubliniensis* – *Candida dubliniensis*

C. ericae – *Cryptosporiopsis ericae*
C. glabrata – *Candida glabrata*
C. gloeosporioides – *Colletotrichum gloeosporioides*
C. guilliermondii – *Candida guilliermondii*
C. jejuni – *Campylobacter jejuni*
C. kefyr – *Candida kefyr*
C. krusei – *Candida krusei*
C. neoformans – *Cryptococcus neoformans*
C. parapsilosis – *Candida parapsilosis*
C. perfringens – *Clostridium perfringens*
C. sakazakii – *Cronobacter sakazakii*
C. sphaerospermum – *Cladosporium sphaerospermum*
C. sporogenes – *Clostridium sporogenes*
C. tropicalis – *Candida tropicalis*
C. violaceum – *Chromobacterium violaceum*
D. bryoniae – *Didymella bryoniae*
D. hansenii – *Debaryomyces hansenii*
E. aerogenes – *Enterobacter aerogenes*
E. cloacae – *Enterobacter cloacae*
E. coli – *Escherichia coli*
E. faecalis – *Enterococcus faecalis*
F. culmorum – *Fusarium culmorum*
F. graminearum – *Fusarium graminearum*
F. moniliforme – *Fusarium moniliforme*
F. oxysporum – *Fusarium oxysporum*
F. poae – *Fusarium poae*
F. proliferatum – *Fusarium proliferatum*
F. sambucinum – *Fusarium sambucinum*
F. solani – *Fusarium solani*
F. sulphureum – *Fusarium sulphureum*
F. verticillioides – *Fusarium verticillioides*
G. cingulata – *Glomerella cingulata*
G. graminis – *Gaeumannomyces graminis*
G. lucidum – *Ganoderma lucidum*
H. ducreyi – *Haemophilus ducreyi*
H. pylori – *Helicobacter pylori*
H. simplex – *Herpes simplex*
H. oryzae – *Heterodera oryzae*
K. apiculata – *Kloeckera apiculata*
K. pneumoniae – *Klebsiella pneumoniae*
L. acidophilus – *Lactobacillus acidophilus*
L. amylovorus – *Lactobacillus amylovorus*
L. casei – *Lactobacillus casei*
L. fermentum – *Lactobacillus fermentum*
L. gasseri – *Lactobacillus gasseri*
L. ivanovii – *Listeria ivanovii*
L. johnsonii – *Lactobacillus johnsonii*
L. lactis – *Lactococcus lactis*
L. maculans – *Leptosphaeria maculans*
L. monocytogenes – *Listeria monocytogenes*
L. paracasei – *Lactobacillus paracasei*
P. pastoris – *Pichia pastoris*
L. plantarum – *Lactobacillus plantarum*
L. pseudotheobromae – *Lasiodiplodia pseudotheobromae*
L. reuteri – *Lactobacillus reuteri*

L. rhamnosus – *Lactobacillus rhamnosus*
L. salivarius – *Lactobacillus salivarius*
L. theobromae – *Lasiodiplodia theobromae*
M. cannonballus – *Monosporascus cannonballus*
M. flavus – *Micrococcus flavus*
M. hominis – *Mycoplasma hominis*
M. indicus – *Mucor indicus*
M. luteus – *Micrococcus luteus*
M. phaseolina – *Macrophomina phaseolina*
M. tuberculosis – *Mycobacterium tuberculosis*
MRSA – methicillin-resistant (oporny na metycyline) *Staphylococcus aureus*
N. europaea – *Nitrosomonas europaea*
N. gonorrhoeae – *Neisseria gonorrhoeae*
P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*
P. aphanidermatum – *Pythium aphanidermatum*
P. capsici – *Phytophthora capsici*
P. chrysogenum – *Penicillium chrysogenum*
P. chrysriumossp – *Phanerochaete chrysriumossp*
P. cinnamomi – *Phytophthora cinnamomi*
P. citrinum – *Penicillium citrinum*
P. cryptogea – *Phytophthora cryptogea*
P. cubensis – *Psilocybe cubensis*
P. decumbens – *Penicillium decumbens*
P. denitrificans – *Paracoccus denitrificans*
P. expansum – *Penicillium expansum*
P. fischeri – *Photobacterium fischeri*
P. fluorescens – *Pseudomonas fluorescens*
P. funiculosum – *Penicillium funiculosum*
P. giseofulvum – *Penicillium giseofulvum*
P. grisea – *Pyricularia grisea*
P. hysterothorus – *Parthenium hysterothorus*
P. infestans – *Phytophthora infestans*
P. irregulare – *Pythium irregulare*
P. italicum – *Penicillium italicum*
P. katsurae – *Phytophthora katsurae*
P. luminescens – *Photobacterium luminescens*
P. membranifaciens – *Pichia membranifaciens*
P. mirabilis – *Proteus mirabilis*
P. nordicum – *Penicillium nordicum*
P. notatum – *Penicillium notatum*
P. ochrochloron – *Penicillium ochrochloron*
P. parasitica – *Phytophthora parasitica*
P. roqueforti – *Penicillium roqueforti*
P. spinosum – *Pythium spinosum*
P. syringae – *Pseudomonas syringae*
P. tabacina – *Peronospora tabacina*
P. verrucosum – *Penicillium verrucosum*
P. vulgaris – *Proteus vulgaris*
R. solani – *Rhizoctonia solani*
R. stolonifer – *Rhizopus stolonifer*
S. aureus – *Staphylococcus aureus*
S. boydii – *Shigella boydii*
S. carnosus – *Staphylococcus carnosus*
S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*
S. cerevisiae (boulardii) – *Saccharomyces cerevisiae boulardii*

S. Choleraesuis – *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Choleraesuis
S. dysenteriae – *Shigella dysenteriae*
S. enterica – *Salmonella enterica*
S. epidermidis – *Staphylococcus epidermidis*
S. Enteritidis – *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis
S. flexneri – *Shigella flexneri*
S. fuliginea – *Sphaerotheca fuliginea*
S. Infantis – *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Infantis
S. lycopersici – *Stemphylium lycopersici*
S. marcescens – *Serratia marcescens*
S. mutant – *Streptococcus mutant*
S. nodorum – *Septoria nodorum*
S. oneidensis – *Shewanella oneidensis*
S. pannosa – *Sphaerotheca pannosa*
S. Paratyphi – *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Paratyphi
S. pyogenes – *Streptococcus pyogenes*
S. rolfsii – *Sclerotium rolfsii*
S. sclerotiorum – *Sclerotinia sclerotiorum*
S. salivarius ssp. *thermophilus* – *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*
S. Typhi – *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhi
S. Typhimurium – *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium
S. wightii – *Sargassum wightii*
S. vesicarium – *Stemphylium vesicarium*
T. mentagrophytes – *Trichophyton mentagrophytes*
T. rubrum – *Trichophyton rubrum*
T. viride – *Trichoderma viride*
U. urealyticum – *Ureaplasma urealyticum*
V. parahaemolyticus – *Vibrio parahaemolyticus*
X. axonopodis pv. *citri* – *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*
X. campestris pv. *campestris* – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*
X. oryzae – *Xanthomonas oryzae*
Y. enterocolitica – *Yersinia enterocolitica*

1. Nanocząstki, charakterystyka i metody syntezy

1.1. Definicje nanomateriałów

Nanomateriały (ang. nanomaterials, NMs), do których zaliczamy nanocząstki (ang. nanoparticles, NPs), to specyficzna grupa materiałów, których dowolny wymiar zewnętrzny lub których struktura powierzchniowa bądź wewnętrzna mieści się w nanoskali, w przedziale od 1–100 nanometrów (nm). Mogą one (ale nie muszą) wykazywać charakterystyczne właściwości wynikające z ich rozmiaru [Sawhney i in. 2008]. Bardziej precyzyjna definicja uwzględnia ich pochodzenie oraz liczbowy rozkład wielkości cząstek w materiale. Według aktów normatywnych prawa Komisji Europejskiej są to naturalne, powstałe przypadkowo lub wytworzone, materiały zawierające cząstki w stanie swobodnym lub w formie agregatu bądź aglomeratu, w którym co najmniej 50% lub więcej cząstek w liczbowym rozkładzie ich wielkości ma jeden lub więcej wymiarów w zakresie 1–100 nm [Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L 275/38, 20.10.2011]. Według Międzynarodowego Układu Jednostek (SI) 1 nm to wielkość długości równa 10^{-9} m. Wprawdzie zakres nanometryczny obejmuje przedział od 1 do 1000 nm, ale przyjmuje się, że umowna granica wielkości nanocząstek wynosi 100 nm. Obecnie zainteresowanie nanomateriałami jest bardzo duże, głównie ze względu na ich szczególne właściwości, dzięki którym znalazły one zastosowanie w różnych dziedzinach życia człowieka: biomedycynie, weterynarii, naukach biologicznych, rolnictwie, przemyśle spożywczym, kosmetycznym, elektronicznym, metalurgicznym i in. W przeciwieństwie do swoich odpowiedników masowych, czyli substancji o identycznym składzie chemicznym, ale występujących w formie większych cząstek materii (których wielkości mieszczą się w skali mikrometrycznej i makrometrycznej), często wykazują one inne właściwości optyczne, elektryczne, mechaniczne (tarcie, ciągliwość, sprężystość), magnetyczne, katalityczne i biologiczne. Dodatkowo właściwości te można „przestraszać”, manipulując wielkością i kształtem nanocząstek lub modyfikując je chemicznie.

Przedrostek „nano” zaczerpnięty z języka greckiego oznacza „karła”, a po raz pierwszy użył go japoński naukowiec Norio Taniguchi w roku 1974 w odniesieniu do możliwości projektowania materiałów na poziomie nanometrów [Rathien i Read 2005]. Podwaliny dla rozwoju nanotechnologii zostały przy-

gotowane znacznie wcześniej przez znakomitego fizyka, wizjonera Richarda Feynmana. Jego wykład wygłoszony w 1959 r. na corocznym zjeździe Amerykańskiego Towarzystwa Fizycznego pt. „There is a plenty of room at the bottom” stał się impulsem dla wielu naukowców do intensywnych badań w tym zakresie i symbolicznie zapoczątkował erę nanotechnologii. Spopularyzowanie idei nanotechnologii zawdzięczamy natomiast Ericowi Drexlerowi, który opublikował książki przeznaczone dla szerszego kręgu odbiorców: *Engines of Creation: The Coming Era of the Nanotechnology* (1986) oraz *Nanosystems: Molecular, Machinery, Manufacturing and Computation* (1994) oraz utworzył instytucję, która miała na celu propagowanie wiedzy o korzyściach i zagrożeniach związanych z nanotechnologią.

Intensywny rozwój nanotechnologii w latach późniejszych stał się możliwy dzięki udoskonaleniu i wdrożeniu nowych narzędzi badawczych takich jak: różnego typu mikroskopy elektronowe: skaningowy mikroskop elektronowy (ang. scanning electron microscopy, SEM) i tunelowy mikroskop skaningowy (ang. scanning tunneling microscope STM), technik laserowych i szeroko rozumianej informatyki. Umożliwiło to precyzyjne manipulowanie cząstkami na poziomie atomowym oraz ich identyfikację i charakterystykę. Odkrycie pierwszych nanomateriałów: fulerenów oraz ich strukturalnych izomerów – nanorurek węglowych poszerzyło wiedzę z zakresu interakcji między atomami węgla oraz właściwości tych nanostruktur [Dietl 2006].

Chociaż nanotechnologia i nanonauka są dziedzinami stosunkowo młodymi, to cząstki o wielkości nanometrycznej były i są obecne od początku istnienia Ziemi. Powstają one w wyniku naturalnych zjawisk i procesów takich jak: burze piaskowe, sztormy, parowanie wody ze zbiorników słonowodnych, erupcje wulkanów, pożary lasów czy zbiorowisk trawiastych, reakcje fotochemicznych zachodzących w atmosferze, a także w wyniku procesów biologicznych, np. mineralizacji materii organicznej [Buzea i in. 2007].

Nanocząstki są także obecnie w przestrzeni kosmicznej. Wchodzą one w skład pyłu występującego na Księżycu i Marsie oraz pyłów kosmicznych docierających do Ziemi [Strambeanu i in. 2015, Zook 2001]. Ich obecność wykryto także w wielu meteorytach [Hochella i in. 2015, Taylor i in. 2005]. Nanocząstki powstają ponadto jako efekty niezamierzonej działalności ludzkiej, czyli podczas gotowania, smażenia, grillowania, procesów spalania w silnikach Diesla, spalania oleju napędowego, lutowania, spawania, wulkanizacji [Kagawa 2002]. Tego typu naturalne i antropogeniczne źródła nanocząstek generują trudne do oszacowania ilości tych nanomateriałów w środowisku życia człowieka, które są traktowane jako swoiste tło. Poziom ich jest przeważnie stały i zależy od warunków atmosferycznych panujących w danej chwili, takich jak: pora roku, wilgotność powietrza, opady atmosferyczne, ruch powietrza itp.

W przeciwieństwie do nich projektowane, czyli inżynierskie, nanomateriały powstają w toku celowej produkcji i są przeznaczone do konkretnych zastosowań. W odpowiedzi na rosnące zapotrzebowanie rynku globalnego na nanoprodukty inżynierskie, ich ilość i różnorodność, z roku na rok rośnie. Konsekwencją szerokiego wykorzystania jest rozproszenie tych produktów w środowisku. Ma-

jąc na uwadze ich wysoką reaktywność, rozpuszczalność w różnego typu mediach oraz zdolność do pokonywania barier biologicznych, może to budzić obawy związane z bezpieczeństwem stosowania. Potencjalnie szkodliwie oddziaływanie nanoproductów na organizmy roślin, zwierząt i ludzi jest obecnie szeroko dyskutowane [Hegde i in. 2016, Święciło i in. 2020, Miyazawa i in. 2021].

Tabela 1. Wykaz terminów i definicji związanych z nanotechnologią

Pojęcie	Definicja
Nanonauka (ang. nanoscience)	badanie zjawisk i manipulacja elementami materii na poziomie atomowym, molekularnym i makromolekularnym (zakres od 1 do 100 nm), gdzie właściwości materii różnią się w istotny sposób od właściwości w większych skalach wymiarowych
Nanotechnologia (ang. nanotechnology)	projektowanie, wytwarzanie i badanie struktur, których przynajmniej jeden wymiar jest mniejszy niż 100 nm, i które posiadają nowe właściwości wynikające z ich rozmiaru
Nanoskala (ang. nanoscale)	zakres rozmiarów od około 1 do 1000 nm
Nanomateriał (ang. nanomaterial)	materiał o przynajmniej jednym wewnętrznym lub zewnętrznym wymiarze struktury w nanoskali
Nanoobiekt (ang. nano-object)	materiał, który posiada jeden, dwa lub trzy zewnętrzne wymiary w nanoskali
Nanocząstka (ang. nanoparticle, NP)	materiał (nanoobiekt), który posiada trzy zewnętrzne wymiary w nanoskali
Nanopłytko (ang. nanosheet)	nanoobiekt z jednym wymiarem zewnętrznym w nanoskali i dwoma pozostałymi wymiarami zewnętrznymi znacznie większymi (co najmniej trzykrotnie).
Nanowłókno (ang. nanofibre)	nanoobiekt (elastyczny lub sztywny) z dwoma podobnymi zewnętrznymi wymiarami w nanoskali i znacznie większym trzecim wymiarem
Nanorurka (ang. nanotube)	puste nanowłókno
Nanopręt (ang. nanorod)	pełne nanowłókno
Nanodrut (ang. nanowire)	nanowłókno półprzewodnikowe lub przewodnikowe
Nanokompozyt	struktura wielofazowa z co najmniej jedną fazą w nanoskali
Nanostruktura	kompozycja połączonych ze sobą części składowych posiadających rozmiary wyrażane w nanoskali
Materiały nanostrukturalne	materiały zawierające nanostrukturę wewnętrzną lub powierzchniową

Specjalną kategorię nanomateriałów stanowią naturalne nanocząstki i nanostruktury wytwarzane w organizmach żywych. Należą do nich m.in.: biopolimery: DNA, RNA, rybosomy, białka enzymatyczne, przeciwciała, a także twory o nanowymiarach, tj. wirusy [Jeevanandam i in. 2018]. Innymi strukturami o budowie nanomateriałów pochodzenia organicznego są: kości, skóra, rogi, dzioby, pióra, pazury zwierząt [Hunt 1976]. Do naturalnych koloidów o budowie nanostrukturalnej należą: mleko, krew, włókna papieru lub bawełny (vanLoon i Duffy 2009). Osiągnięcia z zakresu nanotechnologii umożliwiły zupełnie inne spojrzenie na te struktury. Poznanie mechanizmów ich biosyntezy oraz specyficznych właściwości zainspirowało badaczy do projektowania i wytwarzania „nowych” nanomateriałów, korzystając z naturalnych rozwiązań i wzorców. Tego typu biometryczne podejście stało się podstawą rozwoju nowej gałęzi nanotechnologii zwanej – nanobiotechnologią [Kurzydłowski i Lewandowska 2011].

Nanotechnologia jest dziedziną stosunkowo nową, chociaż jak wynika z przedstawionych wyżej rozważań dynamicznie rozwijającą się. W tabeli 1 zebrano podstawowe pojęcia z zakresu nanotechnologii [ISO/TS 27687:2008].

1.2. Klasyfikacja i właściwości nanomateriałów

Nanomateriały można sklasyfikować, biorąc pod uwagę różne kryteria. Rysunek 1 przedstawia główne typy nanomateriałów wyodrębnionych na podstawie różnych parametrów [Valcárcel i López-Lorente 2014].

W zależności od źródeł pochodzenia dzielimy je na naturalne, przypadkowe antropogeniczne oraz celowo wytworzone przez człowieka, tzw. zaprojektowane lub inżynierskie. Kolejnym kryterium podziału stosowanym w odniesieniu do nanomateriałów jest wzajemny stosunek ich wymiarów [Tiwari i in. 2011]. Nanomateriały zerowymiarowe (punktowe) (ang. zero dimension, 0D), są ograniczone w trzech wymiarach do rozmiarów nanometrycznych. Przykładami struktur 0D są nanocząstki koloidalne, fulereny (ang. fullerenes), kropki kwantowe (Qd, ang. quantum dots), nanoskopowe wydzielenia węglkowe w stalach o wysokiej wytrzymałości, klastery (ang. clusters, NCs) czy nanokryształy, np. nanocząstki srebra (AgNPs) [Tvrđy i Kamat 2009]. Rysunek 2 przedstawia typowe struktury nanocząstek z uwzględnieniem ich składu chemicznego. Nanomateriały jednowymiarowe (1D), (przypominające odcinek) są ograniczone do rozmiarów nanometrycznych w dwóch wymiarach. Przykładami nanostruktur jednowymiarowych są np. nanodrutki metali (ang. nanowires), nanorurki (ang. nanotubes) i nanopręty (ang. nanorods) [Yu i in. 2003], półprzewodniki [Lu i Lieber 2007], polimerowe nanowłókna (ang. nanofibres) [Boscovic 2007] czy napelniające płytkowe znajdujące szerokie zastosowanie w rozmaitych sektorach przemysłu [Ramsden 2012]. Dwuwymiarowe (2D) nanostruktury są ograniczone w jednym wymiarze, przy dwóch pozostałych wymiarach większych. Obejmują one następujące materiały: warstwy (arkusze) o grubości nano typu jednofazowego, wielofazowego lub też kompozyty zawierające nanocząstki, jak np. nano-

rurki węglowe (CNTs) [Boscovic 2007, Haque 2006]. Struktury trójwymiarowe (3D) to homo- i heterogeniczne materiały monokrystaliczne o wymiarze nano składające się z krystalicznych obszarów zw. domenami i klasterów faz lub też kompozyty zawierające określone nanocząstki. Przykładem nanomateriałów 3D są kryształy fotoniczne [Romanov i in. 2010, Ramsden 2012, Kelsal i in. 2008, Rao i in. 2007]. Kompozyty mogą także zawierać puste przestrzenie o wymiarach nanometrycznych o morfologii opisanej wyżej.

Z kolei rozpatrując jako kryterium podziału jednorodność chemiczną, wyróżnia się nanomateriały składające się z kryształów i/lub krystalitów o identycznym składzie chemicznym (homogeniczne) oraz składające się z krystalitów różniących się składem chemicznym bądź też składające się z krystalitów i/lub faz w granulach krystalitów o zróżnicowanym składzie chemicznym lub zawierające w swej matrycy krystality o wymiarze nanometrycznym różniące się składem (heterogeniczne) [Vollath 2008, Cademartiri i Ozin 2011, Elsner 2013, Altavilla i Ciliberto 2010]. Szczególnym rodzajem heterogenicznych materiałów kompozytowych są struktury typu „rdzeń-powłoka” (ang. core-shell) oraz „pusty rdzeń-powłoka” (ang. yolk-shell), które powstają poprzez pokrycie danego materiału powłoką ochronną o innym składzie chemicznym [Vollath 2008, Altavilla i Ciliberto 2010]. Wykazują one cechy wynikające z właściwości obu faz: rdzenia i powłoki co sprawia, że stają się one wielofunkcyjnym materiałem o szerokich możliwościach zastosowania.

Skład chemiczny w szerszym znaczeniu można opisać, stosując podział nanomateriałów na nieorganiczne lub organiczne lub mieszane organiczno-nieorganiczne. Do nieorganicznych nanomateriałów zaliczamy zbudowane ze związków węgla, metalu i tlenku metalu, półprzewodnikowe i ceramiczne, podczas gdy cząstki organiczne to polimery i biomolekuły.

Bardziej szczegółowy podział obejmując cztery kategorie nanomateriałów [Alagarasi 2013]:

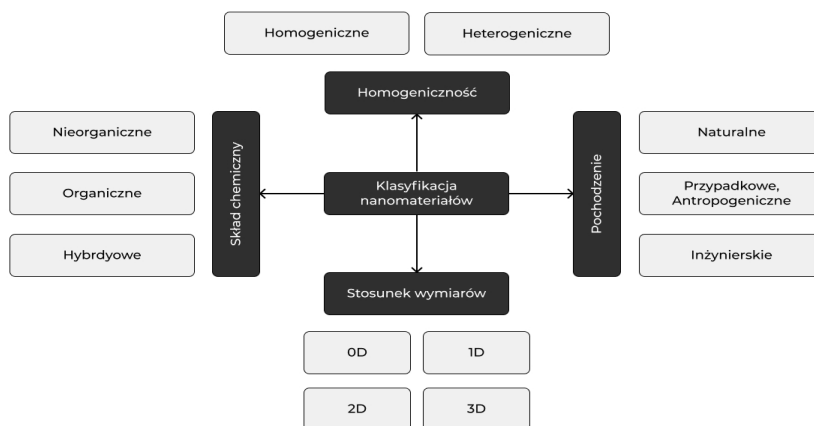
- bazujące na związkach węgla, tworzące takie struktury jak: puste rurki, elipsoidy lub kule. Przykładem tych nanomateriałów są fulereny (C_{60} , o kulistej budowie – ściętego dwudziestościanu foremnego), cebulki węglowe, czyli wielowarstwowe fulereny (ang. carbon nanooion, CNO), nanorurki węglowe, czyli jednościenne lub wielościenne cylindry ze zwiniętego grafenu (ang. carbon nanotubes, CNT), nanowłókna węglowe, węgiel bezpostaciowy (C, sadza), grafen (Gr);

- nanomateriały (metaliczne) nieorganiczne na bazie metali i tlenków metali (np. AuNPs lub AgNPs), tlenki metali, takie jak: TiO_2 NPs i ZnONPs oraz półprzewodniki bazujące na krzemie oraz materiały ceramiczne i silikonowe;

- nanomateriały organiczne wykonane głównie ze związków organicznych, z wyłączeniem klasy nanomateriałów bazujących na węglu opisanej wyżej, m.in. dendrymery, micelle, liposomy i nanocząstki polimerowe;

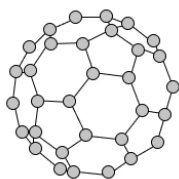
- nanomateriały kompozytowe, do których należą wielofazowe nanocząstki oraz nanostrukturalne materiały z jedną fazą w nanoskali, składające się z nanocząstek lub połączeń nanocząstek z większymi lub masowymi materiałami (np. hybrydowe nanowłókna) lub bardziej skomplikowane konstrukcje, takie jak

metalowo-organiczne; kompozyty mogą być dowolnymi kombinacjami nanomateriałów na bazie węgla, metalu lub substancji organicznych z dowolną postacią materiałów masowych z metalu, ceramiki lub polimeru.

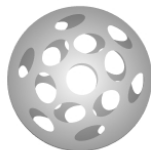


Rys. 1. Podział nanomateriałów na podstawie różnych kryteriów [Valcárcel i López-Lorente 2014]

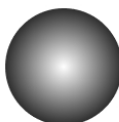
NPs nieorganiczne



Fuleren



Mezoporowate nanocząstki krzemionki



Fe₂O₃NPs

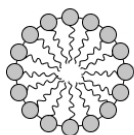


AuNPs

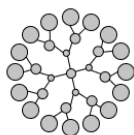


Qd

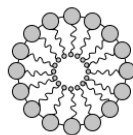
NPs organiczne



Micelle



Dendrymery



Liposomy



Polimery / Biomolekuły

Rys. 2. Przykłady nanocząstek z uwzględnieniem ich natury chemicznej [Richards i in. 2017]

Właściwości, jakie wykazują nanomateriały, często różnią się od tych, które są charakterystyczne dla ich masowych odpowiedników, czyli materiałów objętościowych (ang. bulk materials). Do specyficznych cech nanomateriałów można zaliczyć np. ograniczenie kwantowe w półprzewodnikowych kropkach kwantowych (zmiany barwy emisji światła) [Weller i in. 1986], superparamagnetyzm w nanocząstkach magnetycznych [Skumryev i in. 2003], zanik luminescencji nanomateriałów luminescencyjnych [Runowski i in. 2014] oraz efekty plazmoneczne w nanocząstkach metali (zmiana barwy zolu nanocząstek) [Barnes i in. 2003].

Zjawiska te głównie wynikają z dwóch przyczyn. Po pierwsze nanomateriały/nanocząstki z racji swoich małych wymiarów mają znacznie większą powierzchnię niż ten sam materiał wytwarzany w większej postaci. Powierzchnia właściwa (ang. specific surface area), wielkość powierzchni substancji stałej przypadająca na masę tej substancji oraz stosunek powierzchni nanocząstek do jej objętości, są odwrotnie proporcjonalne do ich średnicy i zwiększa się znacząco dla nanocząstek o średnicy mniejszej od 10 nm. Cecha ta wpływa na reaktywność chemiczną oraz właściwości mechaniczne i elektryczne takiego materiału [Köhler i in. 2008]. Ponadto dla cząstek o średnicy poniżej 50 nm prawa fizyki klasycznej mają mniejsze znaczenie niż prawa fizyki kwantowej, co przekłada się na ich właściwości optyczne, elektryczne i magnetyczne. Efekty te mogą nadać nanomateriałom bardzo użyteczne właściwości fizyczne, takie jak wyjątkową przewodność elektryczną lub oporność, oraz wysoką zdolność przechowywania lub przenoszenia ciepła, a nawet możliwe jest modyfikowanie ich właściwości biologicznych, np. zwiększenie toksyczności względem mikroorganizmów testowych [Tran i Chaudhary 2010, Zhang i in. 2014, Martínez-Castañón i in. 2008].

Wielkość nanocząstek jest podstawowym parametrem, który decyduje o ich właściwościach optycznych i plazmonecznych. Wzrost średnicy sferycznych nanocząstek złota (z 9 do 99 nm) powoduje przesunięcie maksimum ekstynkcji (pasm plazmowych) ich roztworów w kierunku fal długich [Link i El-Sayed 1999]. Oprócz wymiarów nanocząstek także inne cechy tych struktur mogą wpływać na parametry fizyko-chemiczne nanomateriałów [Woźniak i in. 2017]. Zaliczmy do nich: kształt [Woźniak i in. 2017], strukturę powierzchni [Kaasalainen i in. 2017], skład chemiczny [Park i in. 2003], rozpuszczalność [Studer i in. 2010], zdolność do agregacji [Poirier i in. 2014], a także warunki środowiskowe, w tym pH, zasolenie [Xu i in. 2007], czy obecność materii organicznej [Nel 2007].

Nanocząstki o identycznym składzie chemicznym i podobnych wymiarach, ale o różnych kształtach (różnej geometrii), zwykle wykazują różne widma ekstynkcji (z charakterystycznymi pasmami plazmonowymi) w zakresie promieniowania UV-VIS, co przejawia się różną trwałą barwą ich roztworów. Ponadto charakteryzują się one różną podatnością na modyfikację powierzchni oraz wychwyt i uwalnianie komórkowe [Banerjee i in. 2016, Forestiere i in. 2009, Orendorff i in. 2006].

Roztwory sferycznych nanocząstek srebra wykazują pasmo plazmonowe dla fali o długości około 380 nm. W przypadku podobnej wielkości nanocząstek srebra, ale pustych w środku (z wnęką) obserwuje się przesunięcia pasma plazmonowego w kierunku fal o większej długości (ang. red-shift). Roztwory sześciocięciennych nanocząstek srebra wykazują intensywne pasmo plazmonowe przy około 520 nm. Dla nanoprismatów srebra charakterystyczne jest pasmo w długofalowej części widma. Jego dokładne położenie zależy od długości krawędzi otrzymanych nanoprismatów. W przypadku nanoprętów srebra w widmie ekstynkcji w zakresie UV-Vis obserwuje się dwa pasma. Pierwsze położone przy około 400 nm pochodzi od wzbudzenia plazmonowego w osi poprzecznej nanopręta. Drugie pasmo jest przesunięte w stronę dłuższych długości fali. Pasma to przesuwają się w kierunku fal dłuższych wraz ze zwiększaniem się długości pręta [Krajczewski i Kudelski 2015].

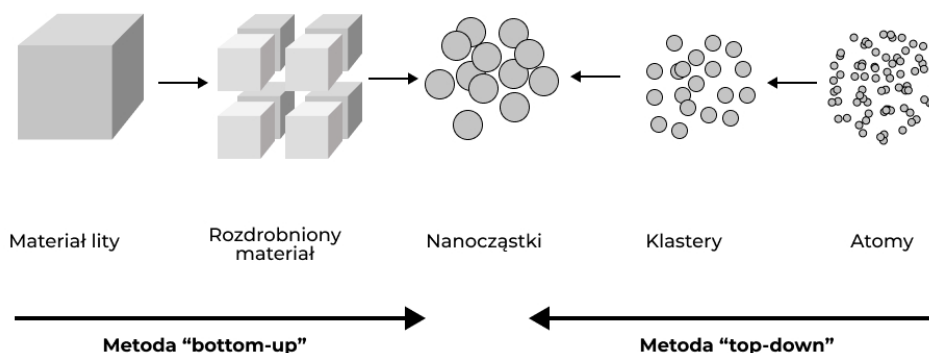
Natura chemiczna nanocząstek (skład pierwiastkowy) także wpływa na właściwości optyczne ich roztworów. Inne widma ekstynkcji będą miały nanocząstki o takim samym kształcie i średnicy wykonane z miedzi, srebra oraz złota. Na przykład sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 40–50 nm wykazują pasmo plazmonowe dla promieniowania o długości fali równej około 400 nm, zaś pasmo plazmonowe dla nanocząstek złota o takim samym rozmiarze jest przesunięte w kierunku fal dłuższych (550 nm). Bardzo duże znaczenie ma również udział materiałów w nanocząstce. Inne widma ekstynkcji mają nanocząstki jednoelementowe, inne nanocząstki stopowe, a jeszcze inne nanocząstki typu core-shell (rdzeń-otoczek) [Krajczewski 2018].

Podobnie jak w przypadku nanocząstek, zmiana parametrów morfologicznych kropek kwantowych (ang. quantum dots, Qd) prowadzi do interesujących efektów fotoluminescencyjnych. Qd o średnicy 2 nm charakteryzują się fluorescencją o długości fali odpowiadającej światłu niebieskiemu. Wraz ze wzrostem średnicy kropki kwantowej rośnie długość fali emitowanego promieniowania przez cały zakres światła widzialnego aż po promieniowanie podczerwone. Przez zmianę składu i odpowiedni dobór wielkości Qd możliwe jest uzyskanie fluorescencji w pełnym zakresie widma od ultrafioletu (UV) po bliską podczerwień (NIR) [Jamieson i in. 2007].

Cechą charakterystyczną ferro- i ferrimagnetyków jest modyfikacja ich właściwości magnetycznych przez odpowiednie rozmieszczanie cząsteczek w przestrzeni lub tworzenie układów hybrydowych z substancjami o różnych własnościach. Pokrycie magnetycznych nanocząstek dielektryczną krzemionką wpływa na fizyczne właściwości otrzymanego materiału. Podobnie adsorpcja kwasu oleinowego na powierzchni ferrytów pozwala na uzyskanie stabilnego koloidu magnetycznego w ośrodku o niskiej wartości przenikalności elektrycznej [Lefebure i Cabuil 1998]. Parametry magnetoptyczne tego typu materiałów można także modyfikować za pomocą odpowiednio silnych pól magnetycznych, powodujących orientowanie się dipoli cząsteczek, a nawet ich łączenie się w łańcuchy [Bacri i in. 1987].

1.3. Metody syntezy nanomateriałów

Istnieją dwie odmienne strategie otrzymywania nanomateriałów, a mianowicie typu „top-down” i „bottom-up”. Metody „top-down”, czyli „odgórne” polegają na rozdrabnianiu materiałów litych do nanomateriałów/nanocząstek. Są one często wykorzystywane na skalę przemysłową, jednak zwykle dostarczają produktów o zdefektowanych, niejednorodnych pod względem wielkości (polidispersyjnych) cząstkach. Metody typu „bottom-up”, czyli „oddolne”, polegają na tworzeniu klasterów z pojedynczych atomów/jonów, ich nukleacji (wytworzeniu jąder, zwanych też zarodkami o średnicy 1–2 nm) i ich dalszym kontrolowanym wzroście do nanocząstek. NPs są strukturami o małej stabilności chemicznej z tendencją do szybkiej agregacji, w wyniku czego przyjmują rozmiary makroskopowe i tracą unikalne dla struktur nano cechy. Dodanie środków stabilizujących (opłaszczających nanocząstki) zapobiega temu procesowi.



Rys. 3. Schemat syntezy nanocząstek: „podejście oddolne” i „podejście odgórne” [Kurzydłowski i Lewandowska, 2011].

Podstawą metod „oddolnych” są reakcje syntezy chemicznej lub odpowiednie procesy fizyczne czy fizyko-chemiczne. Do metod tych można zaliczyć: współstrącanie nanocząstek w roztworach, nanoszenie prekursorów/produktów warstwa po warstwie (technika Langmuira-Blodgetta), powierzchniowa wymiana redox, synteza w warunkach hydrotermalnych, hydroliza reagentów i ich późniejsza kondensacja itp. Za pomocą tych metod można uzyskać zaawansowane, monodispersyjne nanostruktury, np. typu rdzeń/powłoka, nanokompozyty i materiały hybrydowe o dużym stopniu krystaliczności i odpowiednio zmodyfikowanej powierzchni.

Podejścia „odgórne” są z zasady prostsze i polegają na rozdrabnianiu lub podziale materiału litego w celu utworzenia NPs. Przykładami tych metod są mielenie, kruszenie, fizyczne osadzanie z fazy gazowej (PVD), rozkład termiczny, ablacja laserowa, trawienie i rozpylanie i inne techniki rozkładu [Iravani

2011]. Rozdrabnianie (mielenie) prowadzi zwykle do defektów struktury (sieci krystalicznej) oraz uzyskuje się zwykle większy rozrzut (dystrybucję wielkości nanocząstek). Poniżej przedstawiono schemat syntezy nanocząstek metodami „top-down” i „bottom-up” (rysunek 3). Przykłady najczęściej wykorzystywanych technik w syntezie „oddolnej” i „odgórnej” oraz ich zalety i wady podano w tabeli 2.

Tabela 2. Przykłady metod syntezy nanocząstek w ramach podejścia „oddolnego” i „odgórne” oraz ich główne wady i zalety

Cechy procesu	Podejście eksperymentalne	
	„oddolne”	„odgórne”
Metody syntezy	redukcja chemiczna, elektrochemiczna lub utlenianie; synteza fotochemiczna; sonochemiczna, hydro/solwotermiczna; termoliza; metody biologiczne; współstrącanie; mikroemulsje; międzyfazowe metody syntezy; dyspersja solwatowanych atomów metali, synteza wspomagana mikrofalami; zatrzymane wytrącanie; osadzanie warstw atomowych; wytwarzanie żelu zolowego, osadzanie chemiczne w fazie pary	konwencjonalne i niekonwencjonalne metody litograficzne; mikroobróbka; frezowanie kulowe (mielenie w młynach kulowych); eksplozja drutu; wyładowania w łuku; ablacja laserowa; rozpylanie jonowe; kondensacja gazu obojętnego
Wady, zalety	Zalety: większa szansa na wytwarzanie NPs z mniejszą liczbą defektów sieci krystalicznej, ulepszonym jednorodnym składem chemicznym i ulepszonym porządkowaniem atomów w zakresie bliskiego i dalekiego zasięgu, korzyści pod względem kosztów, skalowalności i jednorodności. Wady: wymóg kompatybilnych powierzchni i cząsteczek, mniej możliwości manipulowania atomami i cząsteczkami	Zalety: wysoka skalowalność (możliwość kształtowania wielkości struktur), powtarzalność, prosta technologia umożliwiająca produkcję NPs na masową skalę, niski koszt produkcji Wady: niedoskonałość struktury powierzchniowej i krystalograficznej przetwarzanych materiałów; wymóg stosowania dużych i drogich narzędzi

Mając na uwadze mechanizm reakcji, wyróżnia się trzy główne grupy metod syntezy nanocząstek: chemiczne, fizyczne i biologiczne. Najbardziej rozpowszechnione oraz najliczniejsze są metody chemiczne. Należą one do metod najstarszych, najlepiej poznanych i przystosowanych do produkcji nanocząstek na dużą skalę. Są one stosunkowo łatwe, wydajne, powtarzalne i tanie, gdyż nie wymagają skomplikowanej aparatury. Otrzymane produkty mogą być przecho-

wywane przez długi czas bez znaczących zmian ich stabilności. Natomiast ich wadą jest zanieczyszczenie produktu, gdyż w roztworze oprócz nanocząstek mogą także znajdować się pozostałości reduktora, stabilizatora oraz produkty uboczne tego procesu. W niektórych przypadkach usunięcie cząsteczek stabilizatora jest bardzo trudne i koliduje z utrzymaniem odpowiedniej struktury wytworzonych nanocząstek.

Metody fizyczne wykorzystują do syntezy pożądanego produktu m.in. mikrofale, ultradźwięki, naświetlanie, wysoką temperaturę, mechaniczne rozdrabnianie oraz różnego rodzaju matryce. Metody te prowadzą do uzyskania nanocząstek jednolitych pod względem wielkości (monodispersyjnych) i braku zanieczyszczeń typowych dla metod chemicznych (rozpuszczalników i nadmiaru reagentów). Są one jednak kosztowne i wymagają użycia specjalistycznego sprzętu (np. pieca rurowego), który zajmuje dużo miejsca [Iravani i in. 2014].

Metody fizykochemiczne bazujące na procesach elektrochemicznych, mimo że umożliwiają uzyskanie stabilnych nanocząstek o ściśle określonych rozmiarach i kształcie, są stosowane rzadziej niż opisane wcześniej metody.

Do kolejnej grupy zalicza się odkryte stosunkowo niedawno metody biochemiczne, zwane także biologicznymi, w których do syntezy nanocząstek metalicznych stosuje się naturalne ekstrakty roślinne oraz metabolity grzybów mikroskopowych, bakterii (w tym promieniowców) czy mikroalg. W porównaniu z konwencjonalnymi metodami stanowią one tanie i bezpieczne narzędzie do wytwarzania nanocząstek. Wśród wykorzystywanych czynników biologicznych najwyższą efektywność wykazują ekstrakty roślinne (redukują jony metali szybciej niż mikroorganizmy, a uzyskany produkt charakteryzuje się wysoką stabilnością [Iravani 2011]. Nie bez znaczenia jest także to, że ekstrakty roślinne można przygotować według ujednoczonych procedur, co zapewnia powtarzalność ich parametrów. Głównie przygotowuje się je z wysuszonego i sproszkowanego materiału poprzez zagotowanie w wodzie dejonizowanej. Przefiltrowany napar wykorzystuje się jako źródło czynników redukujących i stabilizujących w biosyntezie nanocząstek [Ahmed i in. 2016].

W przypadku mikroorganizmów w zależności od tego, czy wykorzystuje się metabolity zewnątrz czy wewnątrzkomórkowe, proces syntezy nanocząstek może zachodzić w płynach pochodowlanych (wtedy usuwa się np. przez wirowanie biomasę mikroorganizmów) lub w obecności biomasy (wtedy usuwa się płyny pochodowlane) [Singh i in. 2019]. Metoda wewnątrzkomórkowa jest wygodniejsza i prostsza, gdyż eliminuje etap uwalniania powstałych nanocząstek z komórek mikroorganizmów oraz ich oczyszczania.

Tabela 3 przedstawia przykłady procedur syntezy nanocząstek srebra (AgNPs) metodami chemicznymi, fizycznymi, fizyko-chemicznymi i biologicznymi wraz z charakterystyką otrzymanego produktu. Przedstawione przykłady metod chemicznych, fizyko-chemicznych i biologicznych polegają na redukcji prekursora nanocząstek (jonów srebra Ag^{+1} , które powstają z dysocjacji soli najczęściej azotanu srebra AgNO_3 do formy metalicznej Ag^0). Kolejnym etapem jest zarodkowanie (nukleacja), czyli powstanie klastrów nanocząstek (AgNCs), w wyniku zderzania atomów srebra. Mają one zdolność do rozrastania się dzięki

Tabela 3. Przykłady wybranych metod chemicznych, fizycznych i biologicznych syntezy AgNPs

Typ reakcji	Mechanizm	Warunki procesu	Charakterystyka produktu	Literatura
Metody chemiczne				
Redukcja chemiczna w roztworach wodnych lub alkoholowych	Redukcja soli srebra przez czynnik redukujący do atomów/jonów, tworzenie klastrów, nukleacja, stabilizacja najczęściej po dodaniu stabilizatora	Synteza w roztworach wodnych. Prekursorem nanocząstek jest najczęściej wodny roztwór AgNO ₃		
		Metoda cytrynianowa. Jony cytrynianowe pełnią zarówno funkcję reduktora, jak i stabilizatora. Proces syntezy zachodzi w temp. 100°C	AgNPs o średnicy od 30–150 nm i różnej geometrii (kule, wielościany, płyty)	Lee i Meisel 1982
		Metoda borowodorkowa (Creighton'na). Borowodorek sodu (NaBH ₄) jest reduktorem, stabilizatorem natomiast – jony cytrynianowe lub PVP. Proces zachodzi w temperaturze pokojowej lub obniżonej do około 0°C	AgNPs o dość wąskim rozkładzie wielkości, o średnicy ok. 10 nm	Creighton i in. 1979
		Metoda glutationowa I. Glutation jako czynnik redukujący i stabilizujący. Proces zachodzi w temperaturze 60°C i wymaga mieszania. Kontrola rozmiarów poprzez różny czas mieszania	AgNPs o kształcie kulistym o średnicy od 3 do 8 nm	Balavandy i in. 2016
		Metoda glutationową II. Do wodnego roztworu azotanu srebra dodaje się niewielką ilość zredukowanego glutationu, a następnie roztwór NaOH. Powstają nanokryształy Ag ₂ O, które ulegają redukcji pod wpływem silnego reduktora (borowodorku sodu lub hydrazyny)	AgNPs o kształcie sferycznym, puste w środku (z tzw. wnęką)	Ben Moshe i Markovich, 2011
		Kwas galusowy jako czynnik redukujący i stabilizujący	AgNPs o kształcie sferycznym (7 i 29 nm) lub prawie sferycznym (89 nm) i małej dyspersji rozmiarów	Martínez-Castañón i in. 2008
		Synteza w rozpuszczalnikach organicznych		
		Glikol etylenowy jako rozpuszczalnik, w którym przebiega reakcja, jest jednocześnie reduktorem (reakcja zachodzi w temperaturze wrzenia glikolu, ok. 197°C. PVP lub cytrynian sodu pełnią funkcje stabilizatorów. Kontrola rozmiarów i geometrii nanocząstek odbywa się za pośrednictwem temperatury środowiska reakcji	AgNPs o kształcie sferycznym, sześciątów, ośmiościanów, kostek i prętów	Zeng i in. 2010
		DMF jako rozpuszczalnik soli srebra oraz reduktor jonów srebrowych. Reakcja syntezy nanocząstek przebiega w temperaturze 156°C	Dziesięciościenne AgNPs	Tsuj i in. 2010
Alkohol etylowy jako rozpuszczalnik azotanu srebra i związek redukujący jony Ag ⁺ . Redukcja jonów srebrowych do srebra metalicznego (Ag ⁰) zachodzi podczas ciągłego mieszania mieszaniny. Konieczne jest dodanie stabilizatora np.	AgNPs o kształcie sferycznym o średniej średnicy 2–3 nm, jedynie w obecności MTS	Hah i in. 2003		

		organoalkoksylianów. Dobór parametrów syntezy, takich jak stężenie soli srebra i stabilizatora, stosunek molowy reduktora do soli srebra oraz warunki reakcji (temperatura, pH, mieszanie i czas syntezy) wpływają na morfologię i stabilność nanocząstek	powstają większe nanocząstki o średnicy 35 nm	
Redukcja w mikroemulsji (system odwrotnej miceli)	Kolizje i fuzje (kwaescencje) odwróconych miceli zawierających prekursor nanocząstek i czynnik redukujący. Redukcja, nukleacja i wzrost nanocząstek zachodzą wewnątrz odwróconych miceli	Środki powierzchniowo czynne: SDS, Triton-X, biosurfaktant rhamnolipid, surfaktanty gemini czy AOT stabilizują micelle. Kontrola geometrii nanocząstek poprzez początkową pulę zarodków, temperaturę i rodzaj stabilizatora	AgNPs o kształcie nanoprętów	Jana i in. 2001
			AgNPs o kształcie bipiramid (trójkątów)	Lee i in. 2015.
Metody fizyczne				
Odparowywanie w połączeniu ze skraplaniem	Ogrzewane srebra w wysokiej temperaturze prowadzi do jego odparowania i powstania jonów. W procesie nukleacji wytwarzane są zarodki, które dojrzewając dają nanocząstki. Proces schładzania prowadzi do kondensacji nanocząstek metalu	Odparowanie w wysokiej temperaturze przeprowadza się w piecach muflowych przy ciśnieniu atmosferycznym bądź przy użyciu małych grzałek ceramicznych z miejscowym obszarem grzewczym. Kinetyka zmian temperatury ogrzewania i schładzania prowadzi do zmian efektywności procesu, morfologii i stabilności nanocząstek	Sferyczne AgNPs o średnich rozmiarach w zakresie 6,2–21,5 nm, bez oznak agregacji	Jung i in. 2006
Ablacja laserowa	Działanie wiązką laserową o dużej mocy na sztabkę srebra, z której odparowują atomy metalu i przechodzą do roztworu zawierającego stabilizator	Stosuje się lasery impulsowe lub pracy ciągłej o dużej mocy. Parametry pracy lasera można modyfikować. Impulsy światła o długości fali 532 nm z częstotliwością 10 Hz, średnią energią impulsu 90 mJ/impuls, średnica wiązki laserowej – 3 mm, stabilizator – SDS w stężeniu 0,01 mol/dm ³	Sferyczne AgNPs o średniej wielkości 14,9 ±8,4 nm, duża wydajność i powtarzalność procesu	Mafuné i in. 2000
		Impulsy światła o długości fali 532 nm, z częstotliwością 10 Hz i średnią energią impulsu 80 mJ/impuls, stabilizator cytrynian sodu. Kontrola wielkości nanocząstek poprzez rodzaj, stężenie stabilizatora i parametry pracy lasera	Sferyczne AgNPs o średniej wielkości 8 ±2 nm	Binh i in. 2008
Metody fizykochemiczne				
Metoda elektrochemiczna (cykliczna woltamperometria lub metoda galwanostatyczna)	Elektrochemiczna redukcja jonów srebra obejmuje dwa procesy na powierzchni katody, odpowiednio tworzenie/zarodkowanie cząstek srebra na powierzchni katody i osadzanie warstwy srebra	Stabilizatorami, jeśli są wymagane, są najczęściej PVP, PEG lub sole tetraoctyloamonowe. Czasami są także stosowane stabilizatory polimerowe, takie jak DNA. Morfologię AgNPs można kontrolować za pomocą parametrów elektrosyntezy, takich jak potencjał elektrody pracującej i gęstość prądu		
		Synteza elektrochemiczna AgNPs metodą woltamperometrii cyklicznej z zastosowaniem jonowych i niejonych	Sferyczne AgNPs o rozmiarach około 10–55 nm, charakteryzujące się dużą	Dobre i in. 2014

		surfaktantów: PVP i Na-LS w celu stabilizacji układu koloidalnego	stabilnością, z niewielką tendencją do aglomeracji	
		Synteza elektrochemiczna AgNPs w dwufazowym układzie woda–izooktan przeprowadzana metodą elektrolizy w obecności metylowiologenu użytego jako mediatora. Stabilizatorem był anionowy środek powierzchniowo czynny DOSS	Polidispersyjne AgNPs o wielkości od 5 do 71 nm	Fazleeva i in. 2019
		Synteza elektrochemiczna przeprowadzona metodą woltamperometrii cyklicznej w roztworze NaPA, przy wykorzystaniu srebrowej anody pomocniczej	AgNPs sferyczne o wielkości do 30 nm	Kuntyi i in. 2021
Metoda fotochemiczna	Mechanizm rodnikowy. Do redukcji jonów srebra i syntezy AgNPs wykorzystuje się promieniowanie elektromagnetyczne o różnej długości fali. W wyniku fotolizy wody lub cząsteczek fotouczulacza powstają wolne rodniki, które redukują jony srebra do srebra metalicznego (fotoredukcja). Często są także konieczne stabilizatory do zapobiegania wytrącania AgNPs z roztworu	Naświetlanie wiązką laserową o długości fali 500 nm roztworu AgNO ₃ i SDS (jako stabilizatora)	Sferyczne AgNPs o średniej średnicy 13,3 ±2,6 nm	Abid i in. 2002
		Naświetlanie światłem o długości fali 320 nm roztworu AgNO ₃ zawierającego fotouczulacz I-2959 oraz stabilizator cytrynian sodu	AgNPs o kształcie sferycznym, monodispersyjne, o średniej wielkości ok. 10 nm	Stamplecoskie i Scaiano 2012
		Naświetlanie światłem UV o długości fali 286 nm roztworu AgNO ₃ w obecności cytrynianu sodu, wodorotlenku sodu oraz fotouczulacza BSPP	Sferyczne AgNPs o średniej średnicy ok. 8 nm	Zhang i in. 2011
		Naświetlanie roztworu małych, sferycznych cząstek AgNPs w obecności cytrynianu sodu światłem o długości fali 550 nm	Dwa rodzaje nanoprzyrządów AgNPs: o średniej długości krawędzi 70 nm oraz 150 nm	Jin i in. 2001
		Naświetlanie sferycznych AgNPs, sfunkcjonalizowanych L-argininą światłem o długości fali 500 nm przez 15 godzin	AgNPs o kształcie dziesięciościanów	Pietrobon i Kitaev 2008
		Naświetlanie sferycznych nanocząstek srebra oraz złota przez kilka godzin światłem niebieskim	Nanopręty AgNPs o różnej długości i szerokości	Zhang i in. 2011
		Kontrola geometrii nanocząstek głównie poprzez wybór odpowiedniej długości fali służącej do napromieniowania roztworów nanocząstek	OD i 1D (nanopręty, nanoprzyrządy) typu „rdzeń-powłoka” Au@Ag	Xue i in. 2007
Metoda sonoelektrochemiczna	Do syntezy AgNPs wykorzystuje się ultradźwięki w atmosferze gazu obojętnego (argon lub azot). Ultradźwięki o częstotliwości 20–50 kHe powodują rozpad cząsteczki wody z wytworzeniem wolnych rodników. Rodniki wodorowe redukują jony srebra	Działanie impulsów ultradźwiękowych na wodny roztwór AgNO ₃ w obecności NTA. Kształt nanocząstek zależy od stężenia i proporcji AgNO ₃ do NTA	AgNPs o kształcie sferycznym, prętów i dendrymerów	Zhu i in. 2000
		Działanie impulsów ultradźwiękowych na nasycony roztwór cytrynianu srebra w obecności PVP jako stabilizatora	Monodispersyjne AgNPs o kształcie sferycznym o średniej wielkości od 20 do 25 nm. Brak PVD prowadzi do syntezy nanocząstek w formie dendrymerów	Jiang i in. 2004
		Działanie impulsów ultradźwiękowych na nanokryształ AgBr (prekursor nanocząstek) w roztworze żelatyny	Amorficzne AgNPs	Liu i in. 2001

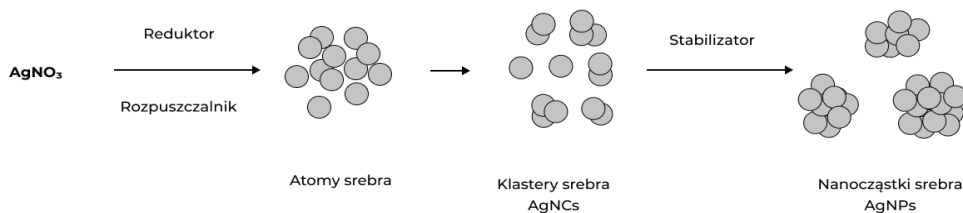
Metody biologiczne				
Ekstrakty roślinne	AgNO ₃ jest najczęściej prekursorem formy jonowej srebra, które ulega redukcji za pomocą składników ekstraktów o właściwościach redukujących. Powstałe nanocząstki są stabilizowane przez fitozwiązki	Etanolowo-wodne ekstrakty z nst. roślin: oregano (<i>Origanum dictamnus</i>), szalwia (<i>Salvia officinalis</i>), rokitnik (<i>Elaeagnus rhamnoides</i>) i nagietek (<i>Calendula officinalis</i>) jako źródła czynników redukujących jonową formę srebra oraz czynników stabilizujących wytworzone AgNPs. Proces biosyntezy zachodzi w obecności światła, w temperaturze pokojowej w ciągu 24 godzin	Uzyskano AgNPs o różnej geometrii: sferyczne, trójkątne, wielokątne a także w formie prętów (dla ekstraktów z oregano i szalwii). Sferyczne i pręty (dla rokitnika). Sferyczne (dla nagietka). Średnia wielkość nanocząstek w zależności od ekstraktu mieściła się w zakresie od 79–369 nm	Siakavella i in. 2020
		Ekstrakt z liści żurawiny (<i>Carissa carandas</i> L.) jako czynnik redukujący i stabilizujący. Proces biosyntezy nanocząstek prowadzono w temperaturze pokojowej (25°C) i 60°C	AgNPs o krystalicznej strukturze i średniej wielkości 35 ±2 nm (dla temperatury 25°C) i 30 ±3 nm (dla temperatury 60°C)	Singh i in. 2021
		Ekstrakt z nadziemnych części oregano (<i>Origanum vulgare</i> L.) służył jako czynnik redukujący i stabilizujący. Proces biosyntezy prowadzono przez 2 godziny w temperaturze 85–90°C	Krystaliczne, polidispersyjne AgNPs o kształcie sześciątów o wielkości od 2 do 25 nm (średnia wielkość ok. 12 nm)	Shaik i in. 2018
		Ekstrakt z liści arbuza (<i>Citrullus lanatus</i> sp.) służył jako czynnik redukujący i stabilizujący. Proces biosyntezy prowadzono w temperaturze pokojowej	AgNPs o strukturze krystalicznej (sześciiany) o średniej wielkości 21, 27 nm	Aktepe i Baran 2021
		Wodne ekstrakty z dwóch dostępnych w Argentynie produktów yerba mate oraz ich odpadów (próbki PYM i TYM), których składniki pełniły rolę reduktorów i stabilizatorów w biosyntezie AgNPs. Proces przeprowadzono w temperaturze pokojowej	AgNPs o kształcie sferycznym, heksagonalnym i trójkątów o średniej wielkości cząstek wynoszącej 50 nm	Arreche i in. 2018
		Płyny po hodowli grzybów i/lub ich biomasa	Jony srebra mogą być redukowane za pomocą zależnej od NADPH reduktazy azotanowej, hydrogenaz lub fitochelatyn	Płyny pochodzące z <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> i <i>Geotrichum candidum</i> . Optymalny czas reakcji – 72 godzin
Biomasa <i>Aspergillus</i> sp.	AgNPs sferyczne o wielkości od 20–55 nm			Ninganagouda i in. 2014
Płyny pochodzące z <i>Kluyveromyces marxianus</i> i <i>Candida utilis</i> 22 z dodatkiem cytrynianu sodu jako czynnika redukującego, temperatura 140°C w obecności światła	AgNPs sferyczne o wielkości w zakresie 3–12 nm, bez cech aglomeracji (dla <i>K. marxianus</i>) i 6–20 nm o dużym stopniu aglomeracji (dla <i>C. utilis</i>)			Ashour 2014

Płyny po hodowli bakterii i/lub biomasa bakterii	Jony srebra mogą być redukowane za pomocą zależnej od NADPH reduktazy azotanowej, hydrogenaz lub fitochelatin	Płyn po hodowli halotolerancyjnej bakterii <i>Bacillus endophyticus</i> SCU-L jako źródło związków redukujących i stabilizujących	AgNPs sferyczne o średniej wielkości około 5,1 nm. Stabilne podczas przechowywania przez 3 miesiące w roztworze wodnym w temperaturze pokojowej, w ciemności.	Gan i in. 2018
		Płyn po hodowli bakterii ryzosferowej <i>Massilia</i> sp. jako źródło związków redukujących i stabilizujących. Czas reakcji – 48 godzin	AgNPs o kształcie sferycznym i zakresie wielkości od 15–55 nm	Huq i Akter 2021
		Biomasa bakterii <i>Pseudomonas</i> sp. ef1 w temperaturze 22°C w czasie 24 godzin w obecności światła	Polidispersyjne, sferyczne AgNPs o wielkości od 10 do 70 nm (ze średnim wymiarem ok. 50 nm)	John i in. 2020
		Płyn po hodowli <i>Bacillus methylotrophicus</i> DC3 jako źródło związków redukujących i stabilizujących. Proces przeprowadzano w temperaturze 28°C w ciągu 48 godzin	AgNPs sferyczne o wielkości od 10–30 nm	Wang i in. 2016
		Płyny pohodowlane (po autolizie) <i>Streptomyces</i> sp. i <i>Aspergillus fumigatus</i> jako źródło reduktorów i stabilizatorów nanocząstek. Proces przeprowadzano w temperaturze 28°C w czasie dłuższym niż 48 godzin	AgNPs zdyspergowane o średnicach od 15 do 45 nm (dla płynu pohodowlanego <i>A. fumigatus</i>) i 15–25 nm (dla płynu pohodowlanego <i>Streptomyces</i> sp.)	Alani i in. 2012

Objaśnienia do tabeli: SDS – dodecylosiarczan sodu (ang. sodium dodecyl sulfate); AOT – bis(2-etyloheksylo) bursztynianosulfonian sodowy (ang. dioctyl sulfosuccinate sodium salt); DMF – N,N-dimetyloformamid (ang. N,N-dimethylformamide); PVP – poli(N-winylopirolidon) (ang. polyvinylpyrrolidone); PEG – poliglikol etylenowy (ang. polyethylene glycol); Na-LS – laurylosiarczan sodu (ang. sodium lauryl sulfate); NaPA – poliakrylan sodu (ang. sodium polyacrylate), BSPP – bis(p-sulfonatofenylo)fenylofosfina (ang. bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine dihydrate dipotassium salt); I-2959 – 1-[4-(2-hydroksyetoksy)-fenylo]-2-hydroksy-2-metylo-1-propan-1-on; NTA – nitylooctan (ang. nitriloacetate); DOSS – ang. sodium dioctyl sulfosuccinate

adsorpcji lub nieodwracalnym procesom wbudowana atomów Ag^0 do swojej struktury. Obecność czynnika stabilizującego o powinowactwie do powierzchni nanocząstek chroni je przed agregacją (rysunek 4). Pomimo tego samego mechanizmu syntezy nanocząstek srebra, metody te różnią się rodzajem i pochodzeniem czynników redukujących i stabilizujących. W metodach chemicznych czynnikiem redukującym jest związek chemiczny (np. borowodorek sodu, hydrazyna, kwas galusowy czy hydrochinon) lub odpowiedni czynnik fizyczny (np. promieniowanie lasera, ultradźwięki), a w metodzie biologicznej są to składniki ekstraktów roślinnych, biomasy mikroorganizmów lub płynów po ich hodowli. W przypadku bakterii i grzybów są to najprawdopodobniej: reduktaza azotanowa zależna od NADPH. W procesie tym mogą także uczestniczyć białka i cukry ściany komórkowej mikroorganizmów, aminokwasy takie jak: arginina, kwas asparaginowy, cysteina, kwas glutaminowy, lizyna, metionina, czy peptydy zawierające mostki siarczkowe [Mikhailova 2020]. Natomiast w przypadku ekstraktów roślinnych rolę czynników redukujących jony Ag^{+1} pełnią: kwasy fenolowe, kwasy organiczne, flawonoidy, alkaloidy i terpenoidy [Aromal i Philip 2012].

Do zatrzymania reakcji w odpowiednim punkcie w metodach chemicznych i fizyko-chemicznych stosuje się stabilizatory takie jak np.: niejonowe syntetyczne surfaktanty (poliwinylpirolidon (PVP), poliakrylany, polialkohol winylowy (PVA), poliakrylonitryl, poliakrylamid czy glikol polietylenowy (PEG)) lub związki organiczne (chitozan, pochodne amin, tiole, kwas glukonowy, cytrynowy), natomiast w metodach biologicznych są to substancje wchodzące w skład komórek lub ich zewnątrzkomórkowe metabolity [Dakal i in. 2016]. W przypadku ekstraktów roślinnych mogą nimi być witaminy, białka, enzymy, polisacharydy, fenole, saponiny, garbniki, alkaloidy oraz terpenoidy [Altemimi i in. 2017]. W przypadku bakterii rolę ich mogą pełnić: peptydy, enzymy, kwasy karboksylowe, aldehydy, ketony, cukier ramnoza i ramnolipidy. Zakłada się, że enzymy mogą wiązać się z nanocząstkami srebra za pomocą wolnych grup aminowych i cysteinowych białek [Mikhailova 2020]. Ze względu na różnorodność metabolitów roślinnych i mikroorganizmów zdolnych do redukcji jonów srebra oraz do wiązania z powierzchnią AgNPs dokładny mechanizm biosyntezy AgNPs pozostaje wciąż kwestią otwartą. Chociaż w niektórych przypadkach udało się zidentyfikować czynniki redukujące i stabilizujące AgNPs, nie jest wykluczone, że inne związki komórkowe mogą także w tym procesie uczestniczyć, modulując przebieg procesu biosyntezy poprzez oddziaływania synergistyczne. Pomimo to metody biologiczne mają szereg zalet takich jak: opłacalność, wysoka wydajność procesu i jakość produktu (brak szkodliwych zanieczyszczeń i substancji odpadowych, dobrze zdefiniowany rozmiar i morfologia AgNPs). Jeśli chodzi o morfologię, to wytwarzanie nanocząstek za pośrednictwem ekstraktów roślinnych skutkuje bardziej korzystnym energetycznie kształtem nanocząstek – kulistym, co zapewnia im niezbędną reaktywność warunkującą ich zastosowanie, w tym w działalności rolniczej. Metody biologiczne to proste, bardziej ekologiczne i przyjazne dla środowiska techniki syntezy AgNPs.



Rys. 4. Mechanizm syntezy AgNPs

Istotnym aspektem syntezy nanocząstek jest możliwość kontroli ich wielkości i morfologii, gdyż parametry te warunkują ich specyficzne właściwości fizyko-chemiczne i biologiczne (magnetyczne, katalityczne, optoelektroniczne i mechaniczne). Głównymi czynnikami, które decydują o geometrii nanocząstek są: rodzaj i stężenie reagentów (prekursora nanocząstek, stabilizatora, obecność i stężenie związków powierzchniowo czynnych (biosurfaktantów), a także warunki przebiegu procesu (środowisko reakcji, temperatura, pH, mieszanie, czas syntezy). Sposoby kontroli wielkości i kształtu nanocząstek srebra dla wybranych metod ich syntezy przedstawiono w tabeli 3.

1.4. Metody badania właściwości nanomateriałów

Do charakterystyki nanomateriałów/nanocząstek (badania kształtu, wymiaru, morfologii powierzchni, ładunku powierzchniowego), a także oddziaływania z rozpuszczalnikami bądź polimerami stosuje się głównie metody spektroskopowe (emisyjne, absorpcyjne, rozpraszania), mikroskopowe (optyczne, elektronowe) oraz dyfrakcyjne (rentgenowskie, elektronowe, neutronowe). Każda z tych metod dostarcza innych informacji o analizowanej próbce. Obecnie w analizie nanomateriałów wykorzystywanych jest ponad 400 różnych procedur badawczych. Dlatego niezbędne jest dostosowanie rodzaju badań do charakteru chemicznego i fizycznego próbek zawierających nanomateriały. Generalnie stosuje się inne podejście metodyczne w przypadku próbek stanowiących roztwory nanomateriałów oraz próbek w stanie suchym [Modena i in. 2019]. Rysunek 5 przedstawia metody analityczne stosowane w badaniach struktury nanomateriałów z uwzględnieniem stanu skupienia próbki.

Metody spektroskopowe, ze względu na ich powszechną dostępność, dają największe możliwości analizy cząstek rozpuszczonych w cieczach. Spektroskopia absorpcyjna w zakresie widzialnym i ultrafiolecie (ang. ultrafiolet-visible, UV-VIS) może być użyteczna przy sporządzaniu charakterystyki optycznej nanocząstek metali szlachetnych. Analiza widm ekstynkcji UV-VIS dostarcza informacji o kształcie, budowie chemicznej i rozmiarach nanocząstek. Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni (ang. fourier transform infrared

spectroscopy, FT-IR) służy do analizy struktury i składu próbek oraz umożliwia detekcję związków organicznych przyłączonych do powierzchni nanocząstek. Spektroskopia luminescencyjna może być wykorzystywana do wykrywania w próbce określonych grup funkcyjnych, związków kompleksowych i jonów na zasadzie emisji światła w wyniku wzbudzenia promieniowaniem o charakterystycznej dla danej substancji długości fali. Spektroskopia korelacji fluorescencji (ang. fluorescence correlation spectroscopy, FCS) oraz spektroskopia krzyżowej korelacji fluorescencji (ang. fluorescence cross correlation spectroscopy, FCCS) to techniki polegające na detekcji i analizie światła emitowanego przez wzbudzone składniki próbki. Jeśli nie wykazują one autofluorescencji konieczne jest stosowanie znaczników fluorescencyjnych. Metoda ta umożliwia oznaczenie wielkości nanocząstek w zakresie od 1 nm do około 1 μm , czyli do 1000 nm oraz rozkładu ich wielkości [Bacia i in. 2006].

Spektrometria masowa (ang. mass spectrometry, MS) obok wymienionych wyżej technik spektroskopowych jest podstawową metodą identyfikacji substancji biologicznie aktywnych. Jej zaletą jest bardzo wysoka czułość, która w połączeniu z innymi technikami analitycznymi, takimi jak: chromatografia cieczowa (ang. liquid chromatography – mass spectrometry, LC-MS) lub elektroforezą kapilarną (np. metoda strefowej elektroforezy kapilarnej (ang. capillary zone electrophoresis-mass spectrometry, CZE-MS) i dwuwymiarową elektroforezą żelową (ang. two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry, 2D-GE) daje możliwości przeprowadzenia analizy złożonych mieszanin. Połączenie technik separacji mieszanin nanocząstek i detektorów MS umożliwiło oznaczenie stężenia i rozkładu wielkości nanocząstek w zakresie od kilku do około 50 nm z możliwością wykrywania pojedynczych cząstek [Robinson 2013]. MS jest jedną z nielicznych metod dostarczających informacji o warstwie funkcjonalnej na powierzchni nanocząstek oraz o charakterze interakcji makromolekuł z powierzchniową warstwą nanocząstek [Bustos i in. 2013, Fernández-Iglesias i Bettmer 2015, Chen i in. 2017].

Dynamiczne i elektroforetyczne rozpraszanie światła (ang. dynamic light scattering, DLS i electrophoretic light scattering, ELS), umożliwiające określenie promienia hydrodynamicznego nanocząstek, dostarczają danych odnośnie rozkładu wielkości cząstek koloidalnych, ich stabilności oraz uśrednionego ładunku powierzchniowego cząstek, tj. potencjału-zeta [Doktorovova i Souto 2009]. Metoda DLS jest przydatna do badania struktury materiałów w szerokim zakresie wymiarów od 2 nm do około 6 μm [Gaumet i in. 2008]. Umożliwia ona precyzyjny pomiar wielkości cząstek monodispersyjnych o kształcie sferycznym. Uzupełnieniem metody DLS jest metoda śledzenia nanocząstek (ang. nanoparticle tracking analysis, NTA). Podobnie jak w przypadku DLS, analiza śledzenia nanocząstek umożliwia charakterystykę wielkości na podstawie analizy swobodnej dyfuzji cząstek w roztworze. Dzięki temu możliwe jest oznaczenie wielkości cząstek w zakresie od 30 nm do 1000 nm, liczbowego rozkładu ich wielkości oraz stężenia. Zaletą tej metody jest dokładność pomiaru zarówno dla próbek monodispersyjnych, jak i polidispersyjnych. Nadaje się ona do analizy

zarówno próbek rzeczywistych, mających zdolność do agregacji, jak i próbek, w których obecne są zanieczyszczenia [Filipe i in. 2010].

Do analizy próbek zawierających agregaty nanocząstek przydatna jest metoda zwana statycznym rozpraszaniem światła (ang. static light scattering, SLS) wykorzystywana także do pomiaru bezwzględnej masy cząsteczkowej białek i polimerów [Satinder i Verma 2011; McClements 2007].

Do oznaczania wielkości nanocząstek wykorzystuje się także techniki separacji (rozdziálu) mieszanin zawierających składniki o różnej wielkości (w przypadku nanocząstek o różnym promieniu hydrodynamicznym). Ultrawierowanie analityczne (ang. analytical ultracentrifugation, AUC) umożliwia ponadto oznaczenie rozkładu ich wielkości, gęstości oraz masy poprzez analizę ich właściwości sedymentacyjnych w roztworach po przyłożeniu siły odśrodkowej podczas wirowania [Schuck i in. 2015]. Metodę tę można także zastosować do analizy stabilności nanomateriałów w roztworach. Do tego celu służy np. analizator dyspersji. Jest to wielofunkcyjna wirówka analityczna, nazywana także przyspieszoną analizą stabilności (ang. accelerated stability analysis), pozwalającą na obliczenie rozkładu prędkości w polu wirowania, a także rozkładu wielkości cząstek [Adukwu i in. 2016].

Inne metody należące do tej kategorii to chromatografia wykluczenia (ang. size exclusion chromatography, SEC) oraz frakcjonowanie polowe (ang. field-flow fractionation, FFF) [Krueger i in. 2005, Aspanut i in. 2008, Moreno-Martin i in. 2017]. Obie metody służą do oczyszczania próbek oraz ich frakcjonowania, dzięki czemu uzyskuje się materiały wysoce monodispersyjne.

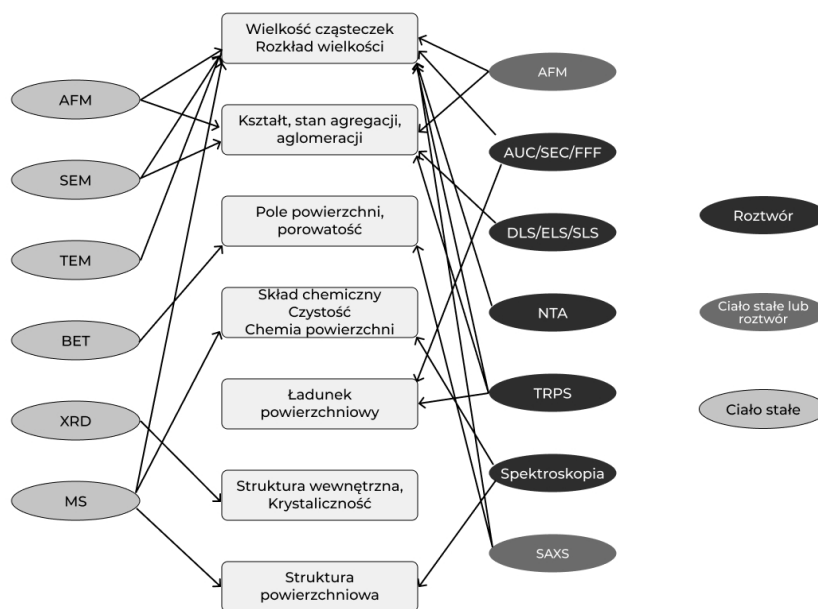
Przestrajalne rezystancyjne wykrywanie impulsów (ang. tunable resistive pulse sensing, TRPS) to technika eksperymentalna wykorzystywana do badania i charakteryzowania cząstek koloidalnych o średnicy od około 50 nm do wielkości komórek. Umożliwia ona oznaczenie ich wielkości, liczbowego rozkładu wielkości, kształtów, a także stężenia w roztworach i potencjału zeta [Willmott 2018].

Substancje stałe, krystaliczne, można analizować z wykorzystaniem metod mikroskopowych takich jak: skaningowy mikroskop elektronowy (ang. scanning electron microscopy, SEM), transmisyjny mikroskop elektronowy (ang. transmission electron microscopy, TEM) i mikroskop sił atomowych (atomic force microscopy, AFM), zjawiska dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego (ang. X-ray diffraction, XRD) oraz metod adsorpcyjno-desorpcyjnych. Te ostatnie służą do badania właściwości nanomateriałów porowatych (polidispersyjnych lub zagregowanych). Za pomocą metody BET (Brunauer Emmet Teller) można określić ich powierzchnię właściwą, objętość oraz rozkład wielkości porów [Sing 1989, Cychosz i Thommes 2018].

Dyfrakcja rentgenowska (XRD) jest jednym z najpotężniejszych narzędzi do pomiaru przestrzennego rozmieszczenia cząsteczek w materiale, wyznaczenia parametrów komórki elementarnej oraz oszacowania wielkości kryształitów. Dostarcza zatem ważnych informacji o ich stanie fizycznym (ciekłym, krystalicznym lub amorficznym) i postaci polimorficznej [Hartel 2013]. Metoda ta jest szczególnie skuteczna, gdy pomiary przeprowadzane są w funkcji temperatury

lub czasu, ponieważ wtedy można uzyskać informacje o naturze i kinetyce przejść fazowych [Bunjes 2011, Relkin i in. 2011, Gupta i Rousseau 2012]. Do oznaczania stopnia krystaliczności próbek można także wykorzystać spektroskopię Ramana [Celedón i Aguilera 2002, Bresson i in. 2011].

Komplementarnym do XRD narzędziem badawczym, ale o znacznie szerszym zastosowaniu (analiza ciał stałych, proszków, kompozytów lub roztworów nanocząstek w ciekłym ośrodku) jest dyfraktografia małokątowa (ang. small-angle X-ray scattering, SAXS), czyli elastyczne rozpraszanie promieni rentgenowskich pod niskimi kątami. Typowe kąty rozpraszania w granicach $0,1 \div 10^\circ$ dają obraz dyfrakcyjny, w którym zawarte są informacje dotyczące kształtu (po modelowaniu), wielkości i odległości makromolekuł o uporządkowaniu blisko zasięgowym (charakterystycznym dla cieczy i ciał amorficznych). Po odpowiednim skalibrowaniu urządzenia można uzyskać informacje o stężeniu cząstek lub porowatości materiału. Technika ta jest często wykorzystywana w przypadku układów, dla których nie można uzyskać kryształów, np. białek o strukturze dynamicznej, złożonych kompleksów multimetrycznych czy niektórych peptydów [Li i in. 2016].



Rys. 5. Podstawowe metody analityczne stosowane w badaniach struktury nanomateriałów z uwzględnieniem stanu skupienia próbki [Modena i in. 2019]

Techniki mikroskopowe, takie jak SEM, TEM i AFM, umożliwiają obrazowanie struktury, dzięki czemu można uzyskać informacje o kształcie, rozmiarach cząstek, rozkładzie wielkości cząstek wraz z określeniem stopnia ich jednorodności, agregacji i aglomeracji oraz struktury krystalicznej [Słowik 2012, Kel-

sall i in. 2008, Datye 2003, Yao i Wang, 2005, Zhou i in. 2012]. Sprzężenie metody DLS z badaniami mikroskopowymi TEM umożliwia uzyskanie kompleksowej wiedzy o badanym nanoobiekcie. Mikroskopy elektronowe można także połączyć z metodami spektroskopowymi, np. SEM z EDX (spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego ang. X-ray energy dispersive spectroscopy), dzięki czemu oprócz danych o geometrii nanocząstek (rozmiar, kształt, rozkład wielkości) można uzyskać informację o ich składzie chemicznym [Patri i in. 2009, Cieślak i in. 2014].

Po scharakteryzowaniu struktury nanomateriału pod kontem właściwości fizycznych (rozmiar, kształt, pole powierzchni, porowatość) i chemicznych (budowa chemiczna, struktura krystaliczna, zanieczyszczenia, obecność dodatkowych grup funkcyjnych na powierzchni cząstek, ładunek powierzchniowy) kolejnym wyzwaniem jest określenie ich parametrów fizyko-chemicznych, istotnych w kontekście ich potencjalnych zastosowań. Z uwagi na dużą skalę produkcji nanomateriałów oraz ich szerokie wykorzystanie niezmiernie ważnym zagadnieniem jest także ocena ich bezpieczeństwa w stosunku do ludzi, zwierząt i środowiska. Pod tym względem ważnymi parametrami są behavior cząstek i ich reaktywności [Zapór 2016].

Termin behavior oznacza rozpuszczalność, hydrofobowość/lipofilowość, dyspersyjność (stopień agregacji lub aglomeracji), pylistość, stabilność w roztworach lub matrycach. Natomiast reaktywność można rozpatrywać w kontekście zjawisk fizycznych takich jak: wybuchowość, palność, zdolność do samozapłonu, fotoreaktywność lub biologicznych takich jak: produkcja wolnych rodników, aktywność katalityczna, uwalnianie jonów. Reaktywność biologiczna określa możliwość oddziaływania bezpośredniego lub pośredniego nanostruktur na komórki wszystkich organizmów żywych. Obecnie stosuje się różne strategie badań zagrożeń związanych z obecnością nanomateriałów w środowisku życia człowieka. Badania toksykologiczne i ekotoksykologiczne polegają na badaniu oddziaływania NMs na organizmy doświadczalne (modelowe mikroorganizmy, zwierzęta i rośliny). Ze względu na czasochłonność tego typu badań, ich wysokie koszty, a także w niektórych przypadkach względy etyczne, poszukuje się alternatywnych rozwiązań w tym zakresie. Jednym z nich mogą być badania *in vitro*, które polegają na ocenie toksycznego działania NMs w stosunku do komórek wyizolowanych z różnych narządów (głównie ssaków). Szczególnie dużą wartość poznawczą mają wyniki badań dotyczące reakcji komórek narządu docelowego działania badanej substancji. Drugim nurtem badań alternatywnych są metody *in silico*, polegające na wykorzystaniu technik modelowania komputerowego umożliwiających wnioskowanie o różnych aspektach toksyczności na podstawie opracowywanych modeli, np. modelowanie zależności struktura-aktywność (QSAR – (Q)uantitative structure-activity relationships, który pozwala na ustalenie związku między budową i właściwościami fizykochemicznymi a działaniem toksycznym substancji chemicznych.

2. Wybrane metody stosowane do oceny reakcji drobnoustrojów na nanocząstki metali

2.1. MIC i MBC jako podstawowe parametry badania oddziaływań nanocząstek na mikroorganizmy

Dane literaturowe potwierdzają, że nanocząstki są skutecznymi środkami przeciwbakteryjnymi. Jednak istniejące rozbieżne wyniki badań nad ich toksycznością dla bakterii wskazują na konieczność kontroli wszystkich warunków przeprowadzania eksperymentu. Aktywność nanocząstek wobec mikroorganizmów, podobnie jak innych substancji o potencjalnie toksycznym charakterze, określa się często poprzez podanie wartości MIC (ang. minimum inhibitory concentration) lub/i MBC (ang. minimum bactericidal concentration). MIC definiowane jest jako najmniejsze stężenie czynnika przeciwdrobnoustrojowego w $\mu\text{g/ml}$ lub mg/l , które hamuje wzrost mikroorganizmów. Zwykle zahamowanie wzrostu bakterii mierzy się po 24 h hodowli. Do określenia MIC nanocząstek stosuje się metodę rozcieńczeń w pożywkach stałych lub płynnych. MBC – to najmniejsze stężenie substancji wyrażane w mg/l lub $\mu\text{g/ml}$, przy którym ginie 99,9% bakterii w warunkach *in vitro*. W doświadczeniach na grzybach stosuje się skrót MFC (ang. minimum fungicidal concentration) zamiast MBC. Wartości tych wskaźników nawet dla tych samych mikroorganizmów i nanocząstek używane przez różnych autorów mogą się znacznie różnić (tabela 4, 5), dlatego też należy ściśle kontrolować i w publikacjach dokładnie opisywać warunki doświadczeń.

Specyficzny mechanizm działania nanocząstek na mikroorganizmy, a zwłaszcza wielokierunkowość ich reakcji w komórce bakteryjnej powoduje, że ocenę skuteczności biobójczej należy przeprowadzać w ściśle kontrolowanych warunkach. Projektując doświadczenie z użyciem nanocząstek metali (MeNPs), należy zwrócić uwagę na kilka czynników, które w badaniach standardowych związków chemicznych nie są uwzględniane. Takim parametrem jest rozmiar i kształt nanocząstek. Skuteczność przeciwbakteryjną antybiotyków mierzy się także za pomocą MIC. W przypadku antybiotyków, które mają cząsteczki o dokładnie określonych rozmiarach, istnieje ścisła zależność między masą a liczbą aktywnych cząsteczek. W przypadku nanocząstek taka zależność nie jest jednoznaczna. Masa nanocząstek może nie stanowić dobrego wskaźnika oceny narażenia na nanocząstki. Stężenie liczbowe nanocząstek, w przeciwieństwie do stężenia masowego, jest w większości przypadków dość wysokie. Jak podaje Bujak-Pietrek, jedna cząsteczka o średnicy $10 \mu\text{m}$ ma taką samą masę jak mi-

liard cząstek o średnicy 10 nm. Ponadto nie masa cząsteczek, ale ich liczba i rozmiar są parametrami, które mają dużo istotniejsze znaczenie dla oddziaływań z żywymi komórkami [Bujak-Pietrek 2010]. Przy tym samym stężeniu zmniejszenie wielkości cząstek zwiększa ich siłę działania przeciwbakteryjnego.

Tabela 4. Toksyczność nanocząstek srebra dla wybranych mikroorganizmów wyrażona jako wartość MIC

Mikroorganizm	AgNPs MIC [mg/ml]	Źródło
<i>E. coli</i>	40	Ruparelia i in. 2008
	7,8	Loo i in. 2018
	0,5	Radzig i in. 2013
	10	Li i in. 2010
	10	Sondi i Salopek-Sondi 2004
	0,07	Wypij i in. 2017
	0,00125	Hossain i in. 2019
	0,23	Tanase i in. 2019
	0,004	Gondil i in. 2019
<i>S. aureus</i>	0,04	Wypij i in. 2017
	0,004	Gondil i in. 2019
	120	Ruparelia i in. 2008
	0,05	Tanase i in. 2019
<i>P.aeruginosa</i>	0,16	Tanase i in. 2019
	8	Radzig i in. 2013
	0,002	Gondil i in. 2019
<i>K. pneumoniae</i>	0,63	Tanase i in. 2019
	0,008	Gondil i in. 2019
	3,9	Loo i in. 2018
<i>B. subtilis</i>	0,040	Wypij i in. 2017
	0,010	Oves i in. 2019
<i>S. Typhimurium</i>	3,9	Loo i in. 2018
<i>S. Enteritidis</i>	3,9	
<i>C. albicans</i>	40	Radhakrishnan i in. 2018

Cechą charakterystyczną nanocząstek jest wysoki współczynnik aktywnej powierzchni do ich wielkości, a zatem zmniejszanie wielkości NPs prowadzi do zwiększenia efektywnej powierzchni. Efektywna powierzchnia nanocząstek jest parametrem fizykochemicznym. Mechanizm działania nanocząstek przeciwko bakteriom opiera się na chemicznych procesach zachodzących na ich powierzchni. Zmiana kształtu cząstek wpływa na ich właściwości biologiczne, w tym na toksyczność dla bakterii – co przedstawiono w tabeli 7. Dlatego też badanie biologicznego działania nanocząstek powinno być powiązane ze znajomością ich parametrów morfologicznych.

Tabela 5. Toksyczność wybranych nanocząstek metali dla wybranych bakterii wyrażona jako wartość MBC

Nanocząstki	Mikroorganizm	MBC [$\mu\text{g/ml}$]	Źródło
AgNPs	<i>S. aureus</i>	625	Parvekar i in. 2020
	<i>P. aeruginosa</i>	2,813–5,625	Liao i in. 2019
	<i>L. monocytogenes</i>	6,25	Zarei i in. 2014
	<i>E. coli</i>	6,25	
	<i>S. Typhimurium</i>	6,25	
<i>V. parahaemolyticus</i>	6,25		
CuNPs	<i>E. coli</i>	60–220	Ruparelia i in. 2008
	<i>S. aureus</i>	160	
	<i>B. subtilis</i>	60	
CuONPs	<i>B. subtilis</i>	40–70	Sharma i in. 2021
	<i>P. fluorescens</i>	40–60	
	<i>S. aureus</i>	25	Fernandez i in. 2008
	<i>E. coli</i>	30	Azam i in. 2012b
	<i>P. aeruginosa</i>	35	
<i>S. aureus</i>	32		
Fe ₂ O ₃ NPs	<i>B. subtilis</i>	45	
	<i>E. coli</i>	160–300	Ruparelia i in. 2008
	<i>S. aureus</i>	40	
<i>B. subtilis</i>	160		
ZnONPs	<i>E. coli</i>	65	Azam i in. 2012a
	<i>P. aeruginosa</i>	120	
	<i>S. aureus</i>	80	
	<i>B. subtilis</i>	78	
	<i>K. pneumoniae</i>	40	Ansari i in. 2017
<i>B. subtilis</i>	40		
ZnONPs	<i>E. coli</i>	18	Azam i in. 2012a
	<i>P. aeruginosa</i>	14	
	<i>S. aureus</i>	16	
	<i>B. subtilis</i>	12	
	<i>E. coli</i>	62,5	Alekish i in. 2018
<i>S. aureus</i>	7,81		

Badania nad działaniem przeciwbakteryjnym nanocząstek prowadzone są przy użyciu różnych metod, takich jak obserwacje komórek za pomocą różnych technik mikroskopowych czy technik hodowlanych (oznaczanie strefy zahamowania wzrostu, oznaczanie liczby jednostek tworzących kolonie (jtk), oznaczanie intensywności wzrostu (gęstość optyczna). Wszystkie te techniki są dobrze opisane w literaturze, jednak porównanie wyników badań wymaga szczegółowej analizy konkretnego protokołu eksperymentalnego, a zwłaszcza uwzględnienia początkowego stężenia bakterii, gatunku i szczepów bakterii, dawki nanocząstek

i czasu ekspozycji. Chcąc dokładnie ocenić skuteczność przeciwdrobnoustrojową nanocząstek, należy kontrolować początkową gęstość komórek. Warto zauważyć, że w wielu testach stosowana jest zawiesina komórek o gęstości od 10^4 do 10^8 jtk/ml. Wyjściowa gęstość zawiesiny komórek bakterii ma duży wpływ na biobójcze efekty nanocząstek. Leung i in., badając toksyczność ZnONPs, zastosowali przy tym samym stężeniu nanocząstek różną gęstość zawiesiny bakterii: 10^6 jtk/ml, 10^7 jtk/ml i 10^8 jtk/ml i zgodnie z oczekiwaniami odnotowali, że zwiększenie gęstości zawiesiny bakterii spowodowało zmniejszenie aktywności przeciwbakteryjnej nanocząstek [Leung i in. 2016]. Skuteczność przeciwbakteryjna nanocząstek zależy zarówno od ich dawki, jak i czasu ekspozycji. Dobierając czas inkubacji z nanocząstkami, warto pamiętać, że wiele gatunków bakterii ma czas generacji trwający 20–40 minut w optymalnych warunkach wzrostu.

Innym czynnikiem, który może wpłynąć na wyniki testów toksyczności nanocząstek, jest zastosowana pożywka. Większość badań nad toksycznością NPs prowadzona jest na pożywkach bogatych w składniki odżywcze takie jak: peptydy, aminokwasy, cukry i sole mineralne. W toksyczności nanocząstek dużą rolę może odgrywać tzw. „protein corona”, warstwa białek (także białek struktur zewnętrznych mikroorganizmów) tworząca się na skutek adsorpcji na powierzchni NPs [Duran i in. 2015]. W przypadku nanocząstek srebra potwierdzono, że w zależności od składu pożywki, obecności i rodzaju płynów ustrojowych, czynników zapobiegających tworzeniu się „protein corona” mogą one wykazywać różną siłę przeciwbakteryjnego działania [Gnanadhas i in. 2013]. Nanocząstki w roztworach ulegają aglomeracji [Kendall i in. 2015]. Składniki pożywki mogą sprzyjać aglomeracji NPs, a zawarte w pożywce białka i peptydy zmniejszać aktywną powierzchnię oddziaływania z mikroorganizmami i tym samym zmniejszać możliwość ich oddziaływania z komórką bakterii. Stabilność nanocząstek i szybkość aglomeracji w określonych pożywkach nie jest zazwyczaj uwzględniana w większości badań. Dlatego też przy porównywaniu wyników należy uwzględniać także warunki hodowli i ekspozycji mikroorganizmów na NPs. Ułatwi to interpretację wyników oraz być może wyeliminuje obserwowane w źródłach literaturowych rozbieżności danych.

2.2. Metody pomiaru *in vitro* aktywności przeciwdrobnoustrojowej nanocząstek

2.2.1. Metoda dyfuzyjno-krażkowa

W wielu publikacjach naukowych prezentowane są wyniki oznaczania stref zahamowania wzrostu mikroorganizmów powstające w odpowiedzi na działanie MeNPs. Metoda dyfuzyjno-krażkowa została zaadoptowana do badań oddziaływań nanocząstek z metodyki mikrobiologii klinicznej, gdzie przy jej użyciu bada się biobójcze działanie antybiotyków i innych leków. Zaleca ją Europejski Komitet Badań Wrażliwości na Antybiotyki (European Committee on Antimicrobial

Susceptibility Testing, EUCAST) oraz Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD). Metoda ta polega na dyfuzji substancja badanej z krążków bibułowych do kultur bakteryjnych [Bauer i in.1966]. W tej metodzie wykorzystuje się pożywkę stałą Mueller-Hintona, na której można hodować wiele bakterii o przeciętnych wymaganiach odżywczych oraz niektóre, bardziej wymagające (*Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp. (CLSI, 2012). Testowane szczepy mikroorganizmów hoduje się w pożywkach płynnych przez co najmniej 24 h. Jednym z warunków poprawnego wykonania oznaczenia jest wystandaryzowanie zawiesiny mikroorganizmów. W tym celu mierzy się gęstość optyczną hodowli bakterii za pomocą spektrofotometru (przy długości fali $\lambda = 550$ nm) i najczęściej rozcieńcza tak, aby uzyskać wartość 0,25, co odpowiada wartości 1 skali Mc Farlanda (3×10^8 jtk/ml dla *E. coli*). Tak przygotowaną zawiesinę wysiewa się wymazówką na zestaloną pożywkę Mueller-Hinton, aby uzyskać jednolity wzrost na powierzchni podłoża i pozostawia na kilkanaście minut. Na szalki nanosi się krążki z bibuły o średnicy ok 5 mm, na których umieszcza się roztwór nanocząstek. Szalki inkubuje się w 37°C przez 48 h. Strefy zahamowania wzrostu wokół krążków bibuły mierzy się w dwu kierunkach. Skuteczność antybakteryjna nanocząstek jest proporcjonalna do wielkości strefy zahamowania wzrostu [Bauer i in. 1966]. Równolegle do oznaczeń biobójczych właściwości nanocząstek wykonuje się kontrole pozytywne i negatywne. W kontroli negatywnej na krążki nanosi się sam rozpuszczalnik, który został wykorzystany do sporządzenia roztworu nanocząstek, zaś jako kontrolę pozytywną stosuje się krążki nasączone antybiotykiem, na który mikroorganizm jest wrażliwy. Metoda ta ma wiele zalet, jest prosta, tania, szybka i daje możliwość porównania reakcji na MeNPs do wykonanej tym samym sposobem wrażliwości na antybiotyki. Metoda ta znalazła wielu zwolenników, o czym świadczą dane zestawione w tabeli 6. Jednak jej stosowanie budzi wątpliwości co do poprawności oceny wyniku. Nanocząstki o średnicy większej niż 10 nm w pożywkach stosowanych w tej metodzie mają współczynnik dyfuzji rzędu 10^{-11} m/s [Kourmouli i in. 2018]. Jest to wartość o co najmniej jeden rząd wielkości niższa w porównaniu z dyfuzyjnością typowych antybiotyków. W konsekwencji nanocząstki przemieszczają się wolniej i ich oddziaływanie fizyczne z komórkami bakteryjnymi jest niższe. Inni autorzy postulują, że metoda dyfuzyjno-krążkowa nie jest odpowiednia do badania antybakteryjnych właściwości nanocząstek [Kourmouli i in. 2018, Pokrowiecki i in. 2013]. W przypadku nanocząstek srebra koloidalnego nie obserwowano stref zahamowania wzrostu mikroorganizmu testowego, ale wygląd pożywki w miejscu bezpośredniego kontaktu z AgNPs uległ zmianie [Pokrowiecki i in. 2013]. Na wynik doświadczenia mógł mieć wpływ rozmiar użytych w tym doświadczeniu nanocząstek o średnicy 67 nm, które trudno dyfundowały. Z kolei w innym eksperymencie wykazano obecność stref zahamowania wzrostu wokół krążków zawierających koloidalne srebro o wielkości cząstek od 10 do 30 nm zastosowane w różnych stężeniach do 35 ppm [Petica i in. 2008]. Wykorzystując jako organizm testowy *E. coli*, zbadano metodą dyfuzyjno-krążkową właściwości bakteriobójcze roztworów AgNPs i AuNPs o tym samym stężeniu (10, 20 i 40 nm) i roz-

miarach nanocząstek [Kourmouli i in. 2018]. Na szalkach z nanocząstkami złota nie stwierdzono w ogóle stref zahamowania wzrostu bakterii, co wskazuje, że nie mają one właściwości antybakteryjnych. Natomiast w przypadku AgNPs obserwowano pojawienie się jednakowej wielkości stref zahamowania wzrostu bez względu na rozmiar nanocząstek. Najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem tego zjawiska jest uwalnianie jonów z nanocząstek, które dyfundują w pożywkę szybciej niż ich prekursorzy. W przeciwieństwie do AuNPs, AgNPs po zawieszeniu w roztworze wodnym ulega utlenieniu i uwalnia jony srebra, które mają silne działanie przeciwbakteryjne [Der-Chi i in. 2008, Kourmouli i in. 2018]. Nanokoloidy z dużą zawartością stabilizatorów nie zawierają form jonowych metali i charakteryzują się gorszą dyfuzją niż roztwory niestabilizowane, zawierające zarówno nanocząstki jak i jony. Metoda dyfuzyjno-krażkowa może w pewnych warunkach wskazywać na szybkość uwalniania jonów z nanocząstek metali i być wykorzystywana do tego typu oznaczeń.

2.2.2. Metody rozcieńczeń

Do ilościowego pomiaru *in vitro* aktywności przeciwdrobnoustrojowej różnych związków stosowane są metody rozcieńczeń pozwalające wyznaczyć wartości MIC – minimalne stężenie hamujące wzrost. Metodę rozcieńczeń można wykonać w pożywkę stałej lub płynnej. Metoda rozcieńczeń w agarze polega na przygotowaniu serii płytek z pożywką zestaloną agarem zawierającą testowany środek przeciwdrobnoustrojowy w znanych malejących stężeniach (zazwyczaj stosuje się podwójne, seryjne rozcieńczenia tj. 1, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{g/ml}$ itd.). Tak przygotowane pożywki szczepi się miejscowo testowanymi mikroorganizmami [López-Carballo i in. 2012]. Jeśli mikroorganizm jest podatny na działanie nanocząstek jego wzrost zostanie zahamowany, a siła tego hamowania będzie się zwiększać wraz ze zwiększającą się dawką środka chemicznego. Najniższe stężenie badanej substancji powodujące zahamowanie wzrostu odpowiada wartości MIC. W praktyce należy przygotować roztwór wyjściowy środka biobójczego o stężeniu np. 1000 $\mu\text{g/ml}$, i stosując technikę dwukrotnych rozcieńczeń przygotować roztwory robocze. 1 ml roztworu roboczego wlewa się na szalki z 9 ml płynnej, przestudzonej pożywki Mueller Hinton, dokładnie miesza i pozostawia do zestalenia. Inokula z hodowli bakterii standaryzuje się poprzez pomiar gęstości optycznej i rozcieńcza tak, aby uzyskać wartość 0,5 skali Mc Farlanda. Następnie rozcieńcza się znormalizowane inokulum 1:10 w roztworze soli fizjologicznej, aby uzyskać gęstość 10^5 jtk/ml. Na płytce przy użyciu automatycznego dyspensera lub ręcznie miejscowo szczepi się np. 10 μl inokulum mikroorganizmów. Płytki inkubuje się przez 24 h i odczytuje wartość MIC przy najniższym stężeniu środka przeciwdrobnoustrojowego, który całkowicie hamuje wzrost. Metoda ma kilka zalet, jest prosta i tania, daje możliwość testowania nawet kilkunastu różnych szczepów jednocześnie i przydatna do testowania nieprzezroczystych materiałów lub o niskim współczynniku dyfuzji.

Metodę rozcieńczeń w pożywkę płynnej wykonuje się analogicznie jak w pożywkę agarowej, z tym że zaszczepione pożywki inkubuje się w probówkach lub

mikroplytkach w optymalnej temperaturze przez określony czas, a zdolność do wzrostu w obecności czynnika biobójczego sprawdza się wizualnie lub poprzez pomiar zmętnienia lub gęstości optycznej. Wartość MIC odczytuje się, biorąc pod uwagę najniższe stężenie MeNPs, przy którym nie stwierdzono wzrostu mikroorganizmu w probówkach lub mikrostudzienkach mikroplytki. Z prób lub mikrostudzienek, które posłużyły do wyznaczenia wartości MIC wykonuje się posiew na podłoża stałe w celu określenia MBC – najmniejszego stężenia substancji wyrażanego w mg/l lub $\mu\text{g/ml}$, przy którym ginie 99,9% bakterii w warunkach *in vitro*. Zazwyczaj wysiewa się 0,1 ml z każdej próby, w której nie zaobserwowano wzrostu oraz z próby kontrolnej, w której nastąpił wzrost, inkubuje 24 h w optymalnej temperaturze wzrostu i następnie liczy wyrosłe kolonie. Często ocenę wartości MIC i MBC wykonuje się z użyciem resazury, związku o niebieskiej barwie, który przenika do komórek. Żywe komórki przekształcają resazurę w rezorufinę o różowym zabarwieniu. Pomiar absorbancji lub ocena wizualna pozwalają na precyzyjną ocenę wzrostu bakterii [Loo i in. 2018]. Metody MIC i MBC są często stosowane do badań przeciwdrobnoustrojowego oddziaływania nanocząstek, pozwalają na ilościowe wyznaczenie efektywnie działających stężeń (tabela 4, 5).

2.2.3. Metoda wyznaczenia krzywej zabijania w czasie

Wyznaczenie krzywej zabijania w czasie (ang. time-kill curve assay) jest przydatną metodą określania działania bakteriobójczego lub grzybobójczego dla różnych substancji [Balouiri i in. 2016]. Test ten przeprowadza się w pożywce bulionowej zawierającej zawiesinę bakterii (5×10^5 CFU/ml). Badaną substancję dodaje się w stężeniu $1 \times \text{MIC}$. Po inkubacji, w różnych odstępach czasu (0, 4, 6, 8, 10, 12 i 24 h) pobiera się próbki w celu oceny przeżywalności bakterii. Wykonuje się posiewy rozcieńczonych zawiesin bakterii na podłoża stałe i oblicza procent martwych komórek w stosunku do kontroli [Balouiri i in. 2016].

2.2.4. Pomiar OD zawiesin komórkowych

Tempo proliferacji komórek w obecności badanych nanocząstek można oszacować, mierząc gęstość optyczną komórek (ang. optical density, OD) w zawiesinie w różnych punktach czasowych. Wzrost bakterii lub grzybów w formie planktonicznej w podłożach płynnych w obecności nanocząstek mierzy się po różnym czasie hodowli za pomocą analizy turbidymetrycznej przy długości fali $\lambda = 600$ nm [Padalia i Chanda 2017, Sardella i in. 2017]. Metoda pomiaru OD jest mało precyzyjna, szczególnie przy niskich gęstościach komórek, ale jej zaletą jest prostota wykonania (nie potrzeba odczytników ani obróbki próbki). Nanocząstki mogą absorbować światło przy tej długości fali, dlatego też należy mierzyć gęstość optyczną (OD) następujących roztworów: kontroli zmętnienia (pożywka + nanocząstki, bez mikroorganizmów), kontroli wzrostu (pożywka + mikroorganizmy) i próby badane (pożywka, nanocząstki, mikroorganizmy) dla każdego ze stężeń nanocząstek. Po obliczeniu różnicy gęstości optycznej roztwo-

rów badanych hodowli z nanocząstkami i kontroli wzrostu, zmniejszenie wartości OD wskazuje na aktywność NPs hamującą wzrost komórek w podłożu. Procent zahamowania intensywności wzrostu można też zmierzyć dla odpowiedniego antybiotyku i porównać do wyników uzyskanych dla nanocząstek.

2.2.5. Cytometria przepływowa

Metoda cytometrii przepływowej jest stosowana do badań nad działaniem przeciwdrobnoustrojowym wielu różnych substancji, także nanocząstek metali. Metoda ta pozwala na szybki pomiar rozproszonego światła lub sygnałów fluorescencji emitowanych przez odpowiednio wybarwione komórki. W sposób zautomatyzowany można analizować stan pojedynczych komórek, w krótkim czasie pod kontem różnych parametrów budowy i aktywności metabolicznej [Olszewska i in. 2016]. Mikroorganizmy poddaje się inkubacji z MeNPs, stosując odpowiednio długi czas inkubacji tak, aby można było obserwować efekty zabicia komórek, następnie odwirowuje, odpowiednio rozcieńcza i wybarwia barwnikiem/barwnikami fluorescencyjnymi służącymi do oceny żywotności komórek. Zawiesinę wprowadza się do cytometru, gdzie znakowane komórki formowane są w cienki strumień, który przesuwany jest w stronę strefy pomiaru. Przepływające komórki naświetlane są zogniskowaną wiązką laserową, która wzbudza barwniki fluorescencyjne związane ze strukturami komórkowymi i jednocześnie komórki rozpraszają światło. Parametry natężenia i rozproszenia światła, intensywności fluorescencji mierzone są za pomocą odpowiednich detektorów. Powstałe sygnały elektryczne są podstawą do analizy danych, które najczęściej przedstawia się jako histogramy informujące o częstości występowania danej cechy w badanej zawieszynie komórek albo jako wykresy, gdzie każdy zaznaczony punkt reprezentuje pojedynczą komórkę [Skotny i Pucińska 2013, Olszewska i in. 2016]. Spośród wielu barwników fluorescencyjnych stosowanych do oceny żywotności komórek bakterii stosowany jest zestaw live/dead BacLight kit (Molecular Probes, Carlsbad, CA) zawierający dwa składniki SYTO®9 i jodek propidyny pozwalające różnicować komórki żywe i martwe na podstawie integralności błony cytoplazmatycznej. Barwnik SYTO®9 o małej masie cząsteczkowej przenika do wnętrza komórki przez integralną błonę cytoplazmatyczną i fluoreskuje na zielono. Jodek propidyny jest barwnikiem o dużej masie cząsteczkowej i przenika do komórek z uszkodzoną błoną cytoplazmatyczną [Neumeyer i in. 2011]. Metoda cytometrii przepływowej została uznana za jedną z najlepszych metod pomiaru aktywności przeciwdrobnoustrojowej nanocząstek ze względu na wysokowydajne, szybkie i wymierne wyniki [Bankier i in. 2018], jednak ze względu na konieczność użycia specjalistycznego urządzenia w publikacjach stosunkowo rzadko podawane są wyniki uzyskane w ten sposób.

2.2.6. Metoda viability-qPCR

Metoda ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (qPCR) jest już obecnie wykorzystywana do oceny skuteczności związków przeciwdrobnoustrojowych

Tabela 6. Przykłady metod oznaczania właściwości przeciwdrobnoustrojowych nanocząstek metali

Metoda oznaczania właściwości przeciwdrobnoustrojowych	Badane nanocząstki metali	Badane mikroorganizmy	Źródło
Metoda rozcieńczeń w pożywce płynnej	AgNPs	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i>	Agnihotri i in. 2014
	AgNPs, CuNPs	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Ruparelia i in. 2008
	Al ₂ O ₃ NPs Fe ₂ O ₃ NPs, CeO ₂ NPs, MgONPs	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp. <i>E. coli</i> <i>P. morgani</i> <i>S. aureus</i>	Ravikumar i in. 2012
	AgNPs CuNPs	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	Bankier i in. 2018
	AgNPs	<i>E. coli</i> MC1061 (<i>pSLlux</i>)19 <i>P. aeruginosa</i> DS10-129 (<i>pDNcadlux</i>)	Bondarenko i in. 2018
Metoda rozcieńczeń w agarze	AgNPs	<i>E. coli</i>	Pal i in. 2007
	ZnONPs	<i>E. coli</i>	Brayner i in. 2006
Metoda dyfuzyjno-krążkowa	CuNPs, AgNPs	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Ruparelia i in.2008
	CuNPs	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Majumdar i in. 2019
	CdONPs	<i>S. aureus</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>	Abd i in. 2016
	ZnONPs	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	Banoee i in. 2005
Test wyznaczania krzywej zabijania w czasie	Al ₂ O ₃ NPs	<i>E. coli</i>	Ravikumar i in. 2012
	CuONPs	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>E. coli</i>	Ren i in. 2009
	AgNPs	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>S. Enteritidis</i>	Loo i in. 2018
Cytometria przepływowa	ZnONPs	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Reddy i in. 2007
	AgNPs CuNPs	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	Bankier i in. 2018
qPCR viability	AgNPs CuNPs	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	Bankier i in. 2018

ze względu na zmniejszające się koszty i szybkie uzyskiwanie wyników, gdyż nie wymaga hodowli bakterii w celu uzyskania kolonii. Dzięki qPCR można wykryć i określić ilościowo zawartość materiału genomowego obecnego w próbce. W celu rozróżnienia między żywymi i martwymi komórkami można zastosować test żywotności qPCR-PMA [Bankier i in. 2018]. Obejmuje on inkubację próbek z barwnikiem wiążącym DNA, takim jak monoazydek propidyny (PMA), który wiąże się z wolnym DNA (barwnik przenika do martwych komórek z uszkodzonymi błonami), co zakłóca amplifikację PCR. Podczas qPCR amplifikowany jest DNA tylko żywych komórek. PMA blokuje amplifikację wolnego DNA, czyli pochodzącego z martwych komórek. Mikroorganizmy poddaje się działaniu różnych stężeń nanocząstek przez określony czas (24 h). Miarą lizy komórek jest wyznaczenie ΔCT w dwu wariantach oznaczenia qPCR i qPCR-PMA. ΔCT oblicza się, odejmując średnie wartości CT (cykl progowy, ang. threshold cycle) w próbach po działaniu nanocząstkami od średnich wartości kontrolnych. Wartości ΔCT poniżej 0 wskazują na spadek amplifikacji (mniej DNA, martwe komórki), a wartości ΔCT powyżej 0 wskazują na wzrost amplifikacji (więcej DNA, żywe komórki). Oznaczając właściwości przeciwdrobnoustrojowe nanocząstek, otrzymuje się zazwyczaj dodatnie wartości ΔCT przy najniższych subletalnych stężeniach, zaś ujemne wartości, gdy bakterie były narażone na wyższe stężenia, co wskazuje na wyższy wskaźnik martwych komórek w populacji. Metoda ta nie daje jednak tak dokładnych wyników jak cytometria przepływowa czy metody rozcieńczeń i liczenia kolonii [Bankier i in. 2018]. Uważa się, że nanocząstki mogą zakłócać amplifikację qPCR, ponieważ wiążą się z DNA [Li i in. 2013]. PMA działa również poprzez wiązanie się z wolnym DNA w próbce, w tym w komórkach z uszkodzoną błoną. Oddziaływanie zarówno nanocząstek, jak i PMA z DNA może prowadzić do niespójnych wyników. Dane zawarte w tabeli 6 podsumowują informacje dotyczące najczęściej stosowanych metod wykorzystywanych w ocenie toksyczności nanocząstek metali względem bakterii.

2.3. Badanie przeciwgrzybowego działania nanocząstek

Skuteczna ocena aktywności przeciwgrzybowych MeNPs jest zdecydowanie trudniejsza niż ocena ich właściwości bakteriobójczych, co wynika z tego że, grzyby (z wyjątkiem jednokomórkowych, wolno żyjących drożdży) tworzą grzybnię lub pseudogrzybnię. W tym przypadku nie można stosować metody bezpośredniego liczenia komórek grzybów. Dodatkowo grzyby wytwarzają zarodniki, w hodowli następuje więc duży przyrost jednostek propagacyjnych, przy czym biomasa nie ulega znaczącym wahaniom [Sardella i in. 2018].

Najbardziej powszechną techniką stosowaną do ilościowej oceny przeciwgrzybowego działania nanocząstek jest pomiar średnicy kolonii grzybów w hodowli na podłożu stałym. Czynniki przeciwgrzybowe o określonym stężeniu końcowym (w tym wypadku nanocząstki metali lub ich pochodne) są dodawane

do upłynnionej pożywki stałej. Po zestaleniu na szalce Petriego podłoże szczepi się centralnie zawieszoną zarodników lub krążkiem grzybni o średnicy 6 mm. Po inkubacji mierzy się średnicę kolonii i oblicza procentowe zmniejszenie średnicy (lub powierzchni kolonii) w stosunku do kontroli. Można też analizować szybkość zmian średnicy/promienia kolonii w czasie. Chociaż ta metoda jest łatwa do wykonania i daje powtarzalne wyniki, to jednak średnica kolonii ma słabą korelację z biomasą grzybów, ponieważ wynik nie jest powiązany z grubością ani gęstością kolonii i nie uwzględnia przestrzennego wzrostu grzybni [Sardella i in. 2018].

Metoda turbidymetryczna znalazła zastosowanie do oceny nierównomiernie rosnących grzybów strzępkowych, ale wymaga dostosowania niektórych parametrów doświadczenia, a mianowicie ilości inokulum, składu podłoża i stężenia agaru [Medina i in. 2012]. Doświadczenie można przeprowadzić przy użyciu mikroplacytek Bioscreen, należy jednak zastosować pożywkę z małą zawartością agaru, co zapobiegania osadzaniu się grzybni na dnie mikrostudzienek [Medina i in. 2012]. Metodę tę zastosowano w doświadczeniu mającym na celu ocenę skuteczności przeciwgrzybowej nanocząstek tlenku cynku wobec *A. alternata*, *R. stolonifer* i *B. cinerea*. Przy stężeniu 15 mM ZnONPs *R. stolonifer* charakteryzował się największą wrażliwością [Sardella i in. 2017]. Inną techniką pomocną w badaniach wrażliwości grzybów na nanocząstki może być ocena tempa kiełkowania zarodników z użyciem mikroskopu. Preparat mikroskopowy zawierający podłoże agarowe z nanocząstkami metali zaszczerpione zarodnikami umieszcza się pomiędzy szkiełkami: podstawowym i nakrywkowym i fotografuje w określonym czasie. Analiza zdjęć pozwala na obliczenie procentowej liczby wykiełkowanych zarodników i badania kinetyki kiełkowania [Roufou i in. 2017]. Tę metodę wykorzystano do oceny zdolności adaptacyjnej *P. expansum* do wzrostu w obecności ZnONPs. Tego typu badania mogą dostarczyć informacji o początkowej fazie rozwoju grzybów w obecności nanocząstek metali.

3. Mechanizmy antybakteryjnego działania nanocząstek metali

Metaliczne nanocząstki wpływają plejotropowo na komórki bakteryjne. Oddziaływania tego typu stały się przedmiotem badań wielu zespołów naukowców [Azam i in. 2012a, Balouiri i in. 2016, Bankier i in. 2018, Kumar i in. 2011a, Radzig i in. 2013, Singh i in. 2019]. Mechanizmy odpowiedzialne za aktywność biobójczą nanocząstek metali nadal nie są do końca poznane, ale uważa się, że w odpowiedzi na MeNPs pośredniczą liczne zjawiska i procesy komórkowe. W badaniach naukowych najczęściej wskazuje się na następujące mechanizmy:

- nanocząstki gromadzą się i rozpuszczają w strukturach powierzchniowych komórek mikroorganizmów, co prowadzi do zmian w przepuszczalności błony cytoplazmatycznej i lizy komórek;

- nanocząstki uwalniają jony metali, które są pobierane (translokacja i internalizacja) przez komórki, co powoduje zaburzenia metabolizmu;

- nanocząstki i jony metali wytwarzają reaktywne formy tlenu, RFT (ang. reactive oxygen species, ROS), powodując uszkodzenie struktur komórkowych.

Wpływ nanomateriałów na komórki bakterii należy rozpatrywać na poziomie molekularnym, gdyż to pozwoli zrozumieć wzajemne interakcje i skuteczniej zwalczać szkodliwe bakterie lub ograniczać ich negatywny wpływ na pożyteczną mikrobiotę. Wiedza ta może ułatwić projektowanie leków i środków dezynfekcyjnych zawierających nanocząstki metali, regulujących populacje drobnoustrojów oraz może być przydatna do oceny potencjalnych skutków uwalniania wytworzonych nanomateriałów do środowiska.

3.1. Oddziaływanie nanocząstek metali ze strukturami powierzchniowymi mikroorganizmów

3.1.1. Wielkość i kształt nanocząstek jako czynnik wpływający na toksyczność w stosunku do mikroorganizmów

Pierwszym warunkiem oddziaływania NPs z drobnoustrojami jest ich bezpośredni kontakt z komórkami. Nanocząstki metali mogą być przyciągane elektrostatycznie przez cząsteczki wchodzące w skład struktur powierzchniowych mi-

kroorganizmów, mogą wiązać się z nimi za pomocą słabych wiązań chemicznych, głównie wiązań hydrofobowych, sił van der Waalsa lub oddziaływań typu receptor – ligand [Nair i in. 2009].

Rozmiar nanocząstek wpływa na ich właściwości fizyczne i chemiczne, a zwłaszcza na stosunek ich powierzchni do objętości. Ten parametr zwiększa swoją wartość, gdy zmniejsza się wielkość NPs, co przekłada się na nasilenie interakcji z różnymi składnikami komórek bakterii i odgrywa kluczową rolę w aktywności przeciwdrobnoustrojowej [Azam i in. 2012a]. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe i cytotoksyczne nanocząstek, jak udowodniono w wielu eksperymentach, zależą od wielkości ich cząstek [Jeong i in. 2014, Raghupathi i in. 2011] (tabela 7). Mirzajani i in. [2011] stwierdzili, że wraz ze zmniejszeniem rozmiaru nanocząstek zwiększa się ich aktywność bakteriobójcza względem *S. aureus*. Agnihotri i in. [2014] zsyntetyzowali AgNPs o zróżnicowanych rozmiarach 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 63, 85 i 100 nm, i potwierdzili, że ich działanie przeciwbakteryjne przy tej samej dawce zależało od wielkości ich cząstek. Najsilniejsze działanie bakteriobójcze miały nanocząstki o rozmiarach 5, 7 i 10 nm [Agnihotri i in. 2014]. W innym doświadczeniu zbadano właściwości przeciwdrobnoustrojowe i cytotoksyczne preparatów AgNPs o różnej wielkości cząstek [Jeong i in. 2014]. AgNPs o średnicy 10 nm wykazywały silniejsze działanie cytotoksyczne i przeciwdrobnoustrojowe w porównaniu z cząstkami o wielkości 100 nm zastosowanymi w tym samym stężeniu. Z kolei Bera i in. [2014] stwierdzili zależną od wielkości i kształtu aktywność przeciwbakteryjną AgNPs o wielkości cząstek od 1 do 5 nm w stosunku do bakterii Gram-dodatnich (*S. epidermidis* i *B. megaterium*) oraz Gram-ujemnych (*P. aeruginosa*). Podkreślali, że rozmiar cząstek decydował o aktywności przeciwbakteryjnej. Według tych autorów, mniejsze cząstki łatwo przenikały przez ścianę komórkową i miały zwiększoną aktywność przeciwdrobnoustrojową. Zbadano też aktywność nanocząstek ZnONPs o różnej wielkości: 12 nm, 45 nm i 2 μ m względem *E. coli*. Także w tym przypadku największą skutecznością bakteriobójczą wykazywały cząstki o najmniejszej średnicy [Padmavathy i Vijayaraghavan 2008]. Podobnie Hosseinkhani i in. [2011] stwierdzili, że oprócz stężenia, także wielkość cząstek ZnONPs decyduje o zmniejszeniu liczby żywych bakterii *S. dysenteriae*. Potwierdzono też zależną od wielkości aktywność przeciwbakteryjną CuONPs względem *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* i *E. coli*. Spośród nanocząstek o różnych rozmiarach, najmniejsze o wymiarach 20 nm miały najsilniejsze działanie hamujące wzrost wymienionych bakterii [Azam i in. 2012b]. Nanocząstki miedzi o kulistym kształcie i wielkości od 5 do 15 nm zsyntetyzowane przy użyciu wodnego ekstraktu z liści *Datura innoxia* skutecznie hamowały wzrost *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, mikroorganizmu wywołującego bakteryjną zarazę liści ryżu [Kala i in. 2016]. ZnONPs o średnicy 8 nm mogą hamować wzrost *S. aureus*, *E. coli* i *B. subtilis*. Cząstki ZnONPs o rozmiarze większym niż 100 nm działały jedynie jako czynnik bakteriostatyczny, zaś te o rozmiarach 12 nm skutecznie zabijały *S. aureus* RN 6390 [Raghupathi i in. 2011]. W innym doświadczeniu zsyntetyzowano trzy różne rodzaje nanocząstek: ZnONPs o rozmiarze 18 nm, CuONPs – 22 nm, a Fe₂O₃NPs – 28 nm [Azam i in.

2012b]. Ich bakteriobójczy potencjał oceniono w stosunku do bakterii Gram-dodatnich (*B. subtilis* i *S. aureus*) i Gram-ujemnych (*P. aeruginosa* i *E. coli*). Spośród badanych nanocząstek, te o najmniejszym rozmiarze (ZnONPs, 18 nm) miały najwyższą aktywność bakteriobójczą, natomiast nanocząstki o największej średnicy (Fe₂O₃NPs, 28 nm) wykazywały najsłabszą aktywność bakteriobójczą. Niektóre badania sugerują, że wielkość nanocząstek jest jednym z głównych czynników wpływających na ich działanie przeciwdrobnoustrojowe, chociaż może to również zależeć od sposobu ich syntezy, zastosowanych prekursorów i warunków doświadczenia [Azam i in. 2012b].

Tabela 7. Kształt i wielkość nanocząstek srebra a ich właściwości przeciwbakteryjne względem różnych szczepów *E. coli*

Szczep	Kształt nanocząstek srebra	Wielkość nanocząstek [nm]	Czas ekspozycji	Parametry aktywności biobójczej	Źródło
<i>E. coli</i>	sferyczne	9	24 h	IC ₅₀ = 6,4 µg Ag ⁺ /mL	Ivask i in. 2014
		19	24 h	IC ₅₀ = 15,7 µg Ag ⁺ /mL	
		43	24 h	IC ₅₀ = 40,9 µg Ag ⁺ /mL	
<i>E. coli</i> K12 ATCC 25404	sferyczne	39	8 h	MIC = 50 µg/ml	Pal i in. 2007
	trójkątne	40	8 h	MIC = 2,5 µg/ml	
<i>E. coli</i>	sferyczne	38,5	24 h	0,7 mg/ml OD = 3,5	Cheon i in. 2019
	dyski	50,6	24 h	0,7 mg/ml OD = 4	
	trójkątne	51,1	24 h	0,7 mg/ml OD = 3	
<i>E. coli</i>	sferyczne	195	24 h	1 mg/ml OD = 2 CFU = 100 × 10 ⁵	Alshareef i in. 2017
	skrócony oktaed	194	24 h	1 mg/ml OD = 0,05 CFU = brak wzrostu	

Na aktywność przeciwdrobnoustrojową nanocząstek, oprócz wielkości, wpływa także ich kształt. W tabeli 7 zebrano dane dotyczące tej zależności. Pal i in. [2007] opisali aktywność przeciwbakteryjną nanocząstek srebra o trzech formach: kulistej, pręcikowej i ściętych trójkątów. Najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazywały nanocząstki o kształcie ściętych trójkątów, gdyż były one najbardziej reaktywne ze względu na większą powierzchnię, o dużej gęstości atomowej. Z kolei Raza i in. [2016] wskazali na kuliste nanocząstki AgNPs jako bardziej aktywne biologicznie. Kuliste (sferyczne) nanocząstki srebra o średnicy od 15 do 90 nm wykazywały większą aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do bakterii Gram-ujemnych niż trójkątne nanocząstki o podobnych rozmiarach.

Morfologia nanocząstek ZnONPs odgrywa również ważną rolę w ich aktywności przeciwbakteryjnej (tabela 8). Stankovic i in. [2013] badali wpływ wielko-

ści nanocząstek ZnO syntetyzowanych hydrotermalnie przy użyciu różnych stabilizatorów powierzchni. Cząstki ZnONPs o średnicy około 30 nm miały najwyższą aktywność przeciwbakteryjną. Autorzy zgłębili także wpływ geometrii powierzchni nanocząstek na ich właściwości antibakteryjne. Nanocząstki rzadko mają regularną morfologię np.: sferyczną, częściej występują w formie płatków, igieł, kryształów. Jedną z metod wyznaczania powierzchni cząstek jest BET – metoda adsorpcyjna polegająca na wyznaczeniu izotermy adsorpcji azotu i wyliczeniu pojemności monowarstwy za pomocą odpowiedniego równania izotermy adsorpcji. Tak wyliczoną powierzchnię definiuje się jako SSA (ang. specific surface area). Zaobserwowano, że ten parametr może mieć znaczenie przy określaniu właściwości przeciwdrobnoustrojowych nanocząstek. W przypadku *E. coli* stwierdzono, że proszki ZnONPs o 21,7 SSA i 25,7 SSA wykazywały najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową, podczas gdy te o niższej wartości tego parametru (9,8 SSA i produkt komercyjny – 4,5 SSA) miały mniejszą zdolność do zabijania tych bakterii. W przypadku *S. aureus* wpływ kształtu nanocząstek nie był tak wyraźny, ale komercyjne ZnONPs o najniższej wartości SSA wykazywały najniższą zdolność biobójczą [Stankovic i in. 2013].

Tabela 8. Wpływ rozmiaru nanocząstek metali na ich właściwości grzybobójcze i bakteriobójcze

Rodzaj nanocząstek	Rozmiar	Mikroorganizm, oznaczany parametr aktywności biobójczej		Źródło
CoFe ₂ O ₄ NPs		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida albicans</i>	Žalneravičius i in. 2016
	15 nm	24 mm ZI	13 mm ZI	
	5 nm	24 mm ZI	14 mm ZI	
	<2 nm	24 mm ZI	16 mm ZI	
CuNPs		<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>		Iajumdar i in. 2019
	18 nm	1,7 MIC; 5 MBC ₅₀		
	24 nm	1,6 MIC; 4,5 MBC ₅₀		
	28 nm	1,5 MIC; 3,5 MBC ₅₀		
	33 nm	2,4 MIC; 6,5 MBC ₅₀		
AgNPs	10 nm	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Ignihotri i in. 2014
	20 nm	30 MIC	80 MIC	
	50 nm	40 MIC	90 MIC	
	100 nm	80 MIC	130 MIC	
		110 MIC	200 MIC	
ZnONPs		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
	75 ± 20 nm	100% zabicia przy stężeniu >0,8 µg·ml ⁻¹		Wang i in. 2012
	70 ± 15 nm	100% zabicia przy stężeniu 12 mM·L ⁻¹		Liu i in. 2008
	30 nm	88% zabicia przy stężeniu 1%		Arefi i in. 2012
		<i>E. coli</i>		Padmavathy i Vijayaraghavan 2008
	12 nm	31 mm ZI		
45 nm	27 mm ZI			
	2 µm	22 mm ZI		

ZI – wielkość strefy zahamowania wzrostu [mm], MIC [mikrogram/ml], MBC [mikrogram/ml]

Badania nad toksycznym działaniem nanocząstek metali w stosunku do grzybów koncentrują się głównie na modelowych organizmach takich jak drożdże *S. cerevisiae*, dermatofitach ludzi i zwierząt, a także na grzybach patogennych dla roślin. Podobnie jak w przypadku bakterii ich końcowy efekt oddziaływania zależy od wielu czynników takich jak: gatunek grzyba, zastosowane stężenie nanocząstek, wielkość nanocząstek czy warunki wzrostu grzyba (tabela 8). Wiele danych wskazuje, że mechanizmy toksyczności nanocząstek opisywane u bakterii występują też u grzybów. Oddziaływanie ze ścianą i błoną cytoplazmatyczną, zaburzenia metabolizmu, zmiany ekspresji genów, stres oksydacyjny to często opisywane objawy toksycznego działania nanocząstek na grzyby. Według García-Saucedo i in. [2011] nanomateriały, takie jak: CeO₂NPs, Al₂O₃NPs i HfO₂NPs i SiO₂NPs wykazują niską toksyczność lub jej zupełny brak w stosunku do drożdży *S. cerevisiae*. Toksyczność oceniano za pomocą pomiarów zużycia tlenu w hodowlach okresowych oraz analiz integralności błony cytoplazmatycznej. Nanocząstki CeO₂NPs, Al₂O₃NPs i HfO₂NPs były niestabilne w pożywce stosowanej do hodowli drożdży i tworzyły osadzające się aglomeraty o rozmiarach mikrometrycznych. W tych warunkach nie hamowały one pobierania tlenu przez drożdże (nawet w stężeniu tak wysokim jak 1000 mg/l). Zastosowano więc nietoksyczny dyspergator poliakrylanowy (Dispex A40), aby poprawić ich stabilność. Dodatek dyspergatora zwiększył toksyczność tylko nanocząstek tlenku ceru. Zdyspergowane nanocząstki tlenku glinu i tlenku krzemu (w stężeniu 1000 mg/l) powodowały uszkodzenie błony cytoplazmatycznej. Tego efektu nie odnotowano jednak dla nanocząstek ceru [García-Saucedo i in. 2011]. W podobnym doświadczeniu, badając toksyczność nanocząstek: TiO₂NPs, ZrO₂NPs, FeNPs, Fe₂O₃NPs i Mn₂O₃NPs wobec drożdży *S. cerevisiae*, stwierdzono, że jedynie nanocząstki Mn₂O₃NP znacząco hamowały zużycie tlenu przez komórki drożdży i powodowały uszkodzenie błony cytoplazmatycznej. Pozostałe nanocząstki nie były toksyczne nawet w stężeniu 1000 mg/l lub tak jak FeNPs nieznacznie wpływały na badane parametry [Otero-Gonzalez i in. 2013].

Wyniki innych badań wskazują, że nanocząstki metali skutecznie ograniczają wzrost lub zabijają komórki grzybów, aczkolwiek efekt ten jest często uzależniony od warunków doświadczenia (tabela 9). Kim i in. [2012] badali działanie przeciwgrzybowe AgNPs przeciwko różnym grzybom wywołującym choroby roślin, które hodowano na agarze ziemniaczano-dekstrozowym (PDA), agarze z ekstraktem słodowym i agarze z mąki kukurydzianej. Największe hamowanie wzrostu grzybów patogennych dla roślin zaobserwowano na pożywce PDA. Roztwór AgNPs o stężeniu 100 ppm hamował w 100% wzrost *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Corynespora cassiicola*, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Glomerella cingulata*, *Monosporascus cannonballus*, *Pythium aphanidermatum* i *Pythium spinosum* oraz w około 90% wzrost *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria solani*, *Didymella bryoniae*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* i *Stemphylium lycopersici*. Ghasemiana i in. [2012] badali przeciwgrzybowe działanie CuNPs o średniej wielkości cząstek 8 nm metodą rozcieńczeń w agarze. W tym przypadku efekt grzybobójczy

był uzaleny od gatunku mikroorganizmu (tabela 9). Nanocząstki miedzi (CuNPs) zsyntetyzowane przy użyciu bromku cetylotrimetyloamoniowego wykazywały działanie przeciwgrzybowe w stosunku do grzybów chorobotwórczych dla roślin uprawnych. Silne hamujące działanie tych nanocząstek stwierdzono dla *Fusarium equiseti* (strefa zahamowania wzrostu wynosiła 25 mm), *F. oxysporum* (20 mm) i *Fusarium culmorum* (19 mm) [Bramhanwade i in. 2016]. Nanocząstki tlenku magnezu (MgONPs), zsyntetyzowane metodą biologiczną z wykorzystaniem ekstraktu z brunatnic morskich *Sargassum wightii* okazały się skuteczne w zwalczaniu grzybowych patogenów człowieka. W porównaniu z lekiem przeciwgrzybiczym flukonazolem (który stanowił kontrolę pozytywną w tym doświadczeniu) nanocząstki silnie hamowały wzrost *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* i *F. solani*, przy czym, wśród nich *A. fumigatus* był najmniej podatny na ich działanie [Pugazhendhi 2019]. Nanocząstki tlenku żelaza ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$) również wykazywały zdolność do hamowania wzrostu grzybów strzępkowych: *A. niger* i *Mucor piriformis*, przy czym silniejsze działanie przeciwgrzybowe odnotowano dla *M. piriformis* [Devi i in. 2019]. Rajiv i in. testowali wpływ ZnONPs na kilka gatunków grzybów strzępkowych: *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *F. culmorum* i *F. oxysporum*. Najbardziej wrażliwymi na te nanocząstki okazały się *A. niger* i *A. flavus* [Rajiv i in. 2013].

Kształt i rozmiar nanocząstek, podobnie jak w przypadku bakterii, wpływa na siłę oddziaływań biobójczych i biostatycznych wobec grzybów. Biosyntetyzowane, sferyczne AgNPs o średnicy od 5 do 30 nm wykazywały znaczną aktywność przeciwgrzybową wobec białej pleśni (*Sclerotinia sclerotiorum*) i szarej pleśni (*B. cinerea*), przy czym w teście *in vitro* najbardziej efektywnym stężeniem było – 150 ppm AgNPs [Elgorban i in. 2016]. Sferyczne nanocząstki AgNPs o średniej wielkości cząstek 30–90 nm zastosowane w stężeniu 2 mM hamowały wzrost *Colletotrichum coccodes* (w 87%), *Monilinia* sp. (w 86%) i *Pyricularia* sp. (w 84%) [Lee i in. 2013]. Biosyntetyzowane przy użyciu wodnego wyciągu z *Artemisia absinthium* AgNPs, zastosowane w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ hamowały wzrost grzybni *Phytophthora parasitica*, *P. infestans*, *P. pabnivora*, *P. cinnamomi*, *P. tropicalis*, *P. capsici* i *P. katsurae* w warunkach *in vitro*. Bardzo skutecznie ograniczały też wzrost *P. parasitica* i *P. capsici*. W zakresie stężeń 2,1–8,3 $\mu\text{g/ml}$ całkowicie hamowały (w 100%) wzrost grzybni, kiełkowanie zoospor, wydłużanie strzępek kiełkowych i wytwarzanie zarodników [Ali i in. 2015].

Nanocząstki Cu-CSNPs o wielkości od 180,0 do 487,9 nm i potencjale zeta +88 mV zastosowane w stężeniu 0,1% spowodowały wyraźne zahamowanie wzrostu fitopatogennych grzybów *A. alternata* (w 89,5%), *Macrophomina phaseolina* (w 63,0%) i *R. solani* (w 60,1%) w testach *in vitro*, a także powodowały hamowanie kiełkowania zarodników *A. alternata* (w 87,4%). Skuteczność przeciwgrzybowa nanocząstek Cu-CSNPs związana jest z gęstością ładunku powierzchniowego. Wysoka wartość potencjału zeta +88 mV zapewnia im większe powinowactwo do ujemnie naładowanej błony grzybów [Saharan i in. 2013].

Podobne efekty powodowały nanocząstki srebra zastosowane w stężeniu do 2,5 ppm w stosunku do grzybni *F. culmorum*. W tym przypadku obserwowano

hamownie wzrostu grzybnii tego grzyba. Test sporulacyjny wykazał jednak, że w porównaniu z próbkami kontrolnymi liczba zarodników tworzonych przez grzybnię w hodowli wzrosła po kontakcie z nanocząstkami srebra, zwłaszcza na ubogiej w składniki odżywcze pożywce PDA. Z kolei 24-godzinna inkubacja zarodników tego grzyba z roztworem AgNPs o stężeniu 2,5 ppm hamowała kiełkowanie zarodników i długość strzępek kiełkowych w porównaniu z kontrolą [Kasproicz i in. 2010]. AgNPs wywierały szkodliwy wpływ nie tylko na strzępki grzybów, ale także na kiełkowanie konidiów grzyba ambrozji *Raffaelea* sp. odpowiedzialnego za chorobę dębów w Korei [Kim i in. 2009]. Zastosowanie AgNPs w stężeniu 100 ppm skutecznie hamowało wzrost strzępek i kiełkowanie konidiów grzybów z gatunków *Colletotrichum* w testach *in vitro* [Lamsal i in. 2011].

Tabela 9. Toksyczność nanocząstek metali dla wybranych grzybów

Nanocząstki	Grzyby	MIC	Źródło
AgNPs	<i>A. flavus</i> KA 30	45 ppm	Pietrzak i in. 2015
	<i>A. niger</i> DMS 12634	45 ppm	
	<i>A. niger</i> ATCC 16404	22,5 ppm	
	<i>A. westerdijkiae</i> NRRL 3174	45 ppm	
	<i>P. chrysogenum</i> ŁOCK 053	45 ppm	
	<i>C. albicans</i>	2 µg/ml,	Kim i in. 2008b
	<i>C. albicans</i> <i>C. parasitosis</i>	78–150 µg/mL	Dallas i in. 2010
	<i>C. albicans</i>	125–250 µg/mL	Egger i in. 2009
CuNPs	<i>C. albicans</i>	6 µg/mL	Gutierrez i in. 2010
	<i>P. chrysogenum</i>	40 mg/l	Ghasemiana i in. 2012
	<i>A. alternata</i>	60 mg/l	
	<i>F. solani</i>	60 mg/l	
<i>A. flavus</i>	≤ 80 mg/l		
CuONPs	<i>C. albicans</i>	400 µg/ml	Karimiyan i in. 2015
ZnONPs	<i>C. albicans</i>	200 µg/ml	Karimiyan i in. 2015
	<i>A. alternata</i>	64 µg/ml	Jamdagni i in. 2018
	<i>A. niger</i>	16 µg/ml	
	<i>B. cinerea</i>	128 µg/ml	
	<i>F. oxysporum</i>	64 µg/ml	
	<i>P. expansum</i>	128 µg/ml	
<i>A. niger</i>	25 µg/ml	Singh i Nanda 2013	
<i>C. albicans</i>	12,5 µg/ml		

3.1.2. Komórki bakterii – interakcje nanocząstek zależne od budowy ściany komórkowej

Ściany komórek bakteryjnych, zwane w przypadku bardziej złożonych struktur powierzchniowych bakterii Gram-ujemnych oraz niektórych archeonów osłonami (ang. envelope) oraz inne struktury powierzchniowe (warstwa S archeonów i bakterii, otoczki) są krytycznym miejscem kontaktu z nanocząstkami oraz regulują ich dostęp do wnętrza komórki. Zdolność nanocząstek do przeniknięcia przez te struktury determinuje ich efekty komórkowe. Wynikają one z bezpośredniego oddziaływania nanocząstek lub działania produktów powstających wtórnie w komórce, takich jak np. reaktywne formy tlenu (RFT) czy jony metali. Właściwości fizykochemiczne NPs (rozmiar, kształt, ładunek powierzchniowy, hydrofobowość i grupy funkcyjne) określają ich reaktywność w stosunku do składników otoczki, ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej bakterii oraz wpływają na ich toksyczność [Joo i Aggarwal 2018]. Wizualizacja za pomocą elektronowego mikroskopu transmisyjnego (TEM) daje możliwość oceny interakcji zachodzących między mikroorganizmami a nanocząstkami. Dzięki tej metodzie pokazano różnice w reakcji komórek mikroorganizmów na nanocząstki o dodatnim i ujemnym potencjale zeta [Chwalibog i in. 2010]. Nanodiamenty, które są dielektrykami i wykazują dodatni potencjał zeta, równomiernie otaczały komórki mikroorganizmów, nie indukując zmian w architekturze ich struktur zewnętrznych. Natomiast oddziaływanie nanocząstek metali (AgNPs, AuNPs i PtNPs) o ujemnym potencjale zeta prowadziło do lizy komórek, w wyniku uszkodzeń ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej. Rozerwana, pofragmentowana ściana komórkowa lub jej deformacje takie jak: perforacje, pogrubienie, nieregularny kształt, a następnie uwalnianie do środowiska materii wewnątrzkomórkowej to najczęściej obserwowane skutki działania nanocząstek metali na komórki bakterii [Nair i in. 2009].

Zniszczenie ściany komórkowej bakterii następuje zwykle w wyniku fizycznej interakcji między NPs a tą strukturą. Wiele badań potwierdza, że bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie różnią się wrażliwością na nanocząstki metali (tabela 8). Bakterie Gram-ujemne są z reguły bardziej wrażliwe na działanie NPs niż Gram-dodatnie. Przyczyn tego zjawiska należy dopatrywać się w różnicy w budowie ścian komórkowych tych dwóch typów mikroorganizmów.

Zewnętrzną warstwę komórki bakterii Gram-ujemnych tworzy błona cytoplazmatyczna i ściana komórkowa składająca się z warstwy peptydoglikanu i błony zewnętrznej (ang. outer membranę, OM). Błona zewnętrzna jest półprzepuszczalna, ma pory i nie jest tak szczelna jak błona cytoplazmatyczna [Koebnik i in. 2000]. Błona zewnętrzna jest asymetryczna. Struktura ta składa się z fosfolipidów, których głównym komponentem jest lipopolisacharyd (LPS). Część cząsteczka LPS składa się z trzech odrębnych domen: lipidu A (od czterech do siedmiu acylowych łańcuchów przyłączonych do dwóch fosforylowanych glukozamin), zakotwicza on cząsteczki LPS w dwuwarstwie błony zewnętrznej; oligosacharydu złożonego z heksoz, heptoz i kwasów 3-deoksy-D-mannooktulozonowe oraz O-polisacharydu, zawierającego powtarzający się łańcuch oligosacharydowy

o zmiennej długości. Forma gładka LPS (LPS-S) zawiera trzy wymienione domeny, natomiast modyfikacja tej struktury polegająca na utracie łańcucha O-polisacharydowego daje formę szorstką (LPS-R). Przy wartościach pH typowych dla środowiska wzrostu bakterii, wszystkie domeny mają wypadkowy ujemny ładunek związany z obecnością grup fosforanowych ($pK_a < 3$), kwasu glukuronowego ($pK_a < 3$), kwasu galakturonowego ($pK_a < 4$) i kwasu N-acetylowuraminowego ($pK_a 2,6$) [Kirschner i in. 2012]. LPS pokrywa około 75% zewnętrznej powierzchni niektórych bakterii i służy jako ważna bariera hydrofilowa, chroniąc bakterie Gram-ujemne przed środkami biobójczymi. W badaniach asocjacji nanocząstek metali ze ścianą komórkową bakterii Gram-ujemnych wykorzystuje się bakterie o nienaruszonej ścianie komórkowej lub komórki pozbawione lipopolisacharydów, a także modelowe dwuwarstwy lipidowe zawierające lipopolisacharydy. Dzięki tego typu doświadczeniom wykazano, że struktura lipopolisacharydów jest kluczowa dla oddziaływania elektrostatycznego z nanocząstkami. Natomiast ładunek powierzchniowy nanocząstek jest głównym czynnikiem decydującym o ich biobójczym działaniu. Określa on ich powierzchniowy potencjał elektrokinetyczny (potencjał zeta). Wartość potencjału zeta silnie zależy od pH środowiska i ma istotne znaczenie w procesie agregacji cząstek [Pomastowski i in. 2012].

Elektrostatyczne oddziaływanie nanocząstek z błoną zewnętrzną komórki zachodzi głównie za pośrednictwem lipopolisacharydów. Ujemny ładunek LPS sprzyja tworzeniu się bariery elektrostatycznej między bakterią a ujemnie naładowanymi nanocząstkami metali. Dodatnio naładowane nanocząstki metali z większym prawdopodobieństwem oddziałują z bakteriami Gram-ujemnymi niż nanocząstki naładowane ujemnie. Potwierdziły to doświadczenia przeprowadzone na *Shewanella oneidensis* z użyciem nanocząstek złota, które połączono z kwasem 3-merkaptopropionowym (MPA) lub 3-merkaptopropyloaminą (MPNH₂), nadając im powierzchniowy ładunek ujemny lub dodatni [Jacobson i in. 2015]. Z komórek tych bakterii usunięto około ~50% LPS, co zmniejszyło wiązanie MPNH₂-AuNPs o ~70%. Nanocząstki kationowe wiążą się preferencyjnie z LPS, usunięcie tego składnika ściany komórkowej zmniejsza ilość nanocząstek wiążących się z błoną zewnętrzną. Z kolei anionowe MPA-AuNPs niezależnie od zawartości LPS nie wiązały się w znaczącym stopniu z komórką. Bakterie *Shewanella oneidensis* rosną w temperaturze 30°C, wytwarzając tylko „szorstki” LPS, zaś w niższej temperaturze syntetyzują „gładki” LPS. Właściwość tę wykorzystano w doświadczeniu nad wiązaniem się nanocząstek do bakterii wytwarzających różne formy LPS. Stwierdzono wyższą asocjację i silnie elektrostatyczne oddziaływanie nanocząstek z komórkami o gładkim LPS. Dzięki obecności O-polisacharydu gładki LPS, eksponuje większą liczbę anionowych grup funkcyjnych i przez to jego elektrostatyczne interakcje z kationowymi AuNPs są wydajniejsze [Jacobson i in. 2015]. Wyniki tego doświadczenia dostarczają bezpośrednich dowodów na elektrostatyczny mechanizm asocjacji kationowych nanocząstek z ujemnie naładowanym polisacharydem z LPS w błonie zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych.

Badania ATR-FTIR potwierdziły interakcję lipopolisacharydu (LPS) i L- α -fosfatydylo-etanolaminy (PE) z nanocząstkami Al₂O₃NPs. Analizy wid-

mowe w podczerwieni (IR) ujawniły, że LPS może wiązać się z nanocząstkami tlenku glinu poprzez wiązanie wodoru i wymianę ligandów, a tym samym drastycznie zaburza prawidłowe funkcjonowanie ściany komórkowej. Nanocząstki Al_2O_3 powodują u *E. coli* tworzenie się jamek o nieregularnym kształcie i perforację ścian komórek bakteryjnych [Ansari i in. 2014].

Białka porynowe obecne w błonie zewnętrznej Gram-ujemnych bakterii biorą aktywny udział w odpowiedzi na substancje chemiczne, w tym również nanocząstki. Komórki pozbawione pewnych białek porynowych charakteryzują się większą przeżywalnością w obecności AgNPs w porównaniu z komórkami szczepów dzikich. Potwierdzają to doświadczenia nad wpływem mutacji genów kodujących poryny u *E. coli* na wrażliwość bakterii na nanocząstki srebra [Radzig i in. 2013]. Zmutowane szczepy *E. coli* z niedoborem poryn OmpF lub OmpC były około 6-krotnie bardziej odporne na nanocząstki srebra w porównaniu ze szczepem typu dzikiego, co sugeruje, że poryny odgrywają kluczową rolę w transporcie tych nanocząstek do komórki. Ponieważ wielkość porów utworzonych przez białka poryn wynosi około 1 nm, jony srebra mogły przechodzić przez nie, natomiast były one niedostępne dla nanocząstek srebra o średnicy ~8 nm. Toksyczne efekty działania tych nanocząstek były więc spowodowane głównie przez jony srebra przenikające przez ściany komórkowe do wnętrza komórki [Radzig i in. 2013]. Nanocząstki mogą też wpływać na syntezę składników białkowych w ścianie komórkowej bakterii. Za pomocą elektroforezy dwukierunkowej zbadano zmiany profilu proteomicznego komórek *P. aeruginosa* zachodzące pod wpływem inkubacji z nanocząstkami srebra immobilizowanymi na nośniku grafenowym. Stwierdzono, że powodują one między innymi ekspresję genów białek błony zewnętrznej [He i in. 2014a]. Zarówno białka obecne w środowisku, jak i będące składnikami ściany komórkowej lub innych struktur zewnętrznych bakterii mogą mieć także udział w modulowaniu toksyczności nanocząstek, tworząc na ich powierzchni warstwę „protein corona” [Duran i in. 2015]. Częsteczki białek ulegają adsorpcji na powierzchni nanocząstek metali i w zależności od ich powinowactwa do nanocząstek tworzą warstwę silnie lub słabo związaną. Przy dużym powinowactwie do nanocząstek formuje się tzw. „hard corona”, gdy zaś powinowactwo jest małe proces przyłączania i odłączania białek jest dynamiczny, a wokół nanocząstek formuje się warstwa luźno związanych białek tworzących tzw. „soft corona”. Dla nanocząstek srebra wykazano, że skład „protein corona” decyduje o ich potencjale przeciwbakteryjnym [Gnanadhas i in. 2013]. Zaobserwowano, że AgNPs nie wykazywały działania przeciwbakteryjnego w obecności białek surowicy, ponieważ absorbowały na swojej powierzchni albuminę surowicy bydlęcej. Jednak nanocząstki srebra opłaszczane cytrynianem lub poliwinylpirolidonem (PVP) wykazywały właściwości przeciwbakteryjne ze względu na zminimalizowane interakcje z białkami surowicy. Obserwacja ta ma duże znaczenie praktyczne, gdyż metoda syntezy i stabilizacji AgNPs powinna być uwzględniana przy projektowaniu środków przeciwdrobnoustrojowych do celów terapeutycznych [Gnanadhas i in. 2013].

Pomimo różnic w budowie ściany komórkowej Gram-dodatnich i Gram-ujemnych bakterii wypadkowy ładunek grup funkcyjnych cząsteczek tworzą-

cych zewnętrzne struktury obu typów komórek jest ujemny. Bakterie Gram-ujemne zawdzięczają go głównie lipopolisacharydowi, zaś Gram-dodatnie grubej warstwie peptydoglikanu. Peptydoglikany zbudowane są z długich łańcuchów polisacharydowych, składających się z powtarzających się jednostek *N*-acetylo-*D*-glukozaminy (GlcNAc) oraz kwasu *N*-acetylo-*D*-muraminowego (MurNAc), połączonych wiązaniem $\beta(1\rightarrow4)$ *O*-glikozydowym. U niektórych bakterii w peptydoglikanie zamiast reszty MurNAc występuje kwas *l*-talozaaminouronowy. Do grupy karboksylowej kwasu *N*-acetylo-*D*-muraminowego przyłączony jest fragment peptydowy składający się z reszt *L*- i *D*-aminokwasów, a w kwasie *L*-talozaaminouronowym ten składnik zawiera wyłącznie *L*-amino-kwasy [Rai i in. 2003]. Ładunek ujemny peptydoglikanom nadają licznie występujące reszty karboksylowe, fosforanowe i aminowe. Wykazano, że nanocząstki srebra oddziałujące z peptydoglikanem ściany komórkowej *S. aureus* przyłączają się do niej i zmieniają pierwszo- i drugorzędową strukturę peptydoglikanu, a kwas muraminowy uwalniany jest do środowiska, co świadczy o uszkodzeniu ściany komórkowej tych bakterii [Mirzajani i in. 2011]. Tak więc nanocząstki powodują powstawanie porów ułatwiających im wnikanie do komórek bakterii, co nasila procesy destrukcyjne i ostatecznie prowadzi do lizy komórek.

Komórki bakterii Gram-dodatnich mają w ścianie komórkowej kwasy tejchojowe połączone wiązaniami kowalencyjnymi do grubej warstwy mureiny. Kwasy tejchojowe są funkcjonalnym odpowiednikiem LPS bakterii Gram-ujemnych. Zawierają łańcuchowe polimery złożone z 8–50 cząsteczek fosforanu glicerolu i fosforanu rybitolu (erytrolu lub mannitolu) z resztami podstawionymi *D*-alaniną i często resztami glukozyłowymi. Poszczególne monomery są połączone wiązaniami fosfodiesterowymi. Kwasy tejchojowe mogą stanowić do 50% masy ściany komórkowej i pomagają w utrzymaniu homeostazy kationowej w komórce. Zrozumienie ich roli w interakcji z nanocząstkami ma więc kluczowe znaczenie, szczególnie w przypadku nanocząstek funkcjonalizowanych grupami kationowymi. Przeprowadzono doświadczenia nad interakcją nanocząstek do powierzchni komórek Gram-dodatnich [Caudill i in. 2020]. Wykorzystano całe komórki *B. subtilis* i ściany komórkowe izolowane z komórek typu dzikiego oraz dwóch zmutowanych szczepów różniących się składem kwasu tejchojowego. Stwierdzono, że skład ściany komórkowej i struktura kwasu tejchojowego wpływały na interakcje z kationowymi nanocząstkami złota. Nanocząstki oddziałują w większym stopniu z kwasami tejchojowymi izolowanymi ze ścian komórek dzikiego typu lub mutantów pozbawionych glukozy w kwasie tejchojowym niż z kwasami tejchojowymi pozbawionymi alaniny. Siły elektrostatycznego przyciągania decydują o wiązaniu dodatnio naładowanych nanocząstek z dostępnymi ujemnie naładowanymi ugrupowaniami w łańcuchach kwasu tejchojowego [Caudill i in. 2020].

Jak opisano wyżej, przyczyną większej wrażliwości bakterii Gram-ujemnych na działanie NPs jest obecność ujemnie naładowanych lipopolisacharydów, o dużym powinowactwie do jonów o ładunku dodatnim co prowadzi do ich nagromadzenia i zwiększonego wychwytu na powierzchni komórek. Badania na komórkach *S. Typhimurium* pokazały, że grupy anionowe na powierzchni ściany

komórkowej nie są równomiernie rozłożone, ale tworzą mozaikę [Magnusson i Bayer 1983]. Również badania mobilności elektroforetycznej składników ściany komórkowej pozwoliły na wykrycie różnic w strukturze powierzchni bakterii *E. coli* i *S. aureus*. Stwierdzono, że *E. coli* ma bardziej ujemnie naładowaną i mniej podatną na odkształcenia ścianę komórkową niż *S. aureus* [Sonohara i in. 1995]. Wyniki te sugerują, że na powierzchni ściany komórkowej w miejscu nagromadzenia grup anionowych mogą powstawać miejsca wysyczone nanocząstkami, a ich większe lokalne stężenie może skuteczniej uszkadzać te struktury komórkowe.

3.1.3. Toksyczność NPs dla grzybów i ich interakcje ze ścianą komórkową

Ściany komórkowe grzybów mają duże zdolności do adsorpcji różnego typu substancji zarówno w formie jonów, cząsteczek, jak i nanocząstek [Pereyra i in. 2018]. Podobnie jak u bakterii, nanocząstki, akumulując się w ścianie lub błonie cytoplazmatycznej grzybów, powodują zmiany w ich strukturze [Lara i in. 2015, Zhang i in. 2016a; Babele i in. 2018]. Skład chemiczny, grubość i architektura ściany komórkowej są ważnymi czynnikami umożliwiającymi wniknięcie nanocząstek do wnętrza komórki. Ściana komórkowa grzybów jest postrzegana jako porowata matryca. Ma ona budowę warstwową, a jej skład chemiczny jest różny u przedstawicieli różnych grup taksonomicznych grzybów. Występuje w niej wiele polimerów, takich jak celuloza, chityna, mureina i chitozan. W skład ściany komórkowej mogą wchodzić inne polisacharydy, lipoproteiny, lipopolisacharydy, lipidy i glikoproteiny. Warstwa najbardziej zewnętrzna zbudowana jest z bezpostaciowych glukanów. Grubość ściany komórkowej zależy od gatunku, a także od warunków wzrostu komórek.

U drożdży *S. cerevisiae* grubość ściany komórkowej wynosi od 70 nm do 270 nm w zależności od szczepu i warunków wzrostu. Natomiast pory w ich ścianie mają średnicę około 200 nm, ale w warunkach stresowych mogą się one jeszcze zwiększyć, dochodząc do 400 nm [Pereira i Geibel 1999]. Podczas przenikania nanocząstek metali przez ścianę komórkową występuje efekt sita. Nanocząstki o rozmiarach mniejszych niż pory ściany mogą przechodzić przez tę strukturę komórkową i dotrzeć do błony cytoplazmatycznej, zaś te o większych rozmiarach są zatrzymywane.

Rajiv i in. [2013] otrzymali różniące się wielkością i kształtem nanocząstki tlenku cynku (ZnONPs) metodą biosyntezy przy użyciu ekstraktów z liści *Parthenium hysterophorus* L. Nanocząstki sferyczne były małe o średnicy 27 nm, natomiast heksagonalne, ponad trzykrotnie większe, o średnicy 84 nm. Analizując ich aktywność przeciwgrzybową, stwierdzono, że zależała ona głównie od ich wielkości. Nanocząstki o mniejszych rozmiarach wykazywały silniejsze efekty grzybobójcze niż te o większej średnicy, prawdopodobnie spowodowane ich zdolnością do przechodzenia przez pory w ścianie komórkowej.

Na toksyczność nanocząstek metali wpływają także cechy budowy ściany komórkowej grzybów. Potwierdzają to badania Seddighi i in. [2017]. Grupa ta

badala wpływ sferycznych nanocząstek tlenku żelaza o wielkości 30–40 nm na różne gatunki *Candida*, zdolnych do wywoływania zakażeń grzybiczych. Wśród analizowanych gatunków najbardziej wrażliwe na nanocząstki tlenku żelaza okazały się *C. tropicalis*, *C. albicans* i *C. glabrata*. Pomimo ich bliskiego, filogenetycznego pokrewieństwa uzyskano zróżnicowaną wrażliwość tych grzybów na biobójcze działanie nanocząstek. Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost (MIC) wahały się odpowiednio od 62,5 do 500 µg/ml, zaś minimalne stężenie grzybobójcze (MFC) dla *C. tropicalis* wynosiło 500 µg/ml, a dla *C. glabrata* 1000 µg/ml. Różnice w poziomie wrażliwości tych mikroorganizmów tłumaczono różną budową ich ściany komórkowej. U obu gatunków *Candida* pomimo tego samego składu chemicznego ściany komórkowej (1,3-β-glukan, 1,6-β-glukan, chityna i mannoproteiny) zarówno udział każdego ze składników, jak i ilość wiązań poprzecznych między tymi składnikami był różny. U *C. glabrata* stwierdzono wyższy stosunek mannozy do glukozy i wyższą ilość glukanów nierozpuszczalnych w zasadach zarówno w stosunku do całkowitej masy ściany, jak i całkowitej zawartości glukanu. W ścianie komórkowej *C. glabrata* występuje mniej wiązań krzyżowych między glukanem a chityną. Komórki *C. glabrata* były otoczone ścianą o grubości 100–200 nm, zaś *C. tropicalis* miały ścianę komórkową o średniej grubości 130 nm. Ściany komórkowe grzybów chorobotwórczych są barierą chroniącą je przed otaczającym środowiskiem, a różnice w architekturze i składzie chemicznym ścian mogą wpływać na wrażliwość tych komórek na nanocząstki [Seddighi i in. 2017].

Wpływ nanocząstek metali na ścianę komórkową grzybów może być wynikiem interakcji bezpośrednich lub pośrednich. Przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) badano rozmieszczenie CuONPs w komórkach *S. cerevisiae*. Stwierdzono nierównomierną dystrybucję tych NPs w środowisku komórkowym. Większość CuONPs została uwięziona w ścianie komórkowej, tylko niewielką ich ilość zlokalizowano w pęcherzykach endosomalnych [Vasco i in. 2017]. Podobne obserwacje odnotowano w przypadku NiONPs u *S. cerevisiae*. Nanocząstki NiONPs były adsorbowane na powierzchni komórki, ale nie były internalizowane w komórkach drożdży. Mutanty izogeniczne o zwiększonej porowatości ściany komórkowej nie wykazywały większej wrażliwości na NiONPs w porównaniu ze szczepem typu dzikiego [Sousa i in. 2018]. Zhang i in. [2016a] w podobnym eksperymencie nie wykryli cząstek ZnONPs wewnątrz komórek drożdży, pomimo dowodów wskazujących na ich wewnątrzkomórkowe działanie. Wyniki te wskazują, że NPs mogą wywierać toksyczne działanie na drożdże poprzez mechanizm pośredni, w którym kluczowe jest uwalnianie jonów i wywoływane przez nie reakcje wolnorodnikowe [Sousa i in. 2019a].

Na ścianę komórkową jako miejsce działania nanocząstek wskazują też badania Lara i in. [2015]. Obserwowali oni za pomocą SEM morfologię komórek *C. albicans* po inkubacji z AgNPs. Pod wpływem AgNPs powierzchnia komórek tych drożdży z gładkiej zmieniła się w szorstką, co wskazuje na zewnętrzne uszkodzenie ściany komórkowej [Lara i in. 2015]. Podobny efekt odnotowano u drożdży *S. cerevisiae* inkubowanych z nanocząstkami tlenku cynku (ZnONPs)

[Zhang i in. 2016a, Babeli i in. 2018]. Obserwacje tych komórek w mikroskopie elektronowym wykazały, że pod wpływem ZnONPs radykalnie zmieniła się ich morfologia [Zhang i in. 2016a]. Komórki były zdeformowane, zmieniły kształt z eliptycznego na nieregularny, a ich ściany komórkowe były zapadnięte, miejscowo pofałdowane lub poprzerywane. W przeciwieństwie do nich komórki kontrolne posiadały typowe ściany komórkowe. Drożdże ekspozycje na ZnONPs, CuONPs i AgNPs miały pofałdowaną i grubszą ścianę, a jej warstwa zewnętrzna miała większą gęstość elektronową [Bayat i in. 2014]. U *S. cerevisiae* inkubowanych z ZnONPs obserwowano podwyższenie ekspresji genów zaangażowanych w szlaki syntezy chityny (CHS1, CHS3 i CHS5) i wzrost zawartości tego składnika ściany komórkowej [Babeli i in. 2018]. Podobnie efekty obserwowano u drożdży *P. pastoris* inkubowanych z nanocząstkami TiO₂NPs [Liu i in. 2016].

Pokonanie przez MeNPs bariery w postaci ściany komórkowej jest kluczowe do wywołania dalszych toksycznych efektów w obrębie błony cytoplazmatycznej i wnikięcia do wnętrza komórki. Czynniki ułatwiające penetrację ściany komórkowej zwiększają skuteczność działania nanocząstek. Zademonstrowano to w doświadczeniu, w którym badano oddziaływanie nanotlenku żelaza pokrytego warstwą chitozanu na *F. solani*, *A. niger* i *C. albicans*. Stwierdzono, że działanie przeciugrzybowe nanocząstek opłaszczonych chitozaniem było silniejsze niż cząstek nieposiadających tej powłoki [Nehra i in. 2018]. Ze względu na obecność wolnej grupy hydroksylowej chitozan silnie wiąże się z nanocząstkami tlenku żelaza. Dzięki warstwie chitozanu nanocząstki nie ulegają agregacji w środowisku wodnym. Dodatkowo chitozan silnie oddziałuje ze składnikami anionowymi ściany komórkowej drobnoustrojów i przez to skuteczniej niszczy komórki grzybów.

Procesy indukowane przez nanocząstki metali w komórkach grzybów można uszeregować w następujący sposób: uszkodzenia ściany komórkowej, zaburzenia metabolizmu i stres oksydacyjny, śmierć komórki spowodowana kumulacją wywołanych zmian. Taką sekwencję zdarzeń zaobserwowano w komórkach *S. cerevisiae* po ich ekspozycji na nanocząstki siarczku ołowiu (PbSNPs) o różnych rozmiarach [Sun i in. 2014]. Nanocząstki o najmniejszych rozmiarach wykazywały najwyższą toksyczność, hamowały wzrost komórek i zmniejszały ich żywotność. W ścianie komórkowej drożdży inkubowanych z PbSNPs stwierdzono wzrost zawartości chityny, zwiększyło się też stężenie wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu, prowadząc do dysfunkcji mitochondriów i indukcji apoptozy (programowanej śmierci komórek) Udział rozpuszczonych jonów ołowiu w ogólnej toksyczności nanocząstek był znikomy [Sun i in. 2014].

3.2. Wpływ nanocząstek metali na strukturę i składniki biofilmu

Drobnoustroje zarówno bakterie, jak i grzyby często wykazują zdolność tworzenia biofilmu, dzięki adhezyjnym właściwościom powierzchni komórek.

W skład biofilmu mogą wchodzić mikroorganizmy jednego gatunku (co w środowisku naturalnym jest rzadsze) lub różnych gatunków, jak np. *S. mutans* oraz *C. albicans* [Hwang i in. 2017]. Strukturę biofilmu stabilizują pozakomórkowe polimery – EPS (ang. extracellular polymeric substances), w skład których wchodzi różne egzopolisacharydy, białka (enzymatyczne i strukturalne), glikoproteiny, glikolipidy oraz zewnątrzkomórkowy DNA (ang. extracellular DNA, eDNA) [Flemming i Wingender 2010]. EPS pełni funkcje ochronne przed wysychaniem, zatrzymuje substancje odżywcze, zabezpiecza mikroorganizmy przed substancjami toksycznymi. Biofilm jest strukturą dynamiczną, rodzajem rusztowania, na którym osadzają się komórki drobnoustrojów, tworzy przestrzenne struktury, kanały i szczeliny, przez które odbywa się transport różnych cząsteczek [Feng i in. 2015]. Zdolność do tworzenia biofilmu umożliwia mikroorganizmom przetrwanie w niesprzyjających warunkach środowiska i jest ważnym czynnikiem zakażeń. Eradykacja biofilmów jest w praktyce trudna, gdyż drobnoustroje chronione przez struktury biofilmu nabywają oporności na antybiotyki i środki dezynfekcyjne.

Środowisko biofilmu stwarza dogodne warunki wzrostu dla drobnoustrojów. Mikroorganizmy w biofilmie charakteryzują się wysoką opornością na działanie antybiotyków, co sprzyja też powstawaniu antybiotykooporności. Minimalne stężenie hamujące i minimalne stężenie biobójcze dla komórek bakterii w biofilmie są zazwyczaj znacznie wyższe (około 10–1000 razy) niż dla ich form planktonicznych [Hengzhuang i in. 2012].

Interakcje między nanocząstkami a biofilmem obejmują przemieszczanie nanocząstek do granicy biofilmu; oddziaływanie z zewnętrzną powierzchnią biofilmu; migracje w obrębie biofilmu. Właściwości fizykochemiczne nanocząstek metali (rozmiar, kształt, ładunek powierzchniowy, hydrofobowość i grupy funkcyjne) określają ich interakcje ze składnikami biofilmu zarówno w macierzy EPS, jak i na powierzchni komórek [Joo i Aggarwal 2018]. Nanocząstki AgNPs otrzymane metodą biologiczną wykazywały właściwości przeciwdrobnoustrojowe względem *A. baumannii*, *E. coli* i *S. aureus* [Salunke i in. 2014]. Stosując metodę dyfuzyjno-krażkową, stwierdzono, że dawka 2–8 µg AgNPs na krążek zahamowała wzrost tych bakterii i w dużym stopniu ograniczyła zdolność do tworzenia biofilmu. W innym doświadczeniu, nanocząstki srebra (AgNPs) o wielkości od 4 do 40 nm syntetyzowane przy udziale *A. calcoaceticus* były w stanie zniszczyć biofilmy 20 różnych patogennych bakterii [Gaidhani i in. 2013]. Nanocząstki złota również wykazują działanie destabilizujące biofilm. Inkubowane przez 72 h komórki *P. fluorescens* z nanocząstkami złota tworzyły znacznie słabiej biofilm niż komórki z próby kontrolnej. Objętość biofilmu zmierzona za pomocą konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej 3D uległa zmniejszeniu o 72%. AuNPs spowodowały strukturalne uszkodzenie biofilmu i rozpraszanie komórek w zawiesinie, a także zabijały komórki osiadłe w obrębie biofilmu [Habimana i in. 2018].

Główne interakcje zachodzące między nanocząstkami metali a biofilmem mają charakter oddziaływań elektrostatycznych i hydrofobowych, ale mogą również zachodzić interakcje chemiczne i biologiczne [Huangfu i in. 2019].

Składniki biofilmu są barierą zarówno mechaniczną, jak i chemiczną dla nanocząstek, uniemożliwiając im bezpośredni kontakt z bakteriami [Choi i in. 2010]. Porowate biofilmy umożliwiają zatrzymywanie nanocząstek o rozmiarach większych niż 10 nm [Choi i in. 2010]. Zdolność nanocząstek do wnikania do EPS jest zależna głównie od ich rozmiaru. Badając wpływ AgNPs na biofilm stworzony przez *P. aeruginosa*, stwierdzono, że nanocząstki srebra o małych rozmiarach (10 nm i 20 nm) skuteczniej niż większe nanocząstki (100 nm) zmniejszyły biomasę biofilmu i przeżywalność komórek bakteryjnych. Nie zaobserwowano jednak zmian morfologicznych w strukturze biofilmu ani morfologii komórek, co sugeruje, że nanocząstki zostały uwięzione w matriksie biofilmu [Habash i in. 2014]. Jing i in. [2014] wykazali, że nanocząstki tlenku ceru (CeO₂NPs) zostały zaabsorbowane na powierzchni biofilmu, a komórki *P. fluorescens* i *M. smegmatis* leżące w jego głębszej warstwie nie uległy uszkodzeniu. Potwierdza to tezę o większej odporności na toksyczne działanie nanocząstek mikroorganizmów żyjących w formie biofilmu niż planktonicznej. Jak podaje Choi i in. [2010], minimalne stężenie bakteriobójcze AgNPs dla *E. coli* w formie biofilmu wynosiło 38 mg/l i było wyższe niż dla tych samych komórek w żyjących w formie planktonicznej (10 mg/l). Podobną prawidłowość zaobserwował zespół Radzig i in. [2013]. Nanocząstki srebra w stężeniu hamującym wzrost *E. coli* w zawieszynie (forma planktoniczna) nie były skuteczne dla tych samych komórek w formie biofilmu. Dopiero zastosowanie znacznie wyższego stężenia tych nanocząstek (100–150 µg/ml) prowadziło do śmierci większości bakterii w tej formie [Radzig i in. 2013].

Podczas kontaktu z biofilmem nanocząstki metali wchodzi w interakcję z polimerycznym EPS, co zmienia ich właściwości powierzchniowe. Generalnie dodatkowo naładowane NPs mają większą możliwość bezpośredniej interakcji ze składnikami EPS, które mają sumaryczny ładunek ujemny. Badając oddziaływanie biofilmu *Escherichia coli* z kropkami kwantowymi (Qd) o różnym ładunku powierzchniowym [Li i in. 2015], stwierdzono, że po godzinnej inkubacji neutralne i anionowe Qd nie pokonały zewnętrznej granicy biofilmu, zaś kationowe wnikały i dyfundowały w matrycy biofilmu. Ponadto udowodniono, że nie tylko ładunek powierzchniowy, ale też dodatkowe grupy funkcyjne mogą determinować specyficzne interakcje z biofilmem, gdyż kationowe kropki kwantowe z domeną hydrofilową oddziaływały tylko z EPS, podczas gdy Qd z domeną hydrofobową były lokalizowane w EPS i w komórkach bakterii.

3.3. Interakcje nanocząstek z błoną cytoplazmatyczną mikroorganizmów

W wielu doświadczeniach autorzy podkreślają rolę błony cytoplazmatycznej jako docelowego miejsca oddziaływania nanocząstek. Po przejściu przez ścianę komórkową nanocząstki metali napotykają błonę cytoplazmatyczną i wówczas mogą ją uszkodzić w wyniku fizycznego kontaktu, doprowadzając do jej desta-

bilizacji, zaburzenia funkcji i rozerwania, co z kolei prowadzi do lizy komórki. Według innego scenariusza mogą one być transportowane do komórki za pomocą endocytozy. Endocytoza jest procesem typowym dla komórek ssaków, ale może także zachodzić u bakterii [von Moos i in. 2014]. Znajdujące się w komórkach nanocząstki metali mogą ulegać reakcjom redoks i wytworzyć formy jonowe [Chen i in. 2019, Oh i Park 2014]. Uwalniane z powierzchni nanocząstek jony metali wywołują specyficzne efekty komórkowe, takie jak: uszkodzenia struktur komórkowych, w tym błony cytoplazmatycznej od strony cytozolowej [Oh i Park 2014]. Plejotropowe efekty działania nanocząstek w komórkach wynikają ze specyficznych mechanizmów działania nanocząstek, jonów metali oraz generowanych przez nie reaktywnych form tlenu (RFT). W literaturze ten sposób działania nanocząstek metalicznych określa się terminem „efektu konia trojańskiego” (ang. Trojan horse’s effect) [Oh i Park 2014, Singh i Ramarao 2012, Hsiao i in. 2015].

Wiele doświadczeń wskazuje na bezpośrednie reakcje nanocząstek metali ze składnikami błony cytoplazmatycznej mikroorganizmów. Sondi i Salopek-Sondi [2004] stwierdzili, że zależne od stężenia przeciwdrobnoustrojowe działanie nanocząstek srebra u *E. coli* było ściśle powiązane z tworzeniem się dziur (ang. pits) w ścianie komórkowej tych bakterii oraz gromadzeniem się nanocząstek na błonie cytoplazmatycznej. Oddziaływanie nanocząstek z błoną prowadziło do zmian jej przepuszczalności, co było bezpośrednią przyczyną śmierci komórek. Podobne efekty zaobserwowano po aplikacji nanocząstek tlenku kadmu (CdONPs) na bakterie *S. aureus*, *S. dysenteriae* i *P. aeruginosa* [Azam i in. 2020]. Nanocząstki kumulowały się na błonie cytoplazmatycznej oraz miejscowo uszkadzały jej strukturę za pośrednictwem RFT, co prowadziło do wzrostu jej przepuszczalności i lizy komórek. Zgodnie z tym, w supernatancie uzyskanym po odwirowaniu hodowli tych mikroorganizmów stwierdzono obecność cukrów redukujących i białka. W podobny sposób oddziałują na wiele różnych bakterii nanocząstki ZnONPs i AuNPs [Sirelkhatim i in. 2015, Zhang i in. 2007, Hemeg 2017]. Badania Bondarenko i in. [2018] potwierdziły także, że głównym miejscem oddziaływania AgNPs na bakterie Gram-ujemne *E. coli* i *P. aeruginosa* była błona cytoplazmatyczna. Nanocząstki srebra powodowały jej depolaryzację, indukowały wyciek wewnątrzkomórkowego potasu i hamowały oddychanie komórkowe. Te szkodliwe efekty pojawiły się już w ciągu pierwszych kilku sekund kontaktu komórek bakterii z AgNPs [Bondarenko i in. 2018]. Nanocząstki srebra lub nanokompozyty miedzi uwalniały jony srebra i miedzi, które przenikały przez ścianę komórkową bakterii *L. monocytogenes*, a następnie oddziaływały z ich błoną komórkową, co w konsekwencji prowadziło do lizy tych komórek [Tamayo i in. 2014].

Zmiany płynności i składu dwuwarstwy lipidowej mogą zmieniać podstawowe funkcje błony cytoplazmatycznej, prowadząc do wzrostu jej przepuszczalności i utraty integralności. W konsekwencji obserwuje się wyciek składników cytoplazmy. A zatem pomiar stężenia kwasów nukleinowych, białek, cukrów lub elektrolitów w supernatancie z hodowli mikroorganizmów często wy-

korzysta się do oceny efektów wywoływanych przez nanocząstki w komórkach mikroorganizmów.

Głównym miejscem działania nanocząstek metali są prawdopodobnie lipidowe składniki błony cytoplazmatycznej. Stwierdzono, że nanocząstki srebra zmieniały skład lipidowy błony, zwiększały stosunek trans / cis nienasyconych kwasów tłuszczowych u *P. putida* [Hachicho i in. 2014]. Izomeryzacja cis do trans nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonie cytoplazmatycznej jest szybkim bioindykatorem stresu błonowego w układach eksperymentalnych i służy do oceny toksyczności związków zaburzających strukturę błony. Wzrost płynności błony cytoplazmatycznej po ekspozycji komórek bakterii na AgNPs potwierdza, że uszkodzenie błony cytoplazmatycznej i utrata jej funkcji jest efektem ich toksycznego działania [Hachicho i in. 2014].

Nanocząstki metali mogą także oddziaływać z białkami błony cytoplazmatycznej, tworząc kompleksy z donorami elektronów, takimi jak: atomy tlenu, fosforu, azotu lub siarki. Dodatkowo toksyczność nanocząstek metali może być zwiększona przez uwalnianie z nich jonów, które mogą zaburzać funkcje błony cytoplazmatycznej. Potwierdzono, że działanie przeciwbakteryjne nanocząstek srebra może być zmniejszone przez związki zawierające grupy tiolowe [Lok i in. 2006]. Nanocząstki srebra mogą oddziaływać z białkami błonowymi zawierającymi siarkę, a tym samym inaktywować enzymy i modyfikować funkcje błony, zwłaszcza transport. Gdy potencjał błony jest rozpraszany przez kontakt z nanocząstkami, w komórkach gromadzą się prekursorzy białek osłon i składniki peryplazmatyczne. Nanocząstki srebra oddziałujące na błonę cytoplazmatyczną mogą również zakłócać transport elektronów na łańcuchu oddechowym oraz obniżać produkcję energii [Lok i in. 2006].

Badania dotyczące toksyczności nanocząstek srebra przeprowadzono także na różnych grzybach, w tym na *T. rubrum*, *B. cinerea*, *P. expansum*, *Phomopsis* spp., *C. albicans*, *C. tropicalis* i *S. cerevisiae* [Panáček i in. 2009, Lili i in. 2011, Nasrollahi i in. 2011, Mallmann i in. 2015] i we wszystkich tych przypadkach potwierdzono, że szkodliwy wpływ AgNPs wiąże się z ich oddziaływaniem na składniki błony cytoplazmatycznej. U drożdży uszkodzenia ściany komórkowej przez nanocząstki metali były sprzężone ze zmianami w strukturze błony cytoplazmatycznej i ich zwiększoną śmiertelnością. Kim i in. [2009], badając działanie AgNPs na *C. albicans*, zaobserwowali, że jednym z kluczowych objawów toksyczności tych nanocząstek jest depolaryzacja błony cytoplazmatycznej. Stwierdzili, że jest to następstwo tworzenia się „dziur” i „zagłębień” w strukturze ściany komórkowej. Utrata integralności błony cytoplazmatycznej doprowadziła do uwolnienia wewnątrzkomórkowej glukozy i trehalozy do środowiska hodowlanego. Docelowym miejscem działania nanocząstek Fe₃O₄NPs u *Candida* spp. była również błona cytoplazmatyczna. Konsekwencją jej uszkodzeń było zahamowanie wzrostu tych drożdży [Prucek i in. 2011]. Szkodliwy wpływ nanocząstek srebra na ścianę komórkową i błonę cytoplazmatyczną stwierdzono także u *Cryptococcus neoformans* i *Cryptosporiopsis ericae* [Ishida i in. 2013, Devi i Joshi 2014]. Przy użyciu różnych technik mikroskopowych (TEM, AFM)

zaobserwowano zmiany w architekturze tych struktur, głównie fragmentację błony cytoplazmatycznej i perforacje ściany komórkowej.

Ekspozycja drożdży na NiONPs w warunkach stresu oksydacyjnego prowadzi do postępującej depolaryzacji (redukcji potencjału błonowego) i wzrostu przepuszczalności błony cytoplazmatycznej [Sousa i in. 2019b]. Podobnie drożdże inkubowane z ZnONPs wykazywały zwiększoną przepuszczalność błony cytoplazmatycznej [Babele i in. 2018]. Co ciekawe, szczepy zmutowane, z delecją genów zaangażowanych w biosyntezę ergosterolu (ERG2 i ERG28), związku wpływającego na płynność błony oraz transport (PKR1), wykazywały zwiększoną wrażliwość na ZnONP, co sugeruje, że te nanocząstki zakłócają integralność błony i upośledzają jej prawidłowe funkcjonowanie [Márquez i in. 2018].

3.4. Mechanizm przeciwdrobnoustrojowy nanocząstek metali związany z uwalnianiem jonów

Mechanizm toksyczności nanocząstek metali jest ściśle powiązany z uwalnianiem rozpuszczalnych jonów z ich powierzchni. W gamie plejotropowych mechanizmów oddziaływania nanocząstek na mikroorganizmy reakcje jonów, oprócz oddziaływań elektrostatycznych i generowania reaktywnych form tlenu (RFT), mają kluczowe biobójcze znaczenie dla mikroorganizmów. Badania nad niemodyfikowanymi nanocząstkami CuONPs lub włączonymi w struktury polimerów sugerują, że uwolnienie jonów może być konieczne dla uzyskania optymalnego działania bakteriobójczego [Ren i in. 2009, Bao i in. 2015]. Rozpuszczone w roztworze jony jako pierwsze wywołują efekty toksyczne, natomiast generowanie przez nie RFT wydaje się być procesem wtórnym.

Biodostępne frakcje jonów metali uwalniane z nanocząstek można badać, stosując analizę chemiczną lub rekombinowane drobnoustroje specyficznie reagujące na ich obecność. Rekombinowane komórki bakteryjne są modyfikowane w taki sposób, aby uzyskać odpowiedź fizjologiczną np. w formie łatwo wykrywalnego sygnału luminescencji na działanie subtoksycznych stężeń metali ciężkich. Z tego względu układy te stały się obiecującymi narzędziami do badania mechanizmu uwalniania jonów z nanocząstek metali. Zespół Bondarenko i in. [2012] zastosował do detekcji subtoksycznych stężeń nanocząstek tlenków miedzi (CuONPs) zrekombinowane bakterie *E. coli* zawierające geny aktywowane w warunkach stresu indukowanego obecnością jonów metali. Promotory tych genów zostały sprzężone z genami kodującymi enzymy indukujące bioluminescencję, a zatem stan stresu manifestuje się zwiększoną bioluminescencją tych bakterii. W celu zidentyfikowania, która z form miedzi (CuONPs, CuO czy jony miedzi) aktywuje program odpowiedzi na stres i wyzwała reakcję bioluminescencji przeprowadzono szereg testów. W pierwszym etapie oznaczono stężenie rozpuszczalnych jonów miedzi dla wszystkich badanych form tego pierwiastka dających maksymalną odpowiedź bioluminescencji rekombinowanych komórek. We wszystkich próbach wykryto podobne stężenia tych jonów. Po dodaniu do

nich chelatora jonów – EDTA nie obserwowano w żadnym przypadku zjawiska bioluminescencji. Wynik tego doświadczenia świadczy o tym, że zmiany metaboliczne wykryte przez ten biocujnik były rzeczywiście wywołane przez jony miedzi. Rozpuszczalne jony miedzi już w bardzo niskich stężeniach indukują powstawanie anionów ponadtlenkowych, nadtlenku wodoru i jednoniciowego DNA. Te specyficzne RFT oraz/lub uszkodzone biomolekuły są sygnałem uruchamiającym program odpowiedzi na stres w wyniku, którego powstają białka chroniące przed RFT oraz naprawiające uszkodzone struktury. Ta sekwencja zdarzeń sugeruje, że jony jako pierwsze wywołują sygnałne uszkodzenia w komórce, zaś reaktywne formy tlenu powstają wtórnie. Opisane eksperymenty udowodniły, że mechanizm toksyczności nanomiedzi jest ściśle powiązany z obecnością jonów tego metalu. Zjawisko indukowania odpowiedzi stresowej przez jony metali może zachodzić w organizmach jednokomórkowych, które posiadają ścianę komórkową chroniącą przed bezpośrednim kontaktem nanocząstek metali z błoną cytoplazmatyczną i w których procesy endocytozy nie są głównym mechanizmem transportu [Bondarenko i in. 2012].

Dowodów na to, że wczesne niekorzystne skutki działania nanocząstek są spowodowane przez rozpuszczone jony dostarczyły także prace dotyczące toksyczności nanocynku (tabela 10). Doświadczenia przeprowadzone metodą dyfuzyjno-krażkową potwierdziły, że tylko rozpuszczalne jony, a nie nanocząstki cynku mogą dyfundować z krążków celulozy, zaś toksyczność nanocząstek cynku dla *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* była niższa niż formy jonowej – glukonianu cynku. To samo doświadczenie przeprowadzono też w podłożu płynnym, w tym przypadku działanie przeciwdrobnoustrojowe nanocząstek było znacznie silniejsze niż soli cynku. Potwierdzono też, że jony cynku są uwalniane z nanocząstek, a rodzaj roztworu i jego pH wpływają na wydajność tego procesu [Pasquet i in. 2014]. W innym wariantcie tego doświadczenia badano działanie przeciwdrobnoustrojowe trzech typów próbek: pożywki z zawiesiną ZnONPs, supernatantu uzyskanego po odwirowaniu pożywki z zawiesiną ZnONPs, pożywki zawierającej rozpuszczalne formy cynku i roztwór glukonianu cynku. Stwierdzono, że jony cynku uwalniane przez częściowe rozpuszczenie ZnONPs odgrywają ważną rolę w aktywności przeciwdrobnoustrojowej nanocząstek. Porównano przeżywalność drobnoustrojów w wymienionych wcześniej trzech typach próbek i stwierdzono, że za aktywność przeciwdrobnoustrojową ZnONPs w przypadku *E. coli* odpowiada w około 15% forma jonowa, dla *S. aureus* było to 71%, zaś efekt biobójczy dla *C. albicans* prawie w 100% powodowały jony cynku [Pasquet i in. 2014].

Uwalnianie jonów z nanocząstek metali i rodzaj środowiska, w którym ten proces zachodzi, odgrywa dużą rolę w oddziaływaniach biobójczych. Na toksyczność ZnONPs (o średnicy około 30 nm) wobec *B. subtilis* i *E. coli* największy wpływ miało stężenie uwalnianych Zn^{+2} oraz obecność w roztworze związków, zdolnych do ich chelatowania. Kwasy humusowe, a także taninowy, fulwowy i alginowy zmniejszały toksyczność ZnONPs, ponieważ wiązały większość wolnych jonów Zn^{+2} , tym samym zmniejszając ich biodostępność [Li i in. 2011]. Nawet w powszechnie stosowanych roztworach i żywnościach do hodowli

mikroorganizmów toksyczność nanocynku zależy od uwalniania jonów i zawartości składników, które zmniejszają ich biodostępność. W badaniu toksyczności ZnONPs dla *E. coli* O111 przeprowadzonym w różnych środowiskach: ultraczystej wodzie, 0,85% NaCl, soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS), pożywce minimalnej Davisa (MD) i Lurii-Bertaniego (LB) otrzymano różne wartości przeżywalności bakterii. Wytworzenie osadu (w PBS) i kompleksów cynku (w pożywkach MD i LB) zmniejszyło stężenie wolnych jonów Zn^{+2} , skutkując ich niższą biodostępnością, a tym samym mniejszą toksycznością nanocząstek w tych podłożach [Li i in. 2011].

Na toksyczność nanocząstek srebra wpływa również uwalnianie jonów srebra, przy czym AgNPs są uważane za bardziej skuteczne środki przeciwbakteryjne niż bezpośrednio stosowane jony srebra (tabela 10). Ag^{+1} mają ograniczony czas działania, zaś AgNPs uwalniają jony stopniowo, ale przez dłuższy okres [Dakal i in. 2016, Ivask i in. 2014]. AgNPs utleniają się w napowietrzanych roztworach i tworzą jony Ag^{+1} , które są odpowiedzialne za aktywność przeciwbakteryjną. W środowisku beztlenowym reakcja ta nie zachodzi i dlatego w tych warunkach aktywność przeciwdrobnoustrojową nanocząstek srebra jest niewielka [Xiu i in. 2012].

Jednym z ważniejszych parametrów wpływających na przeciwbakteryjne działanie nanocząstek srebra jest rozmiar i związany z tym stosunek ich powierzchni do objętości. Najniższe stężenie uwolnionych jonów srebra odnotowano dla AgNPs o najmniejszej wartości tego parametru, co jednocześnie było związane z ich słabym oddziaływaniem przeciwdrobnoustrojowym względem *E. coli*. Proces uwalniania jonów z powierzchni nanocząstek jest promowany wraz ze zmniejszeniem ich rozmiaru i zwiększeniem stosunku powierzchni do objętości. Prawidłowość tę potwierdzono, oznaczając za pomocą atomowej spektrometrii absorpcyjnej (ASA) liczbę jonów uwalnianych z CuNPs o różnych rozmiarach cząstek. W tym przypadku liczba jonów w roztworze wzrastała odwrotnie proporcjonalnie do wielkości CuNPs [Majumdar i in. 2019].

Szybkość uwalniania jonów z nanocząstek może również decydować o ich biobójczym oddziaływaniu. Przeprowadzono doświadczenie, w którym badano uwalnianie jonów srebra z AgNPs immobilizowanych na powierzchni szklanej z dodatkowo wprowadzonymi grupami aminokrzemowymi [Agnihotri i in. 2013]. Stwierdzono, że tak przygotowana powierzchnia antybakteryjna jest wyjątkowo stabilna w wodzie, nanocząstki srebra nie są z niej wymywane, a pomimo to wykazują lepszą zdolność do dezynfekcji niż wolne koloidalne nanocząstki. Z immobilizowanych AgNPs jony srebra są uwalniane stopniowo i działają przeciwbakteryjnie nawet przy wielokrotnym użyciu. Natomiast uwalnianie jonów srebra z nanocząstek koloidalnych może być po pewnym czasie zahamowane na skutek ich agregacji, co zmniejsza ich bakteriobójcze właściwości [Agnihotri i in. 2013].

Eksperymentem potwierdzającym tezę, że nanocząstki działają bakteriobójczo poprzez uwalnianie jonów jest doświadczenie, w którym przetestowano nanocząstki srebra i złota o takich samych rozmiarach i w tych samych stężeniach [Kourmouli i in. 2018]. Z dwóch badanych nanomateriałów jedynie

AgNPs wykazywały właściwości antybakteryjne. Nanosrebro jest bardziej reaktywne chemicznie niż nanosrebro, dlatego ulega ono utlenieniu w roztworach wodnych, uwalniając jony srebrne. Natomiast w przypadku nanocząstek złota proces ten jest ograniczony. Dane literaturowe wskazują, że AuNPs wykazują właściwości przeciwrzybowe, natomiast ich aktywność względem bakterii jest mniej jednoznaczna [Zhang i in. 2015]. Generalnie uważa się, że AuNPs nie są bakteriobójcze lub wykazują słabe bakteriobójcze działanie po zastosowaniu w wysokich stężeniach. Istnieją jednak doniesienia, które przeczą tym poglądom. Wyniki badań, które potwierdzają ich właściwości bakteriobójcze interpretuje się w ten sposób, że jest to efekt działania substancji stanowiących zanieczyszczenia roztworów AuNPs (jony złota, środki do powlekania powierzchni i pozostałości innych reagentów). Tak więc, rozbieżności w ocenie działania przeciwbakteryjnego AuNPs mogą wynikać ze sposobu i warunków syntezy tych nanocząstek. Większość metod otrzymywania AuNPs obejmuje chemiczną redukcję soli Au (III) w roztworach wodnych, organicznych lub mieszanych w obecności reduktorów i stabilizatorów o właściwościach przeciwbakteryjnych. Otrzymany roztwór AuNPs jest najczęściej mieszaniną różnych reagentów, który jest używany w doświadczeniach biologicznych bez właściwego oczyszczenia. Resztkowe jony Au⁺³ mogą powodować fałszywie dodatnie wyniki testu antybakteryjnego [Zhang i in. 2015].

Tabela 10. Toksyczność formy jonowej i nanocząstek srebra lub nanotlenku cynku dla mikroorganizmów

Mikroorganizm	Nanocząstki	MIC nanocząstek	Forma jonowa	MIC formy jonowej	Źródło
<i>P. putida</i>	AgNPs	3,25 mM	AgNO ₃	1,75 mM	Hachicho i in. 2014
<i>E. coli</i>	AgNPs	320 mikroM	AgNO ₃	80 mikroM	Bondarenko i in. 2018
<i>P. aeruginosa</i>	AgNPs	40 mikroM	AgNO ₃	10 mikroM	
<i>E. coli</i>	ZnONPs	1,2 mg/g	glukonian cynku	1,7 mg/g	Pasquet i in 2014
<i>P. aeruginosa</i>	ZnONPs	23 mg/g	glukonian cynku	33,6 mg/g	

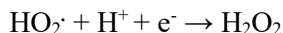
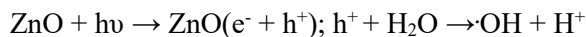
Jony metali ze względu na obecność ładunku cechuje wysokie powinowactwo do grup funkcyjnych, zwłaszcza fosforanowych, imidazolowych, sulfhydrylowych oraz karboksylowych, przez co mogą skutecznie inaktywować różne typy cząsteczek występujących w komórkach. Prowadzi to do hamowania aktywności enzymów, zaburzenia procesów fizjologicznych, w tym rozmnażania i ostatecznie może prowadzić do śmierci komórek drobnoustrojów [Mocek-Płóćiniak 2011]. Przeciwdrobnoustrojowe działanie np. jonów srebra wynika z ich dużego powinowactwa do związków zawierających siarkę, dlatego reagują

one z białkami zawierającymi grupy tiolowe znajdującymi się na powierzchni komórki i powodują uszkodzenia struktur powierzchniowych komórek bakterii. Mogą one także zakłócać funkcjonowanie enzymów łańcucha oddechowego bakterii [McQuillan i Shaw 2014]. Jony srebra mogą także po wnikięciu do cytoplazmy uszkadzać chromosom bakteryjny, poprzez zmiany w strukturze DNA. Ich obecność prowadzi do przekształcenia rozluźnionej struktury cząsteczki DNA w formę skondensowaną, co uniemożliwia jej replikację i jest przyczyną śmierci komórki [Rai i in. 2003].

3.5. Mechanizm przeciwdrobnoustrojowy nanometali związany z generowaniem wolnych rodników

Nanocząstki metali w roztworach wodnych mogą utleniać się i uwalniać jony metali. Pojawienie się jonów zwłaszcza metali grup przejściowych w układach biologicznych może nasilać generowanie RFT. Ale nie jest to jedyne źródło tych wysoce reaktywnych cząsteczek, gdyż mogą one powstawać także bezpośrednio na powierzchni nanocząstek. Dlatego parametry fizykochemiczne nanocząstek, takie jak rozmiar, struktura chemiczna, pole powierzchni i ładunek to czynniki, które determinują cechy ilościowe i jakościowe powstających RFT [Canaparo i in. 2020]. Wolne rodniki tlenowe, będące głównymi RFT powstają na powierzchni nanocząstek na skutek oddziaływania z utleniaczami obecnymi w środowisku reakcji, ponadto ich właściwości elektrochemiczne sprzyjają tworzeniu grup reaktywnych. W tych miejscach donory lub akceptory elektronów oddziałują z tlenem cząsteczkowym, tworząc anion nadadtlenkowy (O_2^-), który z kolei może generować dodatkowe RFT. Na przykład nanocząstki SiO_2 NPs i ZnONPs o identycznej wielkości i kształcie dają zróżnicowaną odpowiedź cytotoksyczną ze względu na swoje właściwości powierzchniowe. ZnONPs, będąc bardziej aktywny chemicznie niż SiO_2 NPs, wytwarza więcej anionorodników nadadtlenkowych powodujących stres oksydacyjny [Canaparo i in. 2020]. Uwalnianie jonów i generowanie wolnych rodników jest głównym mechanizmem przypisywanym toksyczności nanocząstek metali, zwłaszcza żelaza i miedzi [Majumdar i in. 2019]. Adsorpcja cząsteczek tlenu, ozonu, tlenku azotu na powierzchni NPs zwiększa wytwarzanie wolnych rodników tlenowych [Abdal-Dayem i in. 2017]. Nanocząstki reagują z rozpuszczonym tlenem w roztworach wodnych (w buforze wodnym lub pożywkach mikrobiologicznych) i wytwarzają anionorodnik nadadtlenkowy [Majumdar i in. 2019]. Anionorodnik nadadtlenkowy jest pierwszym produktem jednoelektronowej redukcji tlenu, jego wytworzenie powoduje pojawienie się produktów pośrednich o większej reaktywności: nadtlenku wodoru i ewentualnie rodnika hydroksylowego. Nanocząstki metali generują RFT poprzez reakcje Habera-Weissa i Fentona [Padmavathy i Vijayaraghavan 2008]. Wytwarzanie RFT może zachodzić też pod wpływem promieniowania świetlnego. Pochłonięcie kwantu energii świetlnej wzbudza elektrony (e^-) w paśmie walencyjnym, które przechodzą na powłoki wzbudzenia, w wyni-

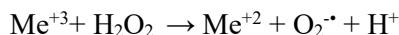
ku czego powstaje „dziura elektronowa” w paśmie walencyjnym (h^+). Powstawanie na powierzchni nanomateriału katalitycznych centrów sprzyja reakcji z wodą i wytwarzaniu rodnika hydroksylowego ($\cdot\text{OH}$) [Wang i in. 2017]. Przykładowy mechanizm generowania wolnych rodników z ZnONP przedstawiają reakcje:



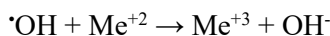
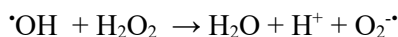
Potwierdzono doświadczalnie, że powierzchnia nanocząstek $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ o średnicy 20–40 nm pośredniczy w wytwarzaniu wysoce reaktywnych rodników hydroksylowych ($\cdot\text{OH}$). Wytwarzanie wolnych rodników jest głównie wynikiem reakcji zachodzących na powierzchni nanocząstek, a w mniejszym stopniu jest powodowane przez rozpuszczone jony metali uwalniane z nanocząstek. Stwierdzono, że centra katalityczne na powierzchni nanocząstek są co najmniej 50 razy skuteczniejsze w produkcji rodników $\cdot\text{OH}$ niż rozpuszczone jony Fe^{3+} [Voinov i in. 2011]. Pojawienie się w roztworze jednej formy RFT generuje inne typy wolnych rodników. Reakcje nadtlenu wodoru z jonami metali grup przejściowych mogą prowadzić do powstania rodnika hydroksylowego. W reakcjach Fentona jon metalu przejściowego reaguje z H_2O_2 , dając $\cdot\text{OH}$ i utleniony jon metalu. Dodatkowo redukcja H_2O_2 jonami Fe^{2+} również kończy się utworzeniem $\cdot\text{OH}$, który jest niezwykle reaktywny i toksyczny dla układów biologicznych. Mieszanina soli żelaza i nadtlenu wodoru może wywołać całą serię przemian wolnorodnikowych [Chaudhary i in. 2019]. Ten łańcuch reakcji jest inicjowany przez reakcję Fentona:



Śladowe ilości Me^{+3} mogą dalej reagować z nadtlakiem wodoru:



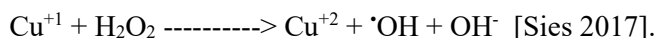
a także możliwe są inne reakcje:



Wiele metali może katalizować powyższe reakcje, jeśli ich jony mogą występować na różnych stopniach utlenienia, a przejścia pomiędzy stanami utlenienia są reakcjami jednoelektronowymi. Zhang i in. [2013] zbadali mechanizm

wytwarzania RFT przez nanocząstki: srebra, złota, niklu i krzemu w roztworach wodnych poddanych promieniowaniu UV o długości fali $\lambda = 365$ nm. Stwierdzono, że AgNPs generowały rodniki nadadtlenkowe i hydroksylowe, podczas gdy pozostałe AuNPs, NiNPs i SiNPs generowały tylko tlen singletowy. Podczas tworzenia reaktywnych form tlenu z CuNPs miedź ze stanu Cu^0 najpierw utlenia się do jonu Cu^{+1} , jony te mogą uczestniczyć w reakcji Fentona i reakcji Habera-Weissa poprzez reakcję z wytworzonym powyżej RFT z elektronów powierzchniowych i w trakcie samego procesu ulegają utlenieniu do Cu^{+2} .

W reakcji Cu^{+1} z H_2O_2 powstają rodniki hydroksylowe ze znacznie większą szybkością niż z jonami żelaza:



Nanocząstki metali pośredniczą w wytwarzaniu wolnych rodników zarówno zewnątrzkomórkowo, jak i wewnątrz komórek mikroorganizmów i w obu wypadkach toksyczne efekty mogą być związane z uszkodzeniami oksydacyjnymi powodowanymi obecnością wolnych rodników. Zewnątrzkomórkowe wytwarzanie wolnych rodników badano w wodnym roztworze CuNPs o wielkości cząstek 18 nm, 24 nm, 28 nm i 33 nm. Stężenie anionorodnika nadadtlenkowego mierzono za pomocą błękitu nitrotetrazoliowego (NBT), zaś rodnika hydroksylowego przy użyciu kwasu tereftalowego [Majumdar i in. 2019]. NBT to sól tetrazoliowa, która ulega degradacji w obecności anionorodnika nadadtlenkowego, co można rejestrować spektrofotometrycznie przy długości fali 259 nm. Niefluorescencyjny kwas tereftalowy po przereagowaniu z rodnikiem hydroksylowym tworzy fluorescencyjną pochodną, mono-hydroksytereftalan. Stwierdzono, że w obecności CuNPs w roztworze wodnym o pH 7,4 powstaje anionorodnik nadadtlenkowy. Nanocząstki miedzi o rozmiarach w zakresie 18–28 nm generowały największe ilości tego rodnika, ich ilość wzrastała proporcjonalnie do czasu reakcji. W tych warunkach potwierdzono także obecność rodnika hydroksylowego. Większe nanocząstki miedzi, o średnicy 33 nm generowały najmniejsze ilości tych rodników [Majumdar i in. 2019]. Powstawanie RFT w komórkach *E. coli* inkubowanych z CuNPs było zależne od stężenia nanocząstek. Już po godzinnej inkubacji poziom RFT w komórkach inkubowanych z CuNPs o stężeniu 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i 7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ był odpowiednio prawie 1,8 i 2,5 razy wyższy w porównaniu z kontrolą. Zjawisku temu towarzyszył wzrost stężenia utlenionych białek w komórce, odpowiednio 25 i 50 razy oraz znaczne obniżenie potencjału transbłonowego [Chatterjee i in. 2014].

Inne badania również potwierdziły możliwość wytwarzania anionorodnika nadadtlenkowego na powierzchni nanocząstek. Zjawisko to obserwowano w roztworach CaONPs i MgONPs i było zależne od pH środowiska. W wyniku działania nanocząstek MgONPs odnotowano uszkodzenie błony cytoplazmatycznej, co prowadziło do wycieku składników cytosolu i było przyczyną śmierci komórek bakteryjnych [Jin i in. 2011]. Jednak inni autorzy na podstawie bardziej czułych metod polegających na analizie widm rezonansu spinowego elektronów (ESR) doszli do wniosku, że toksyczność MgONPs nie ma podłoża wol-

norodnikowego. Nie stwierdzono znaczącego wytwarzania jonów ponadtlenkowych zarówno w próbach z komórkami bakterii, jak i w samych roztworach nanocząstek [Leung i in. 2014]. Mimo to nanocząstki MgONPs wykazywały silną aktywność przeciwbakteryjną względem *E. coli* i *B. atrophaeus*. Dodatkowo ekspozycja na jony magnezu lub wysokie pH nie spowodowała wzrostu śmiertelności tych bakterii. Autorzy ci sugerują, że głównym mechanizmem przeciwbakteryjnej aktywności tych nanocząstek są uszkodzenia błony cytoplazmatycznej przez nanocząstki. Za pomocą skaningowej mikroskopii elektronicznej (SEM) u obu badanych bakterii w obecności MgONPs obserwowano perforacje ścian komórkowych. Jednocześnie nie uzyskano przekonujących dowodów świadczących o peroksydacji lipidów, będącymi markerami uszkodzeń oksydacyjnych błon [Leung i in. 2014]. Analiza proteomiczna nie potwierdziła zwiększonej ilości białek związanych z utrzymaniem homeostazy redoks. Nie stwierdzono również zwiększonej ekspresji genów związanych z systemem obrony antyoksydacyjnej. Dane te wskazują, że w obecności MgONPs, RFT nie były wcale generowane lub też powstawały w niewielkich, fizjologicznych stężeniach.

Badania zespołu Cui i in [2012] nad mechanizmem warunkującym właściwości bakteriobójcze AuNPs także nie potwierdziły udziału RFT w tym procesie. Główną przyczyną śmierci komórek bakterii *E. coli* w tym przypadku była asocjacja nanocząstek do błony cytoplazmatycznej i zaburzenie jej potencjału błonowego, co obniżało syntezę ATP oraz hamowało biosyntezę białek poprzez inhibicję wiązania aminoacylo-tRNA z rybosomami [Cui i in. 2012].

Jak wynika z przytoczonych przykładów, tworzenie wolnych rodników związane z aktywnością nanocząstek nie zawsze zachodzi, chociaż ogromna liczba badań potwierdza ich udział w mechanizmach toksyczności nanomateriałów. Niektóre czynniki promują powstawanie wolnych rodników z nanocząstek metali, można do nich zaliczyć np. promieniowanie elektromagnetyczne o różnej długości fali/częstotliwości. Elektrony na powierzchni nanocząstek mogą ulegać wzbudzeniu w wyniku absorpcji promieniowania elektromagnetycznego z szerokiego zakresu widma. Do fotoaktywnych nanocząstek zalicza się między innymi TiO₂NPs, ZnONPs, Fe₂O₃NPs. Nano-TiO₂ jest najczęściej stosowany w różnych mediach jako fotokatalizator. Utlenianie fotokatalityczne następuje, gdy nanocząstki wymienionych metali zostaną napromieniowane światłem UV o długości fali $\lambda < 385$ nm w środowisku wodnym. Tworzy się wówczas rodnik hydroksylowy, silnie toksyczny dla mikroorganizmów i bardzo reaktywny w stosunku do substancji organicznej [Rincon i in. 2001]. Według Khan i in. [2017] nanocząstki złota poddane naświetlaniu światłem halogenowym o długości fali 400–500 nm mają zdolność wytwarzania różnych RFT, takich jak rodniki ponadtlenkowe, nadtlenek wodoru i rodniki hydroksylowe, które są odpowiedzialne za hamowanie biosyntezy białka i replikacji w komórkach *E. coli*. Autorzy ci zbadali wewnątrzkomórkowe wytwarzanie RFT za pomocą 2,7-dichlorodihydrofluoresceinodiocjanu (DCFH-DA). Zaobserwowali oni emisję zielonej fluorescencji tylko w próbkach traktowanych AuNPs, co wskazuje na tworzenie RFT w tych warunkach. Powstawanie RFT w naświetlanych roztworach AuNPs

zwiększało także ich siłę biobójczego działania w stosunku do *E. coli*. Średnica strefy zahamowania wzrostu tych bakterii indukowana naświetlanym roztworem AuNPs była większa ($19 \pm 0,5$ mm) niż w przypadku nienaświetlanego roztworu tych nanocząstek ($14 \pm 0,4$ mm) [Khan i in. 2017]. Podobnie, nanocząstki tlenku cynku z powłoką AuNPs charakteryzują się zwiększoną pod wpływem naświetlania lampą ksenonową (emitująca promieniowanie z zakresu UV/VIS) produkcją RFT (rodników hydroksylowych, tlenu singletowego, anionorodnika ponadtlenkowego) oraz aktywnością fotokatalityczną i przeciwdrobnoustrojową [He i in. 2014b].

Zhang i in. [2013] sugerują, że RFT utrzymują się w środowisku wystarczająco długo, aby dyfundować do komórek bakteryjnych i niszczyć ich wewnętrzne struktury, zwłaszcza nadtlenek wodoru i rodniki hydroksylowe mogą łatwo przechodzić przez błony cytoplazmatyczne. Współczynnik dyfuzji dla tlenu singletowego jest taki sam jak tlenu cząsteczkowego, czyli $\sim 10^5$ cm²/s. W układach biologicznych droga dyfuzji tlenu singletowego może wynosić od 10 nm do 50 nm, a średni czas trwania RFT to 10^{-5} – 10^{-6} s. Biorąc pod uwagę grubość ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej *E. coli*, prawdopodobne jest, że tlen singletowy może pokonać te bariery i wnikać do wnętrza komórek bakterii. Dlatego też aktywność przeciwdrobnoustrojowa nanocząstek metali wynika z wewnątrzkomórkowych reakcji RFT z cząsteczkami napotkanymi w swoim otoczeniu. Wolne rodniki mogą reagować ze wszystkimi typami cząsteczek występujących w komórce, co może prowadzić do peroksydacji lipidów, oksydacyjnych modyfikacji białek, cukrów i zmian w DNA. Nadtlenek wodoru swobodnie przechodzi przez błony i ściany komórkowe i jeżeli nie zostanie usunięty enzymatycznie, może dyfundować i reagować z jonami metali grup przejściowych, co znowu prowadzi do wytworzenia bardzo reaktywnej formy tlenu, jaką jest rodnik hydroksylowy. Rodnik hydroksylowy, w przeciwieństwie do H₂O₂ i O₂^{•-}, nie przemieszcza się w obrębie komórki. Jego reakcje są mało specyficzne, w miejscu, w którym powstaje, może reagować z różnymi cząsteczkami lub jonami, co powoduje rozległe uszkodzenia w komórce. Rodnik hydroksylowy ma silniejsze właściwości utleniające niż O₂^{•-} i może inicjować peroksydację lipidów [Sies 2017].

Produkty peroksydacji lipidów zmieniają właściwości błon cytoplazmatycznych, zwiększają ich przepuszczalność dla jonów i innych polarnych substancji, zmniejszają różnicę potencjałów elektrycznych po obydwu stronach dwuwarstwy lipidowej, obniżają aktywność niektórych enzymów błonowych i białek transportujących [Erdem i in. 2015]. Głównym miejscem działania RFT, indukowanym przez nanocząstki metali jest błona cytoplazmatyczna. W komórkach bakterii inkubowanych z TiO₂NPs stwierdzono powstawanie dialdehydu malonowego (ang. malondialdehyde, MDA), który jest głównym markerem procesu peroksydacji lipidów [Erdem i in. 2015]. Obecne w błonach komórek bakterii wielonienasycone fosfolipidy są utleniane przez RFT generowane przez nanocząstki TiO₂NPs do MDA. Autorzy podkreślają, że peroksydacja zachodzi zarówno w ciemności, jak i po naświetleniu nanocząstek TiO₂NPs światłem UV. Warunki świetlne zawsze skutkowały zwiększoną produkcją MDA. U *E. coli*

stwierdzono silniejsze zahamowanie wzrostu i większą produkcję MDA po inkubacji z TiO_2NP niż u *B. subtilis*. Peroksydacja lipidów zachodząca w błonie cytoplazmatycznej niszczy jej strukturę, zmniejsza intensywność procesów oddechowych i powoduje śmierć komórek [Erdem i in. 2015].

Po godzinnej ekspozycji komórek *E. coli* na CuNPs o stężeniach $\text{MIC} = 3,0 \mu\text{g/ml}$ i $\text{MBC} = 7,5 \mu\text{g/ml}$ poziom peroksydacji lipidów był odpowiednio około 35 i 50 razy większy niż w komórkach kontrolnych. Sól miedzi ($7,5 \mu\text{g/ml}$ CuCl_2) spowodowała jedynie ośmiokrotny wzrost poziomu peroksydacji lipidów, co sugeruje, że w tym przypadku głównym źródłem wolnych rodników są nanocząstki [Chatterjee i in. 2014]. Duża ilość produktów utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach *E. coli* wskazuje na potencjał bakterio-bójczy badanych nanocząstek. Nienasycone kwasy tłuszczowe są istotnym i niezastąpionym komponentem błony, zmiany w ich składzie powodują utratę właściwości fizycznych dwuwarstwy lipidowej, wpływają na płynność błony, a tym samym hamują aktywność integralnych białek błonowych.

Poziom RFT w komórce można kontrolować za pomocą przeciwutleniaczy, takich jak między innymi: glutation (GSH), kwas askorbinowy, witamina E i aktywności enzymów takich jak: katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPX) i dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) [Canaparo i in. 2020]. Ich znaczenie w mechanizmach obronnych przed skutkami działania nanocząstek demonstrują podane niżej przykłady. Nano CuO był bardziej toksyczny dla *E. coli* z niedoborem dysmutazy ponadtlenkowej niż dla bakterii typu dzikiego, co wskazuje, że aktywność tego enzymu jest ważnym elementem w systemie obrony przed szkodliwymi skutkami działania tych nanocząstek i jednocześnie potwierdza pozycję anionorodnika ponadtlenkowego w mechanizmie toksyczności tego nanomateriału [Ivask i in. 2014]. Badania Nagy i in. [2011] wskazują, że bakterio-bójczy mechanizm działania nanocząstek AgNPs jest związany z wyczerpaniem zdolności antyoksydacyjnych komórek *E. coli*, natomiast anionorodnik ponadtlenkowy nie jest dominującym czynnikiem odpowiedzialnym za obserwowane szkodliwe efekty ich działania. Po inkubacji komórek *E. coli* z AgNPs wzrasta poziom ekspresji genów dla glutaredoksyny i tioredoksyny, natomiast zmniejsza się ekspresja genu kodującego dysmutazę ponadtlenkową (około trzykrotnie). Glutaredoksyny i tioredoksyny to enzymy pełniące ważną rolę w utrzymaniu homeostazy redoks, poprzez regenerację utlenionych grup tiolowych w białkach. W tym przypadku obserwowano także wzrost ekspresji genów zaangażowanych w homeostazę metali, np. genu kodującego ferrochelatazę, białko wiążące Fe^{2+} oraz genów kodujących białka uczestniczące w wewnątrzkomórkowym transporcie i w usuwaniu metali. Zmianę profilu ekspresji genów autorzy tłumaczą jako przejaw uruchomienia mechanizmów obronnych przed RFT. W ten sposób zmniejsza się dostępna dla reakcji Fentona pula wewnątrzkomórkowego żelaza oraz innych metali przejściowych, które mogą katalizować reakcje prowadzące do powstania RFT [Nagy i in. 2011].

U *P. aeruginosa* stwierdzono wysoką ekspresję genów: *SOD* (kodującego dysmutazę ponadtlenkową), *CAT* (kodującego katalazę), *AhpD*, *AhpC* i *AhpF* (kodujących reduktazy wodoronadtlenku alkilu) oraz genu kodującego peroksy-

dadzę cytochromu c551 pod wpływem inkubacji z AgNPs. Stwierdzono też, że aktywność enzymów antyoksydacyjnych katalazy i peroksydazy cytochromu c551 stopniowo obniżała się wraz z czasem działania AgNPs, zaś aktywność dysmutazy ponadtlenkowej utrzymywała się na poziomie wyższym niż w kontroli [Liao i in. 2019]. Po 48 h ekspozycji *Phanerochaete chrysosporium* na AgNPs obserwowano zwiększenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy [Huang i in. 2018]. Nanocząstki metali oddziaływające poprzez generowanie wolnych rodników, pośrednio wpływają na transkrypcję genów zaangażowanych w ochronę komórkową przed RFT. W komórkach *Pseudomonas* sp. inkubowanych z AgNPs stwierdzono zwiększoną ekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, które chronią komórkę przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Nanocząstki srebra w stężeniu subletalnym (0,1 µmg/l) zwiększały stężenie białek stresu takich jak: reduktaza wodoronadtlenku alkilu i przeciwutleniaczy specyficznych dla grup tiolowych [Soni i in. 2014]. Wynik tego eksperymentu wspiera tezę, że nanocząstki AgNPs indukują w komórkach stres oksydacyjny, a wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych zapobiega uszkodzeniom powodowanym przez RFT.

W przypadku *E. coli* eksponowanych na TiO₂NPs zaobserwowano zwiększenie aktywności enzymów zaangażowanych w metabolizm nadtlenu [Gou i in. 2010]. Innym genem, który ulega ekspresji pod wpływem nadtlenu wodoru jest katalaza. Mutanty *E. coli* pozbawione genu dla katalazy mają fenotyp wrażliwy na AgNPs [Ivask i in. 2014]. Gen regulatorowy *oxyR* pośredniczy w syntezie białek indukowanych przez nadtlenek wodoru, w tym katalazy, reduktazy glutationowej i reduktazy wodoronadtlenku alkilu. Produkt tego genu, białko OxyR jest homologiczne do rodziny bakteryjnych białek regulatorowych LysR-NodD i wiąże się z promotorami genów regulowanych przez *oxyR*. Utleniona forma białka OxyR aktywuje transkrypcję genów regulowanych przez *oxyR*. Stwierdzono zwiększoną ekspresję tego genu w odpowiedzi komórek *E. coli* na ekspozycję na AgNPs [Gou i in. 2010]. W obecności MeNPs odnotowano także zwiększoną ekspresję genów *SOD*. Enzymy dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza biorą udział w usuwaniu RFT, przekształcając odpowiednio anionorodnik ponadtlenkowy do nadtlenu wodoru, a nadtlenek wodoru do tlenu cząsteczkowego. Po 90-minutowej ekspozycji na nanocząstki poziom ekspresji tych genów zaczął się obniżać, co mogło być spowodowane nasileniem uszkodzeń oksydacyjnych uniemożliwiających regulację tego procesu.

Egzogenne przeciwutleniacze mogą zmniejszać wewnątrzkomórkowe stężenie RFT i tym samym obniżać toksyczność nanocząstek metali. Dodatek antyoksydantów, takich jak glutation czy kwas askorbinowy, zmniejszał toksyczność AgNPs względem *P. aeruginosa*, co dodatkowo potwierdza, że RFT odgrywają ważną rolę w mechanizmach toksyczności nanocząstek [Liao i in. 2019]. GSH (zredukowany glutation), reagując z RFT, „wygasa” je, czyli obniża ich stężenia oraz regeneruje oksydacyjnie uszkodzone białka, głównie poprzez redukcję utlenionych grup sulfhydrylowych białek. Przyczynia się zatem do ochrony błony cytoplazmatycznej bakterii. U grzybów *Phanerochaete chrysosporium* inkubowanych z AgNPs stężenie RFT było silnie skorelowane ze stężeniem GSSG

(utlenionej formy glutationu), co potwierdza rolę GSH jako wewnątrzkomórkowego buforu redox [Huang i in. 2018]. W komórkach drożdży *C. albicans* również odnotowano zależny od stężenia AgNPs wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu RFT. W próbach, w których stosowano razem z nanocząstkami srebra kwas askorbinowy, poziom RFT zmniejszył się, a śmiertelność komórek była niższa niż w próbie zawierającej tylko AgNPs. Mimo zastosowania antyoksydantu nie uzyskano całkowitego przywrócenia żywotności tych komórek [Radhakrishnan i in. 2018]. Działanie AgNPs na komórkę jest zatem wielokierunkowe, a generowanie RFT to tylko jeden z wielu mechanizmów toksyczności. Autorzy opisali zmiany zawartości ergosterolu i płynności błon w komórkach tych grzybów, potwierdzając tym samym plejotropowe efekty działania tych nanocząstek.

Oprócz enzymów, które chronią przed powstaniem RFT oraz eliminują ich pierwotne i/lub wtórne formy, ważną rolę w mechanizmach toksyczności nanocząstek mogą odgrywać enzymy usuwające produkty ich aktywności, czyli oksydacyjnie zmodyfikowane biomolekuły. Tezę tę wspierają doświadczenia Radzig i in. [2013], w których odnotowano, że szczepy *E. coli* z mutacjami w genach odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń oksydacyjnych DNA były bardziej wrażliwe na szkodliwe działanie nanocząstek srebra niż szczepy typu dzikiego.

Stopień utlenienia metalu w nanocząstkach może także wpływać na ich skuteczność przeciwbakteryjną. Porównując oddziaływanie dwóch typów nanocząstek tlenków miedzi: Cu₂ONPs i CuONPs na komórki *E. coli*, stwierdzono, że Cu₂ONPs wykazywały wyższą aktywność przeciwbakteryjną niż CuONPs. Forma chemiczna metalu determinowała też główny mechanizm ich toksyczności. W przypadku CuONPs były to reakcje wolnorodnikowe, gdyż w komórkach narażonych na działanie CuONPs stwierdzono większe stężenie rodników hydroksylowych niż po aplikacji Cu₂ONPs, natomiast w przypadku Cu₂ONPs – denaturacja chemiczna białek tiolowych, gdyż w komórkach *E. coli* po aplikacji tych nanocząstek zidentyfikowano większe ilości wytrąconych kompleksów białek tiolowych z miedzią niż po zastosowaniu CuONPs [Meghana i in. 2015].

3.6. Mechanizmy przeciwdrobnoustrojowe nanocząstek metali związane z zaburzeniem procesów metabolicznych, ekspresji genów i biosyntezy białka w komórkach

3.6.1. Zmiany metabolizmu w komórkach mikroorganizmów pod wpływem nanocząstek

Nanocząstki metali mogą uszkadzać komórki mikroorganizmów za pomocą wielu mechanizmów, również poprzez rozregulowanie kluczowych dla przeżycia procesów metabolicznych. Su i in. [2015] zbadali wpływ CuONPs na proces denitryfikacji u *Paracoccus denitrificans*. Pod wpływem tych nanocząstek

stwierdzono hamowanie denitryfikacji. Wraz ze wzrostem stężenia CuONPs z 0,05 do 0,25 mg/L intensywność tego procesu zmniejszyła się z 98,3% do 62,1%. Badania nad morfologią komórek i integralnością błon cytoplazmatycznych potwierdziły obecność nanocząstek we wnętrzu komórek, co było skorelowane ze zmianami aktywności wielu białek zaangażowanych w metabolizm azotu. W toku tych badań stwierdzono hamowanie aktywności białka GtsB (odpowiedzialnego za transport glukozy), co zmniejszało produkcję NADH (donora elektronów do denitryfikacji). Ekspresja genów, kodujących kluczowe białka przenoszące elektrony (w tym dehydrogenazy NADH i cytochromu) w tych warunkach była również niższa. Ponadto nanocząstki znacząco hamowały ekspresję genów dla reduktazy azotanowej i azotynowej oraz katalityczną aktywność tych enzymów. Zmiany profilu ekspresji genów oraz aktywności białek związanych z oddychaniem komórkowym ograniczały transport elektronów w błonowym łańcuchu prznoszenia elektronów i ostatecznie obniżały poziom redukcji azotanów. Dodatkowo nanocząstki tlenku miedzi ograniczały pobieranie żelaza, co niekorzystnie wpływało na biosyntezę i funkcję białek zawierających ten pierwiastek. Hamowanie denitryfikacji u *P. denitrificans* wydaje się zatem być sumarycznym efektem zmian na poziomie genetycznym i biochemicznym indukowanych przez nanocząstki miedzi.

Innym możliwym mechanizmem działania przeciwbakteryjnego nanocząstek jest wiązanie fosforanu dostępnego dla mikroorganizmów. Nanocząstki tlenku lantanu (La₂O₃NPs) wykorzystano do usuwania fosforanu z pożywek hodowlanych drobnoustrojów w celu zastosowania ukierunkowanego głodzenia jako strategii przeciwdrobnoustrojowej. Tylko w środowiskach ubogich w fosforan zaobserwowano efekt toksyczny tych nanocząstek wobec *E. coli*, *S. carnosus*, *P. roqueforti* i *Chlorella vulgaris* [Gerber i in. 2012]. Badania Leung i in. [2014] potwierdziły znacznie tego zjawiska także w toksyczności MgONPs względem *E. coli* oraz rzuciły światło na szczegóły tego oddziaływania. Dodatek fosforanów do pożywek nie zmieniał znacząco toksyczności MgONPs, ale zmniejszał liczbę białek rybosomalnych, co skutkowało obniżeniem poziomu translacji i w sumie hamowało aktywność metaboliczną tych komórek.

Na dysfunkcje rybosomów, jako jedną z przyczyn toksycznego działania nanocząstek, zwrócił uwagę zespół Cui i in. [2012]. Badacze ci odkryli, że u *E. coli* nanocząstki AuNPs modyfikują białka dużej podjednostki rybosomalnej, co uniemożliwia przyłączenie aminoacylo-tRNA. W obecności tych nanocząstek obserwowali także obniżenie potencjału błonowego, zmniejszenie aktywności syntazy ATP i spadek poziomu ATP. Uszkodzenie rybosomów prowadzi do zahamowania biosyntezy różnych białek, również zaangażowanych w procesy oddechowe, takich jak np. syntetaza burszyny-CoA, kluczowego enzymu cyklu Krebsa, niezbędnego dla produkcji ATP [Yamanaka i in. 2005]. Ze względu na lokalizację enzymów oddechowych w obrębie błony cytoplazmatycznej bakterii, obserwowane po działaniu nanocząstek zaburzenia funkcji błony wiążą się ze zmniejszeniem podaży ATP. Tezę tę potwierdzają obserwacje

Lok i in. [2006], którzy odnotowali obniżenie poziomu ATP w komórkach *E. coli* po ekspozycji na AgNPs, chociaż nie wykryto wycieku metabolitów z komórek do pożywki. Z kolei Zhao i in. [2010] zaobserwowali hamowanie biosyntezy białka, uszkodzenie błony cytoplazmatycznej oraz wyciek DNA po ekspozycji wieloopornych szczepów *E. coli* i *P. fluorescens* (ang. multi-drug-resistance, MDR) na funkcjonalizowane pirymidyną nanocząstki złota [Zhao i in. 2010]. Zsyntetyzowane przez nich nanocząstki wykazywały zdolność do helatowania jonów magnezu i wapnia, co w warunkach tego doświadczenia mogło być przyczyną destabilizacji rybosomów oraz błony cytoplazmatycznej.

W toksyczności nanocząstek srebra hamowanie funkcji aparatu translacyjnego jest jednym z postulowanych mechanizmów ich działania. Badania zespołu Lara i in. [2010] udowodniły, że hamowanie syntezy białka pod wpływem tych nanocząstek zachodzi za pośrednictwem modyfikacji podjednostek rybosomalnych 30S. Podobnie Yamanaka i in. [2005] badając bakteriobójcze działanie Ag w stosunku do *E. coli*, stwierdzili uszkodzenia rybosomów. Jony srebra hamowały ekspresję genu kodującego białko S2 podjednostki rybosomalnej 30S. Obniżenie poziomu ekspresji tego genu uniemożliwiało syntezę białek, co było przyczyną deregulacji metabolizmu i ostatecznie śmierci tych komórek [Aseev i in. 2008].

Nanocząstki metali mogą wpływać także na cykl komórkowy mikroorganizmów. Bakterie domeny *Bacteria* oraz archeony dzielą się przez podział komórkowy, który jest poprzedzony replikacją DNA. Oba procesy: replikacja i podział komórki są kontrolowane zarówno przez czynniki genetyczne, jak i środowiskowe takie jak np. dostępność pokarmu w środowisku. Precyzyjna regulacja tych procesów ma fundamentalny wpływ na utrzymanie stabilności materiału genetycznego w komórkach potomnych. Zahamowanie lub zaburzenie procesu replikacji lub zahamowanie podziału komórki jest zwykle dla bakterii letalne. Badania zespołu Li i in. [2013] potwierdziły możliwość interakcji dodatnio naładowanych nanocząstek, takich jak: Qd, AgNPs, $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$, AuNPs, CeO_2NPs , ZnONPs i mikrosfer (mikrocząstek) lateksowych z DNA. W przeciwieństwie do swoich odpowiedników o ujemnym ładunku powierzchniowym, zastosowane w niewielkich stężeniach (0,05–0,5 nM) całkowicie hamowały replikację DNA. Autorzy zaproponowali model oddziaływania nanocząstek z DNA, w myśl którego ich powinowactwo do DNA zależy od wartości bariery energetycznej między nimi, im jest ona mniejsza, tym silniejsze jest ich wzajemne oddziaływanie. Znając ładunek powierzchniowy nanocząstek oraz ich wielkość, można wnioskować o ich sile oddziaływania z DNA a tym samym określić ich potencjalną genotoksyczność. Analogiczne badania przeprowadzone w systemach komórkowych potwierdziły, że nanocząstki są zdolne do oddziaływania z DNA. W komórkach *E. coli* eksponowanych na CuNPs stwierdzono degradację genomowego DNA już po półgodzinnej inkubacji ze stężeniem nanocząstek odpowiadającym MBC, a wraz z wydłużeniem czasu inkubacji obserwowano nasilenie tego procesu [Chatterjee i in. 2014].

Nanocząstki miedzi CuNPs o wielkości 5–10 nm zastosowane w niewielkim stężeniu wykazywały silne, bakteriobójcze działanie w stosunku do bakterii *E. coli*. Efekt toksyczny w tym przypadku spowodowany był głównie ich oddziaływaniem z białkami FtsZ i FtsI, co uniemożliwiało powstanie pierścienia Z, wyznaczającego płaszczyznę przyszłego podziału komórkowego. Oprócz tego stwierdzono w tych warunkach zwiększone wytwarzanie RFT i uszkodzenia DNA [Kumar i in. 2020].

Niektóre nanocząstki metali mają także możliwość hamowania syntezy białek enzymatycznych lub ich aktywności. Cha i in. [2015], badając szczep *S. aureus* oporny na metycylinę, potwierdzili silne bakteriobójcze właściwości ZnONPs, a także wykazali, że te nanocząstki hamują aktywność β -galaktozydazy (GAL), reprezentatywnego enzymu zaangażowanego w metabolizm węglowodanów. Inhibicja GAL przez ZnONPs jest procesem odwracalnym i przebiega zgodnie z kinetyką Michaelisa-Mentena. Nanocząstki żelaza i miedzi wpływają na produkcję niektórych enzymów lignino- i celulolitycznych u nadrewnowego grzyba *Trametes versicolor*. Oba typy nanocząstek znacząco zmniejszyły aktywność β -glukozydazy, β -ksylozydazy i celobiohydrolazy, ale poziom aktywności peroksydazy manganowej był podobny jak w kontroli. Natomiast aktywność lakazy zmniejszała się tylko po inkubacji z nanocząstkami miedzi. Jako dodatkową kontrolę w tym doświadczeniu zastosowano pożywkę z jonami żelaza i miedzi. Zarówno formę jonową, jak i nanocząstki stosowano w stężeniach niewpływających na wzrost grzyba. Profil wytwarzanych enzymów różnił się, gdy porównano doświadczenia z użyciem formy jonowej metali i nanocząstek, co sugeruje odmienne mechanizmy działania obu form w komórkach tych grzybów [Shah i in. 2010].

Pod wpływem nanocząstek metali metabolizm i wytwarzanie toksyn u pleśni może ulec zmianie. Potwierdziły to badania nad wpływem AgNPs na różne szczepy *Aspergillus* i *P. chrysogenum*. Nanocząstki srebra zmniejszyły produkcję miktotoksyn u badanych szczepów *Aspergillus*. Największy spadek stężenia miktotoksyn w porównaniu z kontrolą odnotowano dla *A. westerdijkiae*, gdzie stężenie ochratoksyny A obniżyło się aż o 95,5%, również stężenie alfatoksyn (B,G) u *A. flavus* zmniejszyło się z 86 do 95%, zaś fumonizyny u *A. niger* o 81% [Pietrzak i in. 2015]. Inne badania pokazują, że nanocząstki srebra są w stanie hamować produkcję aflatoksyny B1 produkowanej przez *A. flavus* [Al-Othman i in. 2014]. Nanocząstki ZnNPs również wydajnie, bo od 20 do 100% zmniejszyły wytwarzanie miktotoksyn: fumonizyny B1, ochratoksyny A, aflatoksyny B1 i M1 u różnych szczepów *Aspergillus* [Hassan i in. 2013]. AgNPs hamują wytwarzanie kwasów organicznych u *A. niger* i *P. chrysogenum*, zmniejszając ich stężenia. Spadek produkcji kwasów organicznych zaznaczył się od 3 dnia inkubacji z nanocząstkami, proces ten w większym stopniu dotyczył *P. chrysogenum* niż *A. niger*. Najbardziej obniżyło się stężenie kwasu szczawowego i cytrynowego, a najmniej kwasu jabłkowego. Zaobserwowano również zwiększone wydzielanie enzymów, których skład był inny niż w kontroli [Pietrzak i in. 2015].

3.6.2. Wpływ nanocząstek metali na aktywność genów i syntezę białek w komórkach mikroorganizmów

Ekspozycja komórek mikroorganizmów na MeNPs powoduje zmiany w profilach genomowych i proteomicznych. Przypuszczalnie jest to jeden z mechanizmów adaptacji komórek do środowiska zawierającego NPs. W badaniach nad proteomem bakterii często wykorzystywana jest metoda elektroforezy dwukierunkowej (ang. two-dimensional electrophoresis, 2-DE). Rozdzielone elektroforetycznie białka są identyfikowane techniką MALDI TOF MS (ang. matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry). Pozwala to na określenie profilu białek i wskazanie wśród nich białka lub grupy białek uczestniczących w reakcji na stres indukowany obecnością nanocząstek.

Analiza proteomiczną komórek wielolekoopornego szczepu *P. aeruginosa* poddanego działaniu nanocząstek AgNPs wykazała, że w puli zidentyfikowanych białek, 170 miało podwyższoną syntezę i były to białka zaangażowane w procesy utrzymania homeostazy redoks, zaś 366 miało obniżoną syntezę i w tej grupie były białka zaangażowane w procesy metaboliczne, uczestniczące w utlenianiu kwasów tłuszczowych, fosforylacji, metabolizmie puryn i pirymidyn, białka rybosomalne, enzymy degradujące RNA i uczestniczące w replikacji DNA [Liao i in. 2019]. Analizy proteomiczne 2-DE wykazały, że krótka ekspozycja komórek *E. coli* na działanie AgNPs spowodowała nagromadzenie prekursorów białek otoczki (OmpA, OmpC, OmpF, OmpA, MetQ) i białek szoku cieplnego (IbpA, IbpB) oraz białek podjednostki rybosomalnej 30S [Lok i in. 2006].

Nanocząstki MgONPs zmieniały profil proteomiczny u *E. coli*. Stężenie wielu białek zaangażowanych w metabolizm podstawowy, w tym metabolizm aminokwasów, nukleotydów i węglowodanów, wytwarzanie ATP i transkrypcję uległo obniżeniu [Leung i in. 2014]. Spośród analizowanych 109 genów dla białek aż 83 miało niższą ekspresję, geny o podwyższonej ekspresji kodowały między innymi białko periplazmatyczne wiążące tiaminę i białka związane z metabolizmem ryboflawiny. W innym doświadczeniu potwierdzono zróżnicowaną ekspresję genów zależną od stężenia nanocząstek srebra w komórkach *E. coli*. Nanocząstki srebra w niższych stężeniach mają tendencję do wywołowania bardziej specyficznej odpowiedzi, podczas gdy przy wyższych stężeniach dominuje bardziej ogólna reakcja pokrywająca się z odpowiedzią na stres. Nanocząstki srebra powodowały wzrost ekspresji wielu genów, takich jak: kodujących białka związane z budową ścian komórkowych, tworzeniem biofilmu (*bolA*), uczestniczących w cyklu kwasu cytrynowego (*sdhC*), przenoszeniu elektronów (*sdhC*), transporcie komórkowym (*mdfA*), naprawie DNA (*recN*, *uvrA*, *ybfE*, *yebG*, *ssb*, *sbmC* i *nfo*) i tzw. białka wypływu (*fsr*, *yajR*, *emrE*). Dane dotyczące ekspresji genów umożliwiły identyfikację potencjalnych biomarkerów, które mogą być wykorzystane do detekcji toksyczności nanocząstek i opracowania bioczuJNIKÓW [Gou i in. 2010].

Nanocząstki zmieniały także profile ekspresji genów. Do badania różnic w ekspresji genów stosuje się technikę mikromacierzy DNA, która jak genetyczny skaner umożliwia w jednej procedurze diagnostycznej analizę całego materiału genetycznego. Interesujące doświadczenia przeprowadzone przez McQuillan i Shaw [2014] pokazują, że odpowiedź transkryptomu bakterii *E. coli* na AgNPs lub jony srebra jest zróżnicowana. W komórkach traktowanych nanocząstkami srebra stwierdzono specyficzną ekspresję 309 genów, zaś w przypadku jonów srebra było ich tylko 70. Zróżnicowana odpowiedź komórek potwierdza różne mechanizmy oddziaływania nanocząstek i jonów srebra na materiał genetyczny.

W komórkach *E. coli* inkubowanych z TiO₂NPs zidentyfikowano 152 geny na 1702, o odmiennym wzorze ekspresji. Wśród nich 68 genów było w tych warunkach aktywowanych, natomiast 84 geny były wyciszane. Nanocząstki TiO₂NPs regulowały pozytywnie, czyli aktywowały ekspresję genów kodujących białka odpowiedzialne za procesy związane z odpowiedzią na stres osmotyczny, metabolizmem składników ściany komórkowej (syntezą i degradacją polisacharydów, kwasów tłuszczowych/lipidów, peptydoglikanów, transporterów ABC), wchłanianiem związków egzogennych, systemem transdukcji sygnałów. Te ostatnie umożliwiają bakteriom wyczuwanie, reagowanie i dostosowywanie się do zmian w ich środowisku lub w statusie wewnątrzkomórkowym. Natomiast geny wyciszane można przyporządkować do następujących kategorii: kodujące białka odpowiedzialne za syntezę nukleoidów i replikację DNA, fałdowanie białek, homeostazę redoks i metabolizm energetyczny komórki [Sohm i in. 2015].

Profilowanie transkrypcyjne *E. coli* oparte na mikromacierzach po ekspozycji na nanocząstki tlenku ceru (CeO₂NPs) pokazało, że 144 geny miały inny poziom ekspresji niż kontrola. Gdy porównano komórki traktowane nanocząstkami i solą ceru, stwierdzono inny wzór ekspresji dla ośmiu genów (*rnt*, *thiS*, *cysW*, *yciW*, *cysI*, *ilvG*, *cysN*, *pyrB*). Większość z tych genów powiązanych jest z metabolizmem, wychwytem żelaza, oddychaniem i reakcją na stresy. Komórki potraktowane nanocząstkami tlenku ceru miały wyższy poziom transkryptów dla oksydazy cytochromowej (*cydAB*) i reduktazy azotynowej (*NirD*) niż komórki kontrolne, przy jednocześnie niskim poziomie ekspresji genów dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromu b [Pelletier i in. 2010].

4. Interakcja nanocząstek metali z mikroorganizmami glebowymi

Nanocząstki metali są atrakcyjnym materiałem dla wielu branż przemysłu, medycyny i rolnictwa. Światowy rynek nanokompozytów do 2021 r. osiągnie 733 220 t, wzrost od 2016 do 2021 r. wynosi ok. 18,9% [McWilliams, 2017]. Powszechność ich stosowania sprawia, że ich niekontrolowany wpływ na środowisko jest nieunikniony. Trudno jest oszacować stężenie nanocząstek w środowisku, gdyż brak jest metod, które pozwoliłyby odróżnić nanocząstki metali

od obecnych tam jonów metali. Modelowe badania sugerują, że spośród różnych elementów środowiska to głównie gleba i osady mogą absorbować i akumulować nanocząstki [Xu i in. 2015].

Nanocząstki gromadzą się w glebie w wyniku celowego zastosowania w technologii rekultywacji gleby i oczyszczania wody, jako nawozy i pestycydy lub w sposób niezamierzony na skutek przemieszczania się do gleby z powietrza czy wody [Chai i in. 2015]. Środowisko glebowe jest szczególnie narażone na działanie nanocząstek, gdyż gleba może je absorbować, co powoduje długoterminowe skutki i lokalne zwiększenie stężeń substancji toksycznych. Glebowe zbiorowiska drobnoustrojów są zarówno istotnymi, jak i wrażliwymi wskaźnikami zmian w środowisku glebowym [Holden i in. 2014]. Mikroorganizmy zasiedlające środowisko glebowe mają bezpośredni wpływ na jakość gleby, gdyż uczestniczą w procesach takich jak obieg biogenów, rozkład materii organicznej, relacje symbiotyczne z roślinami oraz są podstawą wielu wodnych i lądowych sieci pokarmowych. Jednym z zagrożeń ekologicznych jest ryzyko zubożenia bioróżnorodności lokalnych mikrobiomów i zakłócenie funkcjonowania innych elementów środowiska. Przedstawione w poprzednich rozdziałach tej monografii badania nad toksycznością NPs dla mikroorganizmów w większości prowadzone były dla czystych kultur, w stałych warunkach fizykochemicznych, a przejawem toksyczności najczęściej była śmierć komórek. W środowisku naturalnym nanocząstki mogą zostać przekształcone przez procesy biotyczne i abiotyczne w sposób, który może zmienić ich oddziaływanie na naturalne zespoły mikroorganizmów. Poza tym efekty, jakie one wywołują na zbiorowiska mikroorganizmów, mogą być inne w porównaniu z tymi obserwowanymi dla hodowli jednorodnych. Mikroorganizmy glebowe bezpośrednio wpływają na procesy glebowe, takie jak rozkład materii organicznej gleby i obieg składników pokarmowych, dlatego każdy czynnik, który wpływa na skład jakościowy i aktywność metaboliczną mikroorganizmów gleby, może zmienić jej żyzność i przydatność rolniczą. Zmiany w funkcjonowaniu społeczności mikroorganizmów glebowych można monitorować na wiele różnych sposobów, poprzez pomiar liczebności i biomasy mikroorganizmów, składu gatunkowego, aktywności enzymów. Jednak trudno jest ocenić wpływ nanocząstek metali na mikroorganizmy glebowe, gdyż w naturalnym środowisku współdziała wiele czynników decydujących o ich toksyczności: dawka i czas ekspozycji, zróżnicowanie gatunków mikroorganizmów, właściwości gleby (pH, Eh, zawartość materii organicznej gleby, zawartości wody, skład mineralny), warunki tlenowe, naświetlenie i inne. Autorzy wielu publikacji opisujących wpływ nanocząstek na zespoły mikroorganizmów w glebie podkreślają, że jak dotąd nie ma opracowanego standardu oceny potencjalnej toksyczności nanocząstek dla mikroorganizmów glebowych ze względu na czynniki środowiskowe i brak metod jednoznacznie identyfikujących nanocząstki w glebie. Jednak pojawia się wiele badań pokazujących zmiany aktywności mikroorganizmów glebowych pod wpływem nanocząstek (tabela 11). Często stosowanym kryterium tej oceny jest liczebność i skład ga-

tunkowy mikroorganizmów glebowych. Rousk i in. [2012] stwierdzili, że zastosowanie CuONPs spowodowało wyraźne zahamowanie wzrostu bakterii w glebie mineralnej. Wpływ CuONPs był mniej wyraźny w glebie organicznej, jednak najwyższe stężenie tych nanocząstek (200 mmol g^{-1}) też hamowało wzrost bakterii. Nanocząstki ZnONPs, podobnie jak w poprzednim doświadczeniu, skuteczniej ograniczały rozwój bakterii w glebie mineralnej, pomimo że w obu rodzajach gleb działały niekorzystnie na liczebność mikroorganizmów. ZnONPs w stężeniu 64 mmol g^{-1} gleby hamowały w 50% wzrost bakterii w glebie mineralnej, zaś w glebie organicznej ten sam efekt uzyskano dopiero przy stężeniu tych nanocząstek wynoszącym 185 mmol g^{-1} gleby. W tym przypadku głównym mechanizmem toksyczności nanocząstek było uwalnianie jonów metali, a nie ich bezpośrednie oddziaływanie na bakterie, dlatego też autorzy zaproponowali, aby toksyczność tych nanocząstek oceniać poprzez analizę ich biodostępności w skażonych glebach [Rousk i in. 2012].

Podobne doświadczenia przeprowadzono na glebie terenów podmokłych, spod upraw ryżu, które zostały zasilone nanocząstkami tlenku miedzi lub tlenku tytanu. Po 110 dniach od aplikacji tych nanocząstek oceniono ryzyko ekotoksykologiczne. Nanocząstki CuONPs powodowały zmniejszenie biomasy drobnoustrojów w glebie, ich wpływ był ściśle związany z dawką, czasem i parametrami środowiska glebowego [Xu i in. 2015]. Negatywny wpływ na drobnoustroje glebowe nanocząstek CuO był silniejszy niż TiO_2 , na co wskazuje zmniejszona zawartość węgla w biomase mikroorganizmów i całkowita zawartość fosfolipidów (ang. phospholipid fatty acid, PLFA) oraz niższa aktywność enzymatyczna gleby, w tym ureazy, fosfatazy i dehydrogenazy. Ge i in. [2012] podkreślają, że spośród zużywanych przez przemysł wielu różnych nanocząstek w środowisku akumulują się duże ilości TiO_2 NPs i ZnONPs. Po wprowadzeniu tych nanocząstek do gleby obserwowano wahania liczebności różnych drobnoustrojów w sposób zależny od dawki. Liczebność niektórych taksonów malała, były to bakterie związane z wiązaniem azotu: *Rhizobiales*, *Bradyrhizobiaceae* i *Bradyrhizobium* oraz utlenianiem metanu: *Methylobacteriaceae*. Zmniejszenie liczebności tych taksonów odgrywających ważną rolę w obiegu azotu i węgla może wpłynąć na procesy biogeochemiczne na poziomie ekosystemu. Wzrastała natomiast liczebność gatunków z taksonów *Sphingomonadaceae* zaangażowanych w rozkład opornych zanieczyszczeń organicznych oraz *Streptomycetaceae* i *Streptomyces* o dużym potencjale rozkładu białek. Oznaczono także obecność zewnątrzkomórkowych proteaz. Aktywność proteaz była znacznie podwyższona i dodatnio skorelowana z liczebnością *Streptomycetaceae*. Liczebność innych taksonów dobrze znanych z pozakomórkowej produkcji proteaz (tj. *Bacillus*, *Lactococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* i *Vibrio*) nie zwiększyła się po wprowadzeniu do gleby TiO_2 NPs i ZnONPs. Zmiany liczebności taksonów mogą mieć konsekwencje dla procesów degradacji białek w skali ekosystemu. Autorzy podkreślają, że nisza ekologiczna może zostać przejęta przez gatunki tolerancyjne, a zmiana składu zespołów mikroorganizmów może zachować się przez długi czas.

Tabela 11. Wpływ nanocząstek metali na mikroorganizmy glebowe

Nanocząstki	Wpływ na mikroorganizmy w glebie	Źródło
AgNPs	zahamowana mikoryza słonecznika	Dubchak i in. 2010
AgNPs	zmiany w ekspresji genów zaangażowanych w produkcję energii i procesy nityfikacji, hamowanie wzrostu bakterii <i>Nitrosomonas europaea</i>	Yuan i in. 2013
TiO ₂ NPs, ZnONPs	zmniejszenie liczebności bakterii wiążących azot (<i>Rhizobiales</i> , <i>Bradyrhizobiaceae</i> i <i>Bradyrhizobium</i>) i metanowych <i>Methylobacteriaceae</i> ; zwiększenie liczebności <i>Streptomyces</i>	Ge i in. 2012
AgNPs	zmniejszenie liczebności bakterii, zwłaszcza <i>Bradyrhizobium</i> , hamowanie procesu wiązania azotu	Kumar i in. 2011a
AgNPs	zmniejszenie populacji <i>Acidobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Cyanobacteria</i> i <i>Nitrospirae</i>	Wang i in. 2017
CuONPs	zmniejszenie liczebności bakterii <i>Alphaproteobacteria</i> , <i>Bacillus</i>	Frenk i in. 2013
CeO ₂ NPs, ZnONPs	dla <i>Sinorhizobium meliloti</i> CeO ₂ i ZnONPs były toksyczne, dla <i>S. melba</i> CeO ₂ NPs wykazywały działanie bakteriostatyczne, a ZnONPs – bakteriobójcze	Bandyopadhyay i in. 2012
CuNPs, ZnONPs	wpływ na profile fizjologiczne na poziomie zbiorowości drobnoustrojów już po 1 dniu, zmiana struktury zbiorowisk bakterii, szczególnie wrażliwe <i>Flavobacteriales</i> i <i>Sphingomonadales</i>	Collins i in. 2012
FeNPs, CoNPs, NiNPs	zmniejszenie liczby gatunków z rodzaju <i>Sphingomonas</i> i <i>Lysobacter</i> , natomiast wzrost liczby gatunków z rodzaju <i>Flavobacterium</i> i <i>Niastella</i>	Shah i in. 2014

Zbadano wpływ nanocząstek CuONPs na mikroorganizmy w dwu różnych glebach: piaszczystej i gliniastej. Nanocząstki CuONPs obniżały aktywność hydrolaz i dehydrogenaz, zmieniały skład i wielkość zbiorowisk mikroorganizmów w glebie. Populacja bakterii w glebie piaszczystej była bardziej podatna na oddziaływanie NPs niż mikroorganizmy gleby gliniastej. Opisano wysoką liczebność promieniowców w zanieczyszczonej nanocząstkami glebie piaszczystej, zmniejszenie liczby bakterii z grupy *Alphaproteobacteria*, a także *Bacillus*, która się zmniejszyła o 38% w porównaniu z kontrolą. Odnotowano, że główną

strategią przetrwania *Bacillus* w obecności nanocząstek było tworzenie przetrwalników [Frenk i in. 2013]. Concha-Guerrero i in. [2014] wykazali, że CuONPs są bardzo toksyczne dla rodzimych bakterii glebowych. Podobne wyniki dotyczące zmiany składu mikrobiomu gleby uzyskano, badając wpływ nanocząstek ZnONPs na ogólną wielkość społeczności bakteryjnej przeprowadzonej za pomocą real time PCR i oznaczenia na podstawie ilości genu 16S rRNA w 1 g suchej gleby. Ekspozycja na ZnONPs istotnie zmieniła wielkość populacji bakterii w glebie, zmniejszeniu uległa liczba *Bacillus*, przedstawicieli *Alphaproteobacteria* i *Gammaproteobacteria* [You i in. 2018]. Mirzajani i in. [2013] badali toksyczne działanie nanocząstek srebra (AgNPs) na bakterie ryzosferowe *Oryza sativa*, między innymi na rodzaj *Bacillus*. Obecność AgNPs w glebie pod uprawą ryżu zmieniła stosunki liczebnościowe w populacji bakterii. Stwierdzono całkowitą eliminację szczepu *B. thuringiensis* SBURR1, zaś szczep *B. amyloliquefaciens* SBURR5 był najliczniejszy spośród tego gatunku. Wang i in. [2017] badali wpływ różnych stężeń AgNPs na mikroorganizmy glebowe w ciągu 7 dni. Liczebność *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* i *Nitrospirae* znacznie zmniejszyła się, wzrosła natomiast liczba *Proteobacteria* i *Planctomycetes*. Już po 12-godzinnej ekspozycji zmalała przeżywalność bakterii nitryfikacyjnych *Nitrosomonas europaea*. Podobne badania potwierdziły, że AgNPs wywierały niekorzystny wpływ na bakterie zaangażowane w obieg azotu w glebie wykorzystywanej rolniczo [Yang i in. 2012].

Aktywność enzymów glebowych jest często traktowana jako wskaźnik aktywności mikrobiologicznej w glebie. Nanocząstki indukują znaczące zmiany aktywności enzymów glebowych w warunkach polowych. Du i in. [2011] ustalili, że TiO₂NPs i ZnONPs zmniejszają aktywność proteazy, katalazy i peroksydazy, ale nie wpływają na aktywność ureazy. Kumar i in. [2011b] badali zespoły bakterii gleb arktycznych poddanych działaniu nanocząstek srebra. Obserwowali oni zmniejszenie liczebności bakterii wiążących azot, takich jak przedstawiciele rodzaju *Bradyrhizobium*, których metabolizm jest korzystny dla rozwoju roślin, szczególnie w rejonach o niskiej średniej temperaturze rocznej. Zmiany liczebności bakterii glebowych lub ich stanu fizjologicznego wywołane nanomateriałami mogą więc przyczynić się do pogorszenia warunków uprawy roślin. Aktywności enzymów zaangażowanych w obieg azotu jak monooksygenaza amonowa i oksydoreduktaza azotynowa są hamowane przez nanocząstki [Zheng i in. 2011]. He i in. [2016] ocenili reakcje drobnoustrojów glebowych na nanocząstki srebra (AgNPs) i tlenku żelaza (FeONPs) za pomocą mikrokolorymetrii i pomiaru potencjału nitryfikacji gleby. Zmiany liczebności bakterii, eukariotów i bakterii utleniających amoniak mierzono metodą ilościowej real time PCR. Stwierdzono, że AgNPs zmniejszały aktywność metaboliczną drobnoustrojów glebowych, intensywność nitryfikacji oraz liczebność bakterii, a zwłaszcza bakterii utleniających amoniak. Dostępne w literaturze dane często potwierdzają negatywny wpływ nanocząstek metali na mikroorganizmy ryzosferowe. Jednak znane są też przykłady badań, które wskazują nie tylko na ich neutralne, ale nawet pozytywne oddziaływanie. Według Vittori Antisari i in. [2013] zanieczyszczenie gleby Fe₂O₃NPs i Fe₃O₄NPs nie miało wpływu na biomasę drobnoustrojów gle-

bowych. Podobne wnioski zostały sformułowane przez He i in. [2011] odnośnie ogólnej liczby bakterii. Simonin i in. [2014] nie stwierdzili znaczącego wpływu TiO_2NPs na liczebność bakterii w sześciu badanych glebach. Natomiast Shcherbakova i in. [2016] ocenili pozytywnie wpływ przedsięwzięcia zaprawiania nanocząstkami molibdenu nasion ciecierzycy. Zabieg ten nie tylko wpłynął korzystnie na rozwój siewek, ale także na różnorodność taksonomiczną mikroorganizmów w ryzosferze tych roślin. Ponadto zwiększał on liczebność i różnorodność gatunkową bakterii należących do rzędu *Rhizobiales*. Według badań He i in. [2016], FeONPs wykazywały pozytywny wpływ na aktywność metaboliczną mikroorganizmów glebowych oraz ich potencjał nityfikacyjny.

Dane literaturowe wskazują na możliwość stymulacji metabolizmu bakterii *Shewanella oneidensis* przez nanocząstki tlenku tytanu (TiO_2NPs). Główną funkcją *S. oneidensis* w cyklu geochemicznym jest redukcja metali przy udziale mononukleotydu flawinowego. W obecności TiO_2NPs stwierdzono u tej bakterii zwiększoną sekrecję flawin [Maurer-Jones i in. 2013]. Ciekawe doświadczenie z zakresu wpływu nanocząstek na układ symbiotyczny (interakcje symbiotyczne roślina – mikroorganizmy) zaprezentowali Taran i in. [2014]. Nasiona ciecierzycy przedsięwzięcie traktowano tylko roztworem nanocząstek molibdenu (MoNPs) lub roztworem zawierającym MoNPs i bakterie wiążące azot *Bradyrhizobium japonicum*. Zastosowanie koloidalnego roztworu nanocząstek molibdenu wspomagało rozwój prawie wszystkich grup mikroorganizmów ryzosferowych (liczebność 2–3 razy wyższa niż w kontroli), zwłaszcza bakterii metabolizujących azot mineralny i wiążących azot. Natomiast drugi wariant doświadczenia (MoNPs + *B. japonicum*) zwiększył liczebność bakterii promujących wzrost roślin, miał też pozytywny wpływ na tempo przemian materii organicznej i nasilenie procesów mineralizacji. Proponowane rozwiązanie stymuluje symbiozę z rośliną, wspomaga rozwój „agronomicznie cennej” mikroflory co może znaleźć praktyczne zastosowanie także w uprawie innych gatunków roślin.

Mechanizmy interakcji nanocząstek metali z mikroorganizmami w środowisku glebowym są ciągle słabo poznane. Wielu autorów podkreśla, że nanocząstki metali lub tlenków metali mogą być odpowiedzialne za utratę bioróżnorodności i modyfikację składu społeczności drobnoustrojów w glebie. Wiele badań koncentrowało się na wpływie nanocząstek metali na społeczności bakterii bezpośrednio w glebie, dla pełnego obrazu oddziaływań należałoby jeszcze prowadzić dalsze doświadczenia, aby ocenić w tych warunkach zbiorowiska grzybów i archeonów. Wyniki prezentowanych prac trudno jest porównać, gdyż uzyskano je przy użyciu różnych metod i wskaźników aktywności mikroorganizmów. W wielu pracach podkreślano, że reakcje mikroorganizmów są zależne zarówno od badanych nanocząstek, jak i właściwości gleby czy rośliny. Dalsze badania uwzględniające właściwości fizykochemiczne gleb i ich wpływ na biodostępność nanocząstek pozwolą lepiej ocenić interakcje z mikroorganizmami i ryzyko dla całego ekosystemu.

4.1. Zastosowanie nanocząstek metali w ochronie roślin przed mikroorganizmami patogennymi

Zdecydowana większość znanych gatunków grzybów to saprofity, ale szacuje się, że 270 000 gatunków grzybów, głównie z rodzaju *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Aspergillus*, *Fusarium* i *Verticillium*, jest patogenami roślin [Jampílek i Kráľová, 2018]. Spośród ponad 15 000 gatunków bakterii zidentyfikowano około 200 gatunków bakterii fitopatogennych, zaliczanych do rodzajów *Erwinia*, *Acidovorax*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobacter*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Xylella*, *Arthrobacter*, *Clavibacter* i *Streptomyces* [Jampílek i Kráľová 2018]. Grzyby i bakterie mogą powodować poważne straty w uprawach. Szacuje się, że grzyby odpowiadają za ponad 70% chorób roślin uprawnych, powodują znaczne straty plonów, a nakłady na ochronę roślin obniżają znacząco opłacalność upraw. Infekcje grzybowe roślin zagrażają też zdrowiu ludzi i zwierząt, gdyż plony mogą zawierać mikotoksyny, które działają rakotwórczo i mutagennie. Stosowane powszechnie fungicydy i środki bakteriobójcze kontrolują choroby wywoływane przez mikroorganizmy poprzez specyficzne ich hamowanie lub zabijanie patogenów, jednak ich stosowanie budzi obawy ze względu na chemiczne pozostałości i ich niespecyficzny wpływ na środowisko. Dlatego też podejmowane są próby zastosowania produktów nanotechnologicznych do zwalczania chorób roślin uprawnych.

Nanotechnologia w ochronie roślin w warunkach polowych nadal znajduje się na wczesnym etapie zastosowań. Różne typy nanocząstek, w tym także nanocząstki metali badane są pod kątem ich przydatności w praktyce rolniczej. Przedstawione we wcześniejszych rozdziałach tej monografii dane literaturowe podkreślają, że nanocząstki metali wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przez to mogą być wykorzystywane jako substancje aktywne w środkach ochrony roślin. Szczególnym zainteresowaniem naukowców cieszą się nanometale o silnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych jak AuNPs i AgNPs, a także te nanometale lub ich pochodne, które oprócz dużej aktywności w ograniczaniu rozwoju niepożądanych mikroorganizmów dodatkowo mogłyby roślinom dostarczać konieczne składniki odżywcze. Kryteria te spełniają nanocząstki CuNPs i ZnNPs. Stosowane w tym celu nanometale nie powinny mieć negatywnego wpływu na wzrost i jakość biologiczną roślin, co jest warunkiem ich potencjalnego wykorzystania w rolnictwie.

Nanocząstki złota wykazują działanie przeciwko fitopatogenom, jednak koszt materiału znacząco zmniejsza ich potencjalne zastosowanie w rolnictwie. Zaobserwowano zależne od stężenia AuNP (0,05–0,2 mg/L) zmniejszenie średnicy kolonii grzybów *F. verticillioides*, *P. citrinum* i *A. flavus*. Jednak nawet najwyższe zastosowane stężenie 0,2 mg/L nie było w stanie całkowicie zahamować wzrostu grzybów, ale powodowało uszkodzenie strzępek i tym samym ograniczało ich wzrost [Savi i in. 2012]. Nanocząstki złota o prawie kulistym kształcie i wielkości od 45 do 75 nm wykazywały aktywność przeciwgrzybową wobec *P. graminis tritici*, *A. flavus* i *A. niger*. Maksymalną strefę inhibicji wzro-

stu zaobserwowano dla *P. graminis* (17 mm) po zastosowaniu AuNPs [Jayaseelan i in. 2013].

Nanosrebro ma silne działanie biobójcze i szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego, w formie koloidalnej jest wykorzystywane jako środek dezynfekujący. Jak opisano wcześniej, mechanizm działania AgNPs związany jest z uwalnianiem jonów, co utrudnia jego zastosowanie w ochronie roślin, gdyż jony srebra są wysoce reaktywne i stosunkowo łatwo wchodzą w reakcje redoks, co może zmienić ich potencjał przeciwdrobnoustrojowy. Podejmowane są jednak badania nad zastosowaniem nanosrebra w celu ograniczania chorób roślin. Antraknoza papryki wywoływana przez gatunki *Colletotrichum* jest jednym z najważniejszych czynników ograniczających produkcję papryki. W Korei w warunkach polowych przeprowadzono doświadczenia nad możliwością stosowania nanocząstek srebra zamiast komercyjnych fungicydów w uprawie papryki [Lamsal i in. 2011]. Średnia częstość występowania choroby w grupie kontrolnej tych roślin wynosiła 84,1%. Najlepsze efekty ochronne uzyskiwano, stosując prewencyjne zabiegi nanosrebrem o stężeniu 50 ppm, objawy choroby zaobserwowano tylko u 9,7% roślin. Komercyjne fungicydy (NSS-F i Fenari) miały niższą skuteczność, (porażone rośliny stanowiły 35,2% i 25,3%). Po wystąpieniu objawów chorobowych na roślinach skuteczność nanosrebra była dużo niższa (odnotowano w tym przypadku 72% porażonych roślin), ale zbliżona do skuteczności fungicydów (72,1% NSS-F, 63,4% Fenari) [Lamsal i in. 2011].

Grzyby *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* powodują na różach rozwój uciążliwej choroby: mączniaka prawdziwego, objawiającej się powstawaniem białego, mączystego nalotu na liściach, pędach i kwiatach. Koloidalny roztwór nanosrebra o stężeniu 10 ppm rozpylano na uprawianych w szklarni różach z objawami mączniaka. Dwa dni po aplikacji nanocząstek, przy użyciu mikroskopu obserwowano tkanki roślin, u ponad 95% krzewów róż nie odnotowano w preparatach mikroskopowych strzępek grzyba i stan ten utrzymywał się przez tydzień [Kim i in. 2008a].

Biogenne nanocząstki srebra wyprodukowano przy użyciu *F. oxysporum*. Ich właściwości przeciwgrzybowe zbadano w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem zagrażającego uprawom pomidora patogenu *Pythium aphanidermatum*. W doświadczeniach szklarniowych i polowych zastosowanie AgNPs znacznie zmniejszyło częstość występowania objawów zgnilizny korzeni roślin pomidora. Najskuteczniejszym sposobem ochrony było zanurzanie korzeni siewek pomidora w roztworze AgNPs ($200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) przed posadzeniem, a następnie zraszanie gleby tym roztworem [Elshahawy i in. 2016].

Miedź należy do pierwiastków niezbędnych dla roślin. Jony miedzi mają silne działanie przeciwdrobnoustrojowe. Jednym z popularnych środków ochrony roślin jest Miedzian 50 WP, preparat o szerokim zakresie działania grzybobójczego i bakteriobójczego. Podejmowane są również próby zastosowania nanocząstek miedzi lub nanotlenków miedzi w polowej lub doświadczałnej ochronie roślin przed patogennymi grzybami i bakteriami. Nanocząstki miedzi mają większy potencjał aplikacyjny, ponieważ są one znacznie tańsze niż nanocząstki srebra lub złota, a dodatkowo w ten sposób można wprowadzać konieczny dla

rozwoju roślin mikroelement, jakim jest miedź. W uprawie szklarniowej w celu ochrony arbuza przed *Fusarium oxysporum f. sp. niveum* zastosowano nanocząstki CuONPs, MnONPs, TiO₂NPs i ZnONPs. Liście młodych roślin opryskano zawiesiną nanocząstek (500 do 1000 µg/ml) i rośliny posadzono w doniczkach z ziemią zainfekowaną *F. oxysporum f. sp. niveum*. Najlepszą ochronę przed tym grzybem stanowiły nanocząstki CuONPs, dodatkowo stosowanie nanotlenku miedzi zwiększało biomasę i plon roślin. Autorzy sugerują, że CuONPs może służyć jako wysoce skuteczny fungicyd, dostarczający równocześnie niezbędny z punktu widzenia żywienia roślin mikroelement, jakim jest miedź [Elmer i in. 2018].

Zastosowanie nanocząstek miedzi bezpośrednio do gleby spowodowało znaczne zmniejszenie częstości występowania objawów choroby na roślinach herbaty zarażonych *Poria hypolateritia* Berk. ex Cooke. Systemowy fungicyd karbendazym w największym stopniu kontrolował rozwój choroby grzybowej (57,2% redukcji objawów), zaś nanocząstki miedzi w dawce 2,5 ppm miały niewiele niższą skuteczność (52,7%) [Ponmurugan i in. 2016]. CuNPs hamują wzrost *X. axonopodis* pv. *punicae*, patogenu bakteryjnego powodującego zarazę bakteryjną granatu. Do skutecznej ochrony roślin wystarczy już stężenie 0,2 ppm, czyli 10 000 razy niższe niż zwykle stosowanego tlenochlorku miedzi. Po opryskaniu nanocząstkami liści granatu zainfekowanymi fitopatogenami obserwowano zmniejszenie objawów chorobowych widocznych jako wodniste zmiany na liściu. Nanomiedź znacznie ograniczała zdolność do kolonizacji tkanek rośliny przez patogenne bakterie, przypuszczalnie na skutek uszkodzenia ściany komórkowej komórek bakteryjnych [Mondal i Mani 2012].

Stwierdzono też, że roztwory koloidalne CuNPs (o średnicy cząstek 2–5 nm) przygotowane przy użyciu polimeru powlekającego PVA i z dodatkiem cytrynianu jako środka zapobiegającego agregacji wykazują znaczną aktywność przeciwgrzybową w stosunku do *Corticium salmonicolor*, grzyba rozwijającego się na drzewach cytrusowych, kawowych i kauczukowych. Roztwór koloidalny o stężeniu 7 ppm CuNPs silnie hamował wzrost *C. salmonicolor*, zaś roztwór o stężeniu 10 ppm CuNPs całkowicie zabijał komórki grzyba. Oprysk roztworem o stężeniu 10 ppm CuNPs zmniejszał objawy choroby porażonych drzew kauczukowych [Cao i in. 2014].

Co ciekawe, nanocząstki miedzi były bardziej skuteczne w zawalczaniu *P. infestans* niż znane na rynku pestycydy zawierające miedź. Giannousi i in. [2013] przetestowali nanocząstki Cu₂ONPs, CuONPs i Cu/Cu₂ONPs o podobnych rozmiarach (11–14 nm) i prawie kulistym kształcie przeciwko *P. infestans* porażających pomidory. Wszystkie badane nanocząstki na bazie miedzi były bardziej skuteczne w ograniczaniu porażenia tym patogenem w dużo niższych stężeniach niż zarejestrowane pestycydy na bazie miedzi (Kocide 2000, Kocide Opti, Cuprofix Disperss i Ridomil Gold Plus), nie powodując żadnych szkodliwych efektów ubocznych.

Zastosowanie nanocząstek cynku przeciwko patogenom roślin również wydaje się być obiecujące. Cynk jest niezbędnym składnikiem odżywczym dla roślin i zwierząt, stanowi znaczny składnik skorupy ziemskiej (0,004%) i jest

powszechnie obecny w środowisku, może być toksyczny dla roślin i zwierząt w wysokich stężeniach, ale dawki wymagane do kontroli patogenów są niskie i przez to przyjazne środowisku. ZnONPs jest powszechnie uznawany za bezpieczny (GRAS) przez FDA i jest stosowany do pakowania żywności oraz do wzbogacania żywności na bazie zbóż [Wagner i in. 2016]. Stwierdzono, że nanocząstki ZnONPs nadają się również do zwalczania grzybowej zarazy ryżu *Pyricularia grisea* i choroby grzybowej powodowanej przez *Helminthosporium oryzae* związanej z występowaniem brunatnych plam na tej roślinie. W warunkach szklarniowych opryskiwano sadzonki ryżu ZnONPs w stężeniach 0,2 i 0,5%, na siedem, pięć i dwa dni przed zainfekowaniem roślin zawieszoną zarodników *P. grisea* oraz na dwa dni przed zainfekowaniem i po zainfekowaniu *H. oryzae*. Najskuteczniejsze w zwalczaniu zarazy ryżu było opryskiwanie ZnONPs na pięć dni przed zaszczepieniem zawieszoną zarodników *P. grisea*, zaś w zwalczaniu choroby brunatnych plam opryskiwanie na dwa dni przed infekcją *H. oryzae*. Dodatkowo stwierdzono też poprawę kondycji roślin, gdyż zawartość chlorofilu wzrosła po zastosowaniu ZnONPs [Kalboush i in. 2016].

W innym doświadczeniu zbadano wpływ nanocząstek ZnNPs i ZnONPs na grzybopodobny patogen *Peronospora tabacina* rozwijający się na liściach tytoniu. Nanocząstki ZnNPs (o średnicy 264 nm) i ZnONPs (o średnicy 19,3 nm) hamowały kiełkowanie zarodników i rozwój infekcji na liściach tytoniu odpowiednio przy stężeniu 8 i 10 mg/ L. Udało się również wykazać, że toksyczność tych nanomateriałów względem *P. tabacina* nie wynikała z uwalniania jonów cynku z nanocząstek, gdyż opryski z użyciem nanocząstek były znacznie skuteczniejsze niż z użyciem cząsteczkowego ZnO. Autorzy sugerują, że po oprysku na powierzchni liści nanocząstki osadzają się lepiej niż związki cynku, co skutkuje przedłużonym i skuteczniejszym zwalczaniem chorobotwórczych drobnoustrojów [Wagner i in. 2016].

Nanocząstki dwutlenku tytanu to kolejne nanocząstki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym i dużym potencjale stosowania w ochronie roślin. Cui i in. wykazali, że TiO_2NPs zmniejszyły infekcję ogórka patogenami *P. syringae* pv. *lachrimans* i *P. cubensis* o 69 i 91% [Cui i in. 2009]. Dodatkową korzyścią stosowania tych nanocząstek był wzrost aktywności fotosyntetycznej roślin o 30%.

W literaturze dostępnych jest niewiele danych na temat skuteczności nanometali wobec wirusów wywołujących choroby roślin, szczególnie w uprawach polowych. Badano między innymi ochronną rolę nanocząstek srebra lub cynku przed wirusem żółtej mozaiki fasoli (BYMV) [Elbeshehy i in. 2015], wirusem ziemniaka Y (PVY) [Cordero i in. 2017] i wirusem mozaiki ogórka (CMV) [El-Sawy i in. 2017]. Opryski nanocząstkami stosowano w różnych terminach; prewencyjnie, w trakcie inokulacji wirusa lub po wystąpieniu objawów porażenia roślin. Oprysk roztworem ZnNPs o wielkości cząstek 100 nm (w trzech różnych stężeniach 50, 100 i 200 μgml^{-1}) zastosowano w uprawie szklarniowej na jeden dzień przed zainfekowaniem roślin bakłazana wirusem mozaiki ogórka [El-Sawy i in. 2017]. Efekty działania nanocząstek porównywano z działaniem 2-nitrometylofenolu i ekstraktu z wodorostów. Autorzy stwierdzili, że skuteczność zastosowanych oprysków była następująca: 2-nitrometylofenol > ekstrakt

z wodorostów > ZnNPs. Nanocząstki cynku najslabiej chroniły rośliny przed infekcją wirusem mozaiki, ale zwiększały odporność roślin na tę chorobę.

Nanocząstki srebra zastosowano w celu ochrony fasoli przed wirusem żółtej mozaiki (BYMV) [Elbeshehy i in. 2015]. W doświadczeniu wazonowym rośliny podzielono na grupy, które opryskiwano nanocząstkami równocześnie z infekcją BYMV, na 72 h przed zakażeniem i 24 h po infekcji wirusowej. Porażenie roślin oceniano na podstawie wizualnej kontroli liści i oznaczaniu cząstek wirusa techniką real time PCR. Opryski nanocząstkami srebra miały różną skuteczność: zabieg przed infekcją nie chronił tych roślin, zabieg zastosowany równocześnie z zainfekowaniem wirusem w niewielkim stopniu zmniejszał koncentrację wirusa i objawy choroby, zabieg przeprowadzony po 24 h od infekcji zapobiegał wszystkim objawom choroby. Autorzy sugerują, że AgNPs wpływa na replikację wirusa, ale nie indukuje odporności roślin na zakażenie BYMV. Skuteczność nanocząstek srebra w zapobieganiu infekcji wirusa ziemniaka Y (PVY) opisał Cordero i in. [2017]. Stwierdzono, że roztwór AgNPs o stężeniu 1000 ppm zastosowany na 48 h przed mechanicznym zainfekowaniem liści skutecznie chroni te rośliny.

W wielu publikacjach podkreślane są korzyści z zastosowania nanotechnologii w rolnictwie. Badania nad przeciwdrobnoustrojowym działaniem nanocząstek dają szansę na skuteczną ochronę roślin przed chorobami. Środki ochrony roślin na bazie nanometali mogą stać się alternatywą dla tradycyjnych pestycydów, gdyż mikroorganizmy nie wytworzyły na nie mechanizmów oporności. Nanometale oprócz ochronny przed patogenami mogą też dostarczać roślinom niezbędnych składników odżywczych. Jednak ich powszechne zastosowanie w rolnictwie wymaga przede wszystkim poznania toksycznych oddziaływań na środowisko, a zwłaszcza na mikrobiotę gleby.

5. Biobójcze działanie nanocząstek na mikroorganizmy chorobotwórcze dla człowieka

Nanocząstki posiadają nie tylko interesujące właściwości fizykochemiczne co wynika głównie z rozmiarów oraz morfologii tych struktur, ale także dużą reaktywność chemiczną oraz odmienne właściwości biologiczne w porównaniu z ich makroskopowymi odpowiednikami. Materiały makroskopowe zwykle obojętne dla organizmów żywych często stają się cytotoksyczne, gdy zmniejszy się ich rozmiary do skali nanometrycznej [Park i in. 2011]. Przyczyny tego zjawiska zostały szczegółowo omówione w poprzednich rozdziałach tego opracowania.

Termin czynnik przeciwdrobnoustrojowy odnosi się do substancji, które mogą w wyniku bezpośredniego oddziaływania zabijać mikroorganizmy (działanie bakteriobójcze, grzybobójcze) lub spowalniać ich wzrost (działanie bakteriostatyczne, fungistatyczne), nie wykazując szkodliwych efektów względem komórek gospodarza. Większość obecnych substancji przeciwbakteryjnych to chemicznie modyfikowane związki naturalne na przykład β -laktamy takie jak: penicyliny, cefalosporyny, monobaktamy oraz karbapenemy [Von Nussbaum i in. 2006]. Często stosuje się również czyste produkty naturalne, takie jak aminoglikozydy, a także syntetyczne chemioterapeutyki, na przykład sulfonamidy. Mają one kluczowe znaczenie w walce z chorobami zakaźnymi. Nadużywanie oraz nieprawidłowe stosowanie antybiotyków, bez identyfikacji czynnika etiologicznego jest przyczyną zjawiska lekooporności [Jabłoński i in. 2010]. Nabywanie przez patogeny oporności na dostępne i powszechnie stosowane chemioterapeutyki przeciwdrobnoustrojowe stanowi zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt hodowlanych oraz generuje wysokie koszty leczenia. Dodatkowym problemem związanym z tym zjawiskiem jest pojawianie się i rozprzestrzenienie gatunków i szczepów opornych na antybiotyki.

Według aktualnych statystyk (raport epidemiologiczny dotyczący oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe w Unii Europejskiej, UE/EOG (EARS Net z 2019 r.). prawie połowę ludzkich izolatów *Escherichia coli* stanowiły szczepy odporne na przynajmniej jeden antybiotyk (44,2%), w przypadku *S. aureus* stanowiły 20,6%, *K. pneumoniae* – 11,3%, *Enterococcus faecalis* – 6,8%, *P. aeruginosa* – 5,6%, *Streptococcus pneumoniae* – 5,3%, *E. faecium* – 4,5% a spośród gatunków *Acinetobacter* – 1,7%. Wśród nich oporność na kilka antybiotyków z różnych klas była częsta. Patogeny te są odpowiedzialne za najczęstsze szpitalne

i pozaszpitalne zakażenia (zakażenia układu moczowego, zakażenia skóry i tkanki podskórnej, w tym miejsca operowanego, zakażenia krwi czy zapalenia płuc).

Wprawdzie w porównaniu z poprzednim okresem odnotowano mniejszy o około 4% odsetek izolatów metycylinoopornych *Staphylococcus aureus* (MRSA) (spadek z 19% w 2015 r. do około 15,5% w 2019), ale w niektórych krajach nadal są one wykrywane z dużą częstością. Natomiast dla większości analizowanych patogenów odnotowano tendencję wzrostową. Szczególny niepokój budzi wzrost odsetka izolatów klinicznych *E. faecium* opornych na wancomycynę z 10,5% w 2015 r. do 18,3% w 2019 r.

Dynamika zjawiska antybiotykooporności i związane z tym narastające zagrożenie dla zdrowia publicznego stały się impulsem do podjęcia kroków zmierzających do opracowania zasad zapobiegania powstawaniu szczepów antybiotykoopornych oraz/lub ich transmisji do środowiska pozaszpitalnego. Współczesne osiągnięcia nanotechnologii z zakresu nanobiologii i nanomedycyny wpisują się w ten nurt działań.

Nanomateriały mogą stanowić alternatywne do antybiotyków związki przeciwdrobnoustrojowe i zastępować stare metody terapeutyczne [Gao i in. 2014]. Uważa się, że nanocząstki znacznie rzadziej indukują oporność mikroorganizmów niż konwencjonalne chemioterapeutyki. Są one uważane za środki przeciwdrobnoustrojowe o szerokim spektrum działania oraz o wielokierunkowym mechanizmie oddziaływania. Możliwość oddziaływania na mikroorganizmy poprzez różnorodne mechanizmy sprawia, że prawdopodobieństwo powstania wielu mutacji chroniących przed szkodliwymi skutkami tego działania jest znikome.

Kolejnym argumentem wspierającym tezę o przydatności nanomateriałów w medycynie i weterynarii jest ich zdolność do niszczenia komórek mikroorganizmów chorobotwórczych występujących w formie biofilmu. Formowanie biofilmu przez patogenne bakterie jest uważane za główny czynnik wirulencji, chroniący je nie tylko przed niesprzyjającymi warunkami środowiska oraz mechanizmami odpowiedzi immunologicznej gospodarza, ale również przed ukierunkowanym działaniem środków przeciwbakteryjnych, w tym antybiotyków [Landini i in. 2010]. W porównaniu z formami planktonicznymi bakterie funkcjonujące w formie biofilmu cechuje zwiększona, od 10 do 1000 razy oporność na antybiotyki [Mah 2012]. Stosowanie antybiotyków do walki z biofilmem może zmniejszyć liczbę komórek bakterii w biofilmie, jednak nie prowadzi do całkowitej jego eradykacji, czego konsekwencją jest rozwój przewlekłych i/lub nawracających zakażeń [Landini i in. 2010]. Zakażenia związane z biofilmem można ogólnie podzielić na dwa typy. Biofilmy mogą tworzyć się na powierzchniach abiotycznych, zwłaszcza na wyrobach medycznych wprowadzonych do organizmu pacjenta oraz bezpośrednio w zainfekowanych tkankach.

Zdolność nanocząstek do oddziaływania z komórkami biofilmu oraz ich silne właściwości biobójcze (omówione szczegółowo we wcześniejszych rozdziałach tego opracowania) sprawiają, że są one obiecującymi substytutami tradycyjnych środków farmakologicznych. Badania nad zastosowaniem nanocząstek w terapiach przeciwbiofilmowych, mogą być szansą na ograniczenie zakażeń, ale mają także aspekt ekonomiczny, gdyż pozwolą na zmniejszenie kosztów

leczenia. Obiecujące wyniki doświadczeń zaprezentowano z zastosowaniem nanocząstek złota. Naukowcy skonstruowali matryce z dwutlenku tytanu o kształcie nanorurek, na których za pomocą rozpylania magnetronowego umieścili nanocząstki złota [Li i in. 2014]. Do niszczenia drobnoustrojów w tym układzie wykorzystano zjawisko zlokalizowanego powierzchniowego rezonansu plazmonowego, czyli zbiorowej oscylacji elektronów, które występują na międzyfazowej powierzchni pomiędzy dielektrykami a przewodnikami, tu między nanodwutlenkiem tytanu a nanozłotem. Zlokalizowana oscylacja elektronów powoduje wzbudzenie nanocząstek złota. W obecności takich nanoukładów *E. coli* oraz *S. aureus* nie tworzyły biofilmów, często obserwowano też uszkodzenia błon cytoplazmatycznych tych bakterii.

Nanocząstki srebra hamują również proliferację szczepów bakterii mających zdolność do tworzenia biofilmu w obrębie ran lub uszkodzonych błon śluzowych [Sivakamavalli i in. 2014]. Z kolei nanocząstki tlenku cynku mogą wchodzić w skład leków, gdyż tlenek cynku jest od dawna wykorzystywany w preparatach dermatologicznych. ZnONPs wykazują silne działanie antyoksydacyjne oraz bakteriobójcze, na przykład w stosunku do patogenów wywołujących infekcje dróg moczowych [Chandra i in. 2019]. Co szczególnie ważne nanotlenek cynku hamuje także tworzenie biofilmu przez *Enterococcus faecalis*, zwiększa hydrofilowość komórek bakteryjnych i ułatwia ich eradykację, ale nie wpływa na wzrost zdrowych komórek organizmu [Guerreiro-Tanomaru i in. 2014].

Należy jednak zaznaczyć, że wyniki badań dotyczących skuteczności nanocząstek uzyskane w testach *in vitro* nie zawsze przekładają się na efekty terapeutyczne w organizmie, czyli *in vivo*. Prawdopodobnie wynika to z trudności w ustaleniu optymalnej dawki oraz formy NPs dla zainfekowanego organizmu szczególnie w aspekcie możliwości występowania patogenów w formie biofilmu. Szacuje się, że w około 80% wszystkich infekcji dotyczących zwierząt i ludzi jest spowodowana przez mikroorganizmy zorganizowane w biofilmy.

W nanomedycynie ugruntowaną pozycję mają następujące nanocząstki: AgNPs, AuNPs i CuONPs [Kandi i Kandi 2015]. Srebro metaliczne było znane od dawna ze swoich właściwości dezynfekcyjnych. Było ono wykorzystywane do oczyszczania wody i środków spożywczych, a także do dezynfekcji ran. Forma nanometryczna srebra AgNPs z racji udokumentowanych właściwości bakteriobójczych, grzybobójczych i przeciwwirusowych jest stosowana we współczesnej medycynie do impregnacji materiałów medycznych i protez, dezynfekcji respiratorów, inhalatorów, aparatury do spirometrii czy produkcji materiałów opatrunkowych (bandaży, opatrunków, masek chirurgicznych) [Zhang i in. 2016b]. AgNPs wykazują silne działanie przeciwdrobnoustrojowe (bakteriobójcze, grzybobójcze) nie tylko w stosunku do saprofitycznych mikroorganizmów, ale także patogenów, w tym opornych na antybiotyki takich jak: metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus* (MRSA) i *Staphylococcus epidermidis* [Morones i in. 2005]. Poza tym AgNPs skompleksowane z antybiotykami wzmacniają ich przeciwbakteryjne działanie. Tego typu efekty obserwowano w przypadku antybiotyków takich jak np.: ampicylina, tetracyklina, ofloksacyna, teikoplanina, chloramphenikol i kanamycyna [Ahmed i in. 2016, Ding i in. 2018,

Tabela 12. Przeciwbakteryjne efekty wybranych nanocząstek metali dedykowanych do terapii chorób infekcyjnych

Bakteria	NPs/koniugat	Właściwości NPs	Dawka	Mechanizm toksyczności	Uwagi	Literatura
<i>S. aureus</i>	SPIONs funkcjonalizowane grupami karboksylowymi	średnica 10–20 nm	0.35 mg/mL	zewnętrzne pole magnetyczne może ukierunkować SPOINS do biofilmu i zwiększyć efektywność przeciwbakteryjną	SPOINs wykazują zdolność do internalizacji, ale nie wpływają na adhezję i rozprzestrzenianie się komórek ssaczy	Subbiahdoss i in. 2012
	SPIONs funkcjonalizowane silanami (grupami silanowymi Si-OH)	średnica 10–20 nm	0.35 mg/mL	wytwarzanie RFT, elektrostatyczne interakcje między NPs a bakteriami		
	Nieopłaszczzone SPIONs	średnica 10–20 nm	0.35 mg/mL			
	SPIONs sfunkcjonalizowane PEG	średnica 10–20 nm	0.35 mg/mL	brak toksyczności dla bakterii	brak zdolności do internalizacji	
	SPIONs AgNPs	średnica 15–20 nm	80 µg/mL	toksyczność po przeniknięciu do biofilmu; wzrost toksyczności po przyłożeniu zewnętrznego pola magnetycznego; generowanie RFT, oddziaływania elektrostatyczne; fizyczne uszkodzenia bakterii	SPION opłaszczony Ag i Ag-Au są w pełni kompatybilne ze składnikami komórki	Khan 2012
	SPIONs Ag–AuNPS	średnica 20–30 nm	80 µg/mL			
	SPIONs AuNPS	średnica 25–40 nm	80 µg/mL	słabe właściwości bakteriobójcze tylko po przyłożeniu zewnętrznego pola magnetycznego, spowodowane penetracją cząstek do biofilmu		
	Fe ₃ O ₄ /mezo-SiO ₂ pokryte przeciwciałami anty <i>S. aureus</i> i skoniugowane z wankomycyną	średnica 250 nm	brak danych	nanoprzenośnik, efekt bakteriobójczy związany z działaniem wankomycyny		Xu i in. 2019
<i>S. epidermidis</i>	SiNPs (uwalniające NO)	średnica 80–100 nm	8 mg/mL	uszkodzenie mikroorganizmów biofilmu dzięki przenikaniu SiNPs do matryks biofilmu oraz właściwościom elektrostatycznym NO uwalnianych z nanocząstek	szybkie uwalnianie NO jest bardziej skuteczne niż wolne	Hetrick i in. 2009
	AgNPs immobilizowane na powierzchni Ti	średnica 18–24 nm		hamowanie tworzenia biofilmu <i>in vitro</i> poprzez hamowanie adhezji bakterii i inhibicji transkrypcji genów <i>icaAD</i>	unieruchomione AgNPs nie wykazują cytotoksyczności, ale hamują tworzenie biofilmu; efekt niezależny od uwalnianych jonów srebra	Qin i in. 2014

Izolaty kliniczne bakterii i grzybów MRSA, MRAB, <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Burkholderia</i> spp. <i>C. albicans</i>	SCC23-LTP NPs	średnica 700–800 nm (oznaczona za pomocą DLS)	(MBC) NA (MIC) 10 mg/L		analizowano izolaty mikroorganizmów chorobotwórczych tylko w formie planktonowej	Leid i in. 2012
<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i>	AgNPs	promień hydrodynamiczny określony za pomocą XRD – 43 nm; pole powierzchni 26 m ² /g	30 mg/L	oddziaływania elektrostatyczne, adsorpcja, wnikanie do komórek	adsorpcja AgNPs jest większa w temp. 20°C niż w 37°C	Khan i in. 2011
<i>K. pneumoniae</i>	NONPs (kompozytowe, polimerowe nanocząstki uwalniające NO)	Średnica 10–15 nm	(MIC) 10 mg/ml w ciągu 24 h	uszkodzenia błony bakteryjnej, działanie bakteriobójcze poprzez nitrozylację grup–SH białek, kationów żelaza niehemowego oraz reszt tyrozylowych w białkach	NO jest prekursorem RFA (reaktywnych form azotu), które wykazują efekt przeciwdrobnoustrojowy	Friedman i in. 2011
<i>P. aeruginosa</i>	NONPs (kompozytowe, polimerowe nanocząstki uwalniające NO)	średnica 8–15 nm	(MIC) 10 mg/mL w ciągu 16 h			
	SiNPs (uwalniające NO)	średnica 80–100 nm (określone za pomocą AFM)	8 mg/mL	uszkodzenie mikroorganizmów biofilmu dzięki przenikaniu SiNPs do matryks biofilmu oraz właściwościom elektrostatycznym NO uwalnianych z nanocząstek	szybkie uwalnianie NO jest bardziej skuteczne niż wolne	Hetrick i in. 2009
	TiO ₂ NPs	średnica 10–25 nm (ST-01, Ishihara Sangyo Kaisha Ltd., Osaka, Japan)	10 mg/L	fotoaktywacja TiO ₂ promuje działanie bakteriobójcze; peroksydacja wielonienasyconych fosfolipidów błony; utrata aktywności oddechowej		Tsuang i in. 2008
	AgNPs	średnica 1–10 nm	25–100 mg/L	zaburzenie transportu, oddychania i podziału komórek, oddziaływanie z błoną komórkową oraz związkami zawierającymi siarkę i fosfor		Morones i in. 2005
	ZnONPs	średnica 10–20 nm	1–4,25 mM w 100 mL	oddziaływania elektrostatyczne ułatwiają kontakt z bakteriami; wytwarzanie RFT, uszkodzenie błony komórkowej i zaburzenie jej funkcji		Feris i in. 2010

<i>E. coli</i>	AgNPs syntetyzowany metodą biologiczną z wykorzystaniem <i>Trichoderma viride</i>	średnica 5–40 nm	(MIC) 30 µg/mL	Ag NP skojarzony z ampicyliną prowadzi do lizy ściany komórkowej bakterii, internalizacji AgNPs i uniemożliwia replikację DNA	biogenicznie syntetyzowane AgNPs wykazują synergistyczny efekt z antybiotykami	Fayaz i in. 2010
	SiNPs (uwalniające NO)	średnica 80–100 nm (określona za pomocą AFM)	8 mg/mL	uszkodzenie mikroorganizmów biofilmu dzięki przenikaniu SiNPs do biofilmu oraz właściwościom elektrostatycznym NO uwalnianych z nanocząstek	szybkie uwalnianie NO jest bardziej skuteczne niż wolne	Hetrick i in. 2009
	Au/Ag (NEs) nanopęty Au z powłoką z Ag)	wymiary: 12–14 × 50–55 nm	dawka równoważna 8 µM Ag ⁺	efekt bakteriobójczy wynikający z uwalniania jonów srebra Ag ⁺		Kim i in. 2018
	Al ₂ O ₃ NPs	średnica 50–70 nm (Zhejiang Hongsheng Material Technology Co.) + 30 mV	20 mg/L	oddziaływania elektrostatyczne ułatwiają kontakt z bakteriami, uszkodzenie ściany komórkowej bakterii, wzrost przepuszczalności błony	toksyczność wynika z wysokiego powinowactwa nanocząstek do ściany komórkowej	Jiang i in. 2009
	ZnONPs	średnica 20 nm (Zhejiang Hongsheng Material Technology Co) – 5 mV	20 mg/L			
	TiO ₂ NPs	średnica 50 nm (Zhejiang Hongsheng Material Technology Co.) – 21 mV	20 mg/L			
	NiONPs, CuONPs, ZnO NPs	średnica 20–30 nm (NanoAmor, Houston, USA)	>20 mg/L w roztworze wodnym 20 µg/L w aerozolu, 10 minut	zahamowanie wzrostu w środowisku wodnym (NiONPs); zahamowanie procesów komórkowych (stres fizyczny/mechaniczny uszkodzający struktury komórkowe po ekspozycji komórek w aerozolu (NiONPs, CuONPs, ZnONPs)	efekt synergistyczny z jonami metali (po ekspozycji na NiONPs, ZnONPs, CuONPs w aerozolu)	Wang i in. 2010
	CuNPs	średnica 25 nm (Sun Innovation, USA)	brak danych	uwalnianie jonów Cu ⁺² i generowanie rodnika hydroksylowego w cytoplazmie		Rispoli i in. 2010

	TiO ₂ NPs	średnica 20 nmST-01 (Ishihara SangyoKaisha Ltd.)	10 mg/L	fotoaktywacja TiO ₂ promuje działanie bakterio-bójcze; peroksydacja wielonienasyconych fosfolipidów błony; utrata aktywności oddechowej		Tsuang i in. 2008
	AgNPs	średnica 1–10 nm	25–100 mg/L	zaburzenie transportu, oddychania i podziału komórek; oddziałują z błoną komórkową oraz związkami zawierającymi siarkę i fosfor		Morones i in. 2005
	ZnONPs	średnica: 4, 10, 30 nm	od 12,5 do 2000 µg/mL (test dyfuzyjny)	efekt bakterio-bójczy prawdopodobnie spowodowany generowaniem RFT		Bai i in. 2015
<i>S. typhimurium</i>	ZnONPs	średnica rdzenia: 25–40 nm	8 i 80 ng/mL	ulegają internalizacji; generują RFT; wykazują słaby potencjał mutageniczny polegający na przesunięciu ramki odczytu		Kumar i in. 2011
	TiO ₂ NPs	średnica rdzenia: 40–60 nm				

Wartości średnicy nanocząstek zostały określone za pomocą TEM – transmisyjny mikroskop elektronowy, jeśli wykorzystano inne techniki, to zostało to odnotowane w tabeli. Objasnienie skrótów: SPIONs – superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (ang. superparamagnetic iron oxide nanoparticles), APTES – 3-aminopropylotrietoksylian (3-aminopropyltriethoxysilane), PEG – glikol polietylenowy, SCC23-LTP NPs – biodegradowalny kopolimer PLA-PEG (z ang. polyethylene glycol-poly(lactic acid), TMOS – tetrametoksylian, Au/AgNRs – nanopręty ze złota z powłoką z Ag; MBC – minimalne stężenie bakterio-bójcze (ang. minimum bactericidal concentration); MIC – minimalne stężenie hamujące wzrost (ang. minimum inhibitory concentration), DLS – dynamiczne rozpraszanie światła (ang. dynamic light scattering); XRD – dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (ang. X-ray diffraction) AFM – mikroskop sił atomowych (ang. atomic force microscopy)

Thapa i in. 2017]. Nanocząstki srebra mogą także działać synergistycznie z lekami stosowanymi powszechnie w terapii infekcji grzybiczych np. z flukonazolem [Gajbhiye i in. 2009]. Podobne właściwości przeciwdrobnoustrojowe wykazują nanocząstki tlenku miedzi (CuONPs), jednak ich aktywność przeciwbakteryjna jest mniejsza niż nanosrebra. Dodatkowo mogą być wykorzystywane przeciwwirusowo w stosunku do wirusa grypy typu A oraz wirusa SARS [Ren i in. 2009]. Podobne działanie antydrobnoustrojowe wykazują AuNPs [Shamaila i in. 2016]. Aktywność taką stwierdzono zarówno dla niemodyfikowanych nanocząstek złota, jak i po przyłączeniu odpowiednich ligandów w tym antybiotyków, co wzmacnia sumaryczny efekt przeciwdrobnoustrojowy [Ayaz-Ahmed i in. 2014]. Nanocząstki złota wykorzystuje się także do celów diagnostycznych (po przyłączeniu jako ligandów: cząsteczek lipidów lub przeciwciał). AuNPs wykorzystywane są również w leczeniu chorób nowotworowych za pomocą terapii fototermicznej nowotworów (PPT).

Pomimo że wiedza dotycząca właściwości przeciwdrobnoustrojowych MeNPs jest obszerna, nadal wiele aspektów tego zjawiska wymaga wyjaśnienia. Tabela 12 podsumowuje wyniki badań różnych autorów dotyczących właściwości bakteriobójczych w stosunku do mikroorganizmów patogennych różnych nanostrukturalnych materiałów (nanocząstek metali i tlenków metali, w tym magnetycznych (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, ang. SPIONs), półprzewodników, polimerów i materiałów węglowych). Z danych tych wynika, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa NPs zależy od dwóch głównych czynników: właściwości morfologicznych nanocząsteczek oraz rodzaju mikroorganizmu. Choć możliwe jest określenie współczynników korelacji w przypadku NPs działających na biofilmy bakterii patogennych, pozostałych wyników nie da się niestety w ten sposób zinterpretować. W wielu przytoczonych badaniach wykorzystano słabo scharakteryzowane NPs, przez co nie jest możliwa tego typu analiza statystyczna. W celu systematycznego poznania właściwości przeciwbakteryjnych nanocząstek konieczne jest korzystanie z systemów referencyjnych zarówno w odniesieniu do mikroorganizmu testowego, jak i do analizowanych nanocząstek.

LITERATURA

- Abd A.N., Al-Marjani M.F., Kadham Z.A., 2016. Antibacterial activity of cadmium oxide nanoparticles synthesized by chemical method. *J. Multidiscip. Eng. Sci. Technol.* 3, 5007–5011.
- Abdal-Dayem A., Hossain M.K., Lee S.B., Kim. K., 2017. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 120, <https://doi.org/10.3390/ijms18010120>.
- Abid J.P., Wark A. W., Brevet P.F., Girault H.H., 2002. Preparation of silver nanoparticles in solution from a silver salt by laser irradiation. *Chem. Commun.* 7, 792–793, <https://doi.org/10.1039/B200272H>.
- Adukwu E.C., Bowles M.V., Edwards-Jones V., Bone H., 2013. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9619–9627, <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7807-y>.
- Agnihotri S., Mukherji S., Mukherji S., 2013. Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver. *Nanoscale* 5, 7328–40, <https://doi.org/10.1039/c3nr00024a>.
- 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 Adv.* 4, 3974–3983, <https://doi.org/10.1039/C3RA44507K>.
- Ahmed K.B.A., Raman T., Veerappan A., 2016. Future prospects of antibacterial metal nanoparticles as enzyme inhibitor. *Mater. Sci. Eng. C*, 68, 939–947. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.06.034>.
- Aktepe N., Baran A., 2021. Biosynthesis of AgNPs by extract from waste leaves of *Citrullus lanatus* sp. (watermelon): characterization, antibacterial and antifungal effects. *Progr. Nutr.* 23(3), e2021243, <https://doi.org/10.23751/pn.v23i3.11907>.
- Al-Othman M.R., Abd El-Aziz A.R.M., Mahmoud M.A., Fifan S.A., El-Shikh, Majrashi M., 2014. Application of silver nanoparticles as antifungal and antiaflatoxin B1 produced by *Aspergillus flavus*. *Dig. J. Nanomater. Biostruct.* 9, 151–157.
- Alagarasi A., 2013. Introduction to Nanomaterials. In: *Nanomaterials*. Indian Institute of Technology Madras, 1–24.
- Alani F., Moo-Young M., Anderson W., 2012. Biosynthesis of silver nanoparticles by a new strain of *Streptomyces* sp. compared with *Aspergillus fumigatus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1081–1086, <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0906-0>.
- Alekish M., Ismail Z.B., Albiss B., Nawasrah S., 2018. *In vitro* antibacterial effects of zinc oxide nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: An alternative approach for antibacterial therapy of mastitis in sheep. *Vet. World* 11(10), 1428–1432, <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1428-1432>.

- Ali M., Kim B., Elfield K.D.B., Norman D., Brennan M., Ali G.S., 2015. Inhibition of *Phytophthora parasitica* and *P. capsici* by silver nanoparticles synthesized using aqueous extract of *Artemisia absinthium*. *Phytopathology* 105, 1183–1190, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-15-0006-R>.
- Alshareef A., Laird K., Cross R.B.M., 2017. Shape-dependent antibacterial activity of silver nanoparticles on *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* bacterium. *Appl. Surf. Sci.* 424, 310–315, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.03.176>.
- Altavilla C., Ciliberto E., 2010. *Inorganic nanoparticles: synthesis, applications and perspectives*. Boca Raton–London, CRC, 547–558.
- Altemimi A., Lakhssassi N., Baharlouei A., Watson D.G., Lightfoot D.A., 2017. Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants (Basel)*, 6, E42, <https://doi.org/10.3390/plants6040042>.
- Ansari M.A., Khan H.M., Khan A.A., Cameotra S.S., Saquib Q., Musarrat J., 2014. Interaction of Al(2)O(3) nanoparticles with *Escherichia coli* and their cell envelope biomolecules. *J. Appl. Microbiol.* 116 (4), 772–83, <https://doi.org/10.1111/jam.12423>. doi:10.1111/jam.12423.
- Ansari S.A., Oves M., Satar R., Khan A., Ahmad S.I., Jafri M.A., 2017. Antibacterial activity of iron oxide nanoparticles synthesized by coprecipitation technology against *Bacillus cereus* and *Klebsiella pneumoniae*. *Polish J. Chem. Tech.* 19, 110–115, <https://doi.org/10.1515/pjct-2017-0076>.
- Arefi M.R., Rezaei-Zarchi S., Imani, S., 2012. Synthesis of ZnO nanoparticles and their antibacterial effects. *African J. Biotechnol.* 11(34), 8520–8526.
- Aromal S.A., Philip D., 2012. Green synthesis of gold nanoparticles using *Trigonella foenum-graecum* and its size dependent catalytic activity. *Spectrochim. Acta A* 97, 1–5, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.05.083>.
- Arreche R.A., Oca-Vásquez G.M., de Vega-Baudrit J.R., Vázquez P.G., 2018. Synthesis of silver nanoparticles using extracts from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) wastes. *Waste Biomass Valor.* 11, 245–253, <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0394-7>.
- Aseev L.V., Levandovskaya A.A., Tchufistova L.S., Scaptsova N.V., Boni I.V., 2008. A new regulatory circuit in ribosomal protein operons: S2-mediated control of the rpsB-tsfc expression *in vivo*. *RNA* 14, 1882–1894, <https://doi.org/10.1261/rna.1099108>.
- Ashour S.M., 2014. Silver nanoparticles as antimicrobial agent from *Kluyveromyces marxianus* and *Candida utilis*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3(8), 384–396.
- Aspanut Z., Yamada T., Lim L.V., Takeuchi T., 2008. Light-scattering and turbidimetric detection of silica colloids in size-exclusion chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 353, <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2017-9>.
- Ayaz-Ahmed K.B., Subramanian S., Sivasubramanian A., Veerappan G., Veerappan A., 2014. Preparation of gold nanoparticles using *Salicornia brachiata* plant extract and evaluation of catalytic and antibacterial activity. *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 130, 54–58, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.03.070>.
- Azam A., Ahmed A.S., Oves M., Khan M.S., Habib S.S., Memic A., 2012a. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *Int. J. Nanomedicine* 7, 6003–6009, <https://doi.org/10.2147/IJN.S35347>.
- Azam A.S., Ahmed M., Oves M., Khan A., 2012b. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. *Int. J. Nanomedicine*. 7, 3527, <https://doi.org/10.2147/IJN.S29020>.
- Azam Z., Ayaz A., Younas M., Qureshi Z., Arshad B., 2020. Microbial synthesized cadmium oxide nanoparticles induce oxidative stress and protein leakage in bacterial cells. *Microb. Pathog.* 144, 104188, <https://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104188>.
- Babele P.K., Thakre P.K., Kumawat R., Tomar R.S., 2018. Zinc oxide nanoparticles induce toxicity by affecting cell wall integrity pathway, mitochondrial function and lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere* 213, 65–75, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.028>.
- Bacia K., Kim S.A., Schwille P., 2006. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nat Methods*. 3(2), 83–9, <https://doi.org/10.1038/nmeth822>. PMID: 16432516.
- Bacri J.C., Cabuil V., Massart R., Perzynski R., Salin D., 1987. Ionic ferrofluids – optical properties. *J. Magn. Magn. Mater.* 65, 285–288, [https://doi.org/10.1016/0304-8853\(87\)90053-9](https://doi.org/10.1016/0304-8853(87)90053-9).

- Bai X., Li L., Liu H., Tan L., Liu T., Meng X., 2015. Solvothermal synthesis of ZnO nanoparticles and anti-infection application *in vivo*. ACS Appl. Mater. Interfaces 7, 1308–1317, <https://doi.org/10.1021/am507532p>.
- Balavandy S.K., Shameli K., Biak D.R.B.A., Abidin Z.Z., 2014. Stirring time effect of silver nanoparticles prepared in glutathionemediated by green method. Chem. Cent. J. 8, 11, <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-11>.
- Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S. K., 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. J. Pharm. Anal. 6(2), 71–79, <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- Bandyopadhyay S., Peralta-Videa J.R., Plascencia-Villa G., Jose-Yacamán M., Gardea-Torresdey J.L., 2012. Comparative toxicity assessment of CeO₂ and ZnO nanoparticles towards *Sinorhizobium meliloti*, a symbiotic alfalfa associated bacterium: use of advanced microscopic and spectroscopic techniques. J. Hazard. Mater. 241, 379–786, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.09.056>.
- Banerjee A., Qi J., Gogoi R., Wong J., Mitragotri S., 2016. Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. J. Control. Rel. 238, 176–185, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.051>.
- Bankier C., Cheong Y., Mahalingam S., Edirisinghe M., 2018. A comparison of methods to assess the antimicrobial activity of nanoparticle combinations on bacterial cells. PLoS ONE 13(2), e0192093, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192093>.
- Banoee M., Seif S., Nazari Z.E., Jafari-Fesharaki P., Shahverdi H.R., Moballegh A., Moghaddam K.M., Shahverdi A.R., 2005. ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. J. Biomed. Mater. Res. 93, 557–561, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31615>.
- Bao S., Lu Q., Fang T., Dai H., Zhang C., 2015. Assessment of the toxicity of CuO nanoparticles by using *Saccharomyces cerevisiae* mutants with multiple genes deleted. Appl. Environ. Microbiol. 81, 8098–8107, <https://doi.org/10.1128/AEM.02035-15>.
- Barnes W.L., Dereux A., Ebbesen T.W., 2003. Surface plasmon subwavelength optics., Nature 424, 824–830, <https://doi.org/10.1038/nature01937>.
- Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Turck M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45, 493–496, https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493
- Bayat N., Rajapakse K., Marinsek-Logar R., Drobne D., Cristobal S., 2014. The effects of engineered nanoparticles on the cellular structure and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Nanotoxicology. 8. 363–373, <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.788748>.
- Ben Moshe A., Markovich G., 2011. Synthesis of single crystal hollow silver nanoparticles in a fast reaction-diffusion process. Chem. Mater. 23, 1239–1245, <https://doi.org/10.1021/cm102991z>.
- Bera R.K., Mandal S.M., Raj R.C. 2014. Antimicrobial activity of fluorescent Ag nanoparticles. Lett. Appl. Microbiol. 58, 520–526, <https://doi.org/10.1111/lam.12222>.
- Binh N.T., Ly D.T., HueN. T., Quyen L.T., 2008. Silver nanoparticles prepared by laser ablation and their optical characteristics. J. Sci. Math. Phys. 24, 1–5.
- Bondarenko O., Ivask A., Käkinen A., Kahru A., 2012. Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: Kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action. Environ. Pollut. 169, 81–89, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.05.009>.
- Bondarenko O.M., Kuzmičiova S.M., Lina J.R., Kahru A., Daugelavičius R., 2018. Plasma membrane is the target of rapid antibacterial action of silver nanoparticles in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Nanomed. 13, 6779–6790, <https://doi.org/10.2147/IJN.S177163>.
- Bosovic B.O., 2007. Carbon nanotubes and nanofibres. Nanotechnol. Perceptions 3, 141–158.
- Bramhanwade K., Shende S., Bonde S., Gade A., Rai M., 2016. Fungicidal activity of Cu nanoparticles against *Fusarium* causing crop diseases. Environ. Chem. Lett. 14, 229–235, <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0543-1>.
- Brayner R., Ferrari-Iliou R., Brivois N., Djediat S., Benedetti M.F., Fiévet F., 2006. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. Nano Lett. 6(4), 866–870, <https://doi.org/10.1021/nl052326h>.
- Bresson S., Rousseau D., Ghosh S., Marssi M.E., Faivre V., 2011. Raman spectroscopy of the polymorphic forms and liquid state of cocoa butter. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 113, 992–1004, <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100088>.

- Bujak-Pietrek S., 2010. Narażenie na nanocząstki w środowisku pracy jako zagrożenie dla zdrowia. *Problemy oceny ekspozycji zawodowej*. *Med. Pracy* 61(2), 183–189.
- Bunjies H., 2011. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. *Curr. Op. Coll. Interface Sci.* 16, 405–411, <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2011.06.007>.
- Bustos A.R.M., Encinar J.R., Sanz-Medel A., 2013. Mass spectrometry for the characterisation of nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 5637–5643, <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7014-y>.
- Buzea C., Pacheco I.I., Robbie K., 2007. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Bioin-terphases* 2(4), MR17–MR71, <https://doi.org/10.1116/1.2815690>.
- Cademartiri L., Ozin G.A., 2011. *Nanochemia podstawowa. Koncepcje*. PWN.
- Canaparo R., Foglietta F., Limongi T., Serpe L., 2020. Biomedical applications of reactive oxygen species generation by metal nanoparticles. *Materials (Basel)*. 14, 1, 53, <https://doi.org/10.3390/ma14010053>.
- Cao V.D., Nguyen P.P., Khuong V.Q., Nguyen C.K., Nguyen X.C., Dang C.H., Tran N.Q., 2014. Ultrafine copper nanoparticles exhibiting a powerful antifungal/killing activity against *Corticium salmonicolor*. *Bull. Korean Chem. Soc.* 35, 2645–2648, <https://doi.org/10.5012/bkcs.2014.35.9.2645>.
- Caudill E.R., Hernandez R.T., Johnson K.P., O'Rourke J. T., Zhu L., Christy L., Haynes Z., Feng V., Pedersen J.A., 2020. Wall teichoic acids govern cationic gold nanoparticle interaction with Gram-positive bacterial cell walls (Edge Article). *Chem. Sci.* 11, 4106–4118, <https://doi.org/10.1039/C9SC05436G>.
- Celedón A., Aguilera J.M., 2002. Applications of microprobe raman spectroscopy in food science. *Food Sci. Technol. Int.* 8(2), 101–108, <https://doi.org/10.1106/108201302024208>.
- Chai H., Yao J., Sun J., Zhang C., Liu W., Zhu M., Ceccanti B., 2015. The effect of metal oxide nanoparticles on functional bacteria and metabolic profiles in agricultural soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94, 490–495, <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1716-2>.
- Chandra H., Patel D., Kumari P., Jangwan J.S., Yadav S., 2019. Phyto-mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles of *Berberis aristata*: Characterization, antioxidant activity and antibacterial activity with special reference to urinary tract pathogens. *Mater. Sci. Eng. C* 102, 212–220, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.035>.
- Chatterjee A.K., Chakraborty R., Basu T., 2014. Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology* 25(13), 135101, <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/13/135101>.
- Chaudhary R.G., Bhusari G.S., Tiple A.D., Rai A.R., Somkuvar S.R., Potbhare A.K., Lambat T.L., Ingle P.P., Abdala A.A., 2019. Metal/metal oxide nanoparticles: toxicity, applications, and future prospects. *Curr. Pharm. Des.* 25, 4013–4029, <https://doi.org/10.2174/1381612825666191111091326>.
- Chen F., Wang G., Griffin J.I., Brennenman B., Banda N.K., Holers V.M., Backos D.S., Wu L., Moghimi S., Simberg D., 2017. Complement proteins bind to nanoparticle protein corona and undergo dynamic exchange *in vivo*. *Nat. Nanotechnol.* 12, 387, <https://doi.org/10.1038/nnano.2016.269>.
- Chen F., Xiao Z., Yue L., Wang J., Feng Y., Zhu X., Wang Z., Xing B., 2019. Algae response to engineered nanoparticles: current understanding, mechanisms and implications. *Res. J. Environ. Sci.* 6, 1026–1042, <https://doi.org/10.1039/c8en01368c>.
- Cheon J.Y., Kim S.J., Rhee Y.H., Kwon O.H., Park W.H., 2019. Shape-dependent antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine*. 14, 2773–2780, <https://doi.org/10.2147/IJN.S196472>.
- Choi O., Yu C.P., Fernández G.E., Hu Z., 2010. Interactions of nanosilver with *Escherichia coli* cells in planktonic and biofilm cultures. *Water Res.* 44, 6095–6103, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.069>.
- Chwalibog A., Sawosz E., Hotowy A., Szeliga J., Mitura S., Mitura K., Grodzik M., Orłowski P., Sokolowska A., 2010. Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. *Int. J. Nanomed.* 6, 5, 1085–94, <https://doi.org/10.2147/IJN.S13532>.
- Cieślak M., Puchowicz D., Kamińska I., 2014. SEM/EDS and raman micro-spectroscopy examination of titanium-modified polypropylene fibres. *Fibres Text. East. Eur.* 22, 3(105), 47–53.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Zone diameter interpretive standards, corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretive breakpoints, and quality control limits for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Informational supplement M44-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

- Collins D., Luxton T., Kumar N., Shah S., Walker V.K., Shah V., 2012. Assessing the impact of copper and zinc oxide nanoparticles on soil: A field study. *PLoS ONE* 7(8), e42663, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042663>.
- Concha-Guerrero S.I., Brito E.M.S., Piñón-Castillo H.A., Tarango-Rivero C.A., Caretta A., Luna-Velasco R., Orrantia-Borunda E., 2014. Effect of CuO nanoparticles over isolated bacterial strains from agricultural soil. *J. Nanomater.* 13, <https://doi.org/10.21746/aps.2020.9.5.3>.
- Cordero T., Mohamed M.A., López-Moya J.J., Darñs J.A., 2017. A recombinant potato virus Y infectious clone tagged with the roseal visual marker (pvY-ros1) facilitates the analysis of viral infectivity and allows the production of large amounts of anthocyanins in plants. *Front. Microbiol.*, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00611>.
- Creighton J.A., Blatchford C.G., Albrecht M.G., 1979. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 75, 790.
- Cui X., Kim H.M., Kawashita M., Wang L., Xiong T., Kokubo T., Nakamura T., 2009. Preparation of bioactive titania films on titanium metal via anodic oxidation. *Dent. Mater. J.* 25(1), 80–86, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.04.012>.
- Cui Y., Zhao Y., Tian Y., Zhang W., Lü X., Jiang X., 2012. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biomaterials* 33, 2327–2333, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.057>.
- Cychosz K.A., Thommes M., 2018. Progress in the physisorption characterization of nanoporous gas storage materials. *Engineering* 4(4), 559–566, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.06.001>.
- Dakal T.C., Kumar A., Majumdar R.S., Yadav V., 2016. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Front. Microbiol.* 7, 1831, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>.
- Dallas P., Tucek J., Jancik D., Kolar M., Panacek A., Zboril R., 2010. Magnetically controllable silver nanocomposite with multifunctional phosphotriazine matrix and high antimicrobial activity. *Adv. Funct. Mater.* 20, 2347–2354, <https://doi.org/10.1002/adfm.200902370>.
- Datye A.K., 2003. Electron microscopy of catalysts: recent achievements and future prospects. *J. Catal.* 216, 144–154, [https://doi.org/10.1016/S0021-9517\(02\)00113-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9517(02)00113-6).
- Der-Chi T., Kuo-Hsiung T., Chih-Yu L., Der Chi T., Lung J.K., 2008. Colloidal silver fabrication using the spark discharge system and its antimicrobial effect on *Staphylococcus aureus*. *Med. Eng. Phys.* 30, 948–52, <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2007.10.007>.
- Devi H.S., Boda M.A., Shah M.A., Parveen S., Wani A.H., 2019. Green synthesis of iron oxide nanoparticles using *Platanus orientalis* leaf extract for antifungal activity. *Green Process. Synth.* 8, 38–45, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.11.422>.
- Devi L.S., Joshi S.R., 2014. Evaluation of the antimicrobial potency of silver nanoparticles biosynthesized by using an endophytic fungus, *Cryptosporiopsis ericae* PS4. *J. Microbiol.* 52, 667–674, <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4113-1>.
- Dietl T., 2006. Nanotechnologie przyszłości. *PAN Pr. Kom. Zagr. Cywil.* 7, 15–28.
- Ding F., Songkiatisak P., Cherukuri P.K., Huang T., Xu X.H.N., 2018. Size-dependent inhibitory effects of antibiotic drug nanocarriers against *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Omega* 3, 1231–1243, <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01956>.
- Dobre N., Petica A., Buda M., Anicai L., Visan T., 2014. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles in aqueous electrolytes. *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, 76, 4.
- Doktorovova S., Souto E.B., 2009. Nanostructured lipid carrier-based hydrogel formulations for drug delivery. A comprehensive review. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6, 165–176, <https://doi.org/10.1517/17425240802712590>.
- Dubchak S., Ogar A., Mietelski J.W., Turnau K., 2010. Influence of silver and titanium nanoparticles on arbuscular mycorrhiza colonization and accumulation of radiocaesium in *Helianthus annuus*. *Span. J. Agric. Res.* 8, S103–S108.
- Duran, N., Silveira C.P., Duran M., Martinez D.S., 2015. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. *J. Nanobiotechnol.* 13, <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0114-4>.
- Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L 275/38, 20.10.2011 [online], [http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:PL:PDF \[20.10.2021\]](http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:PL:PDF [20.10.2021]).

- Egger S., Lehmann R.P., Height M.J., Loessner M.J., Schuppler M., 2009. Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite material. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2973–2976, <https://doi.org/doi:10.1128/aem.01658-08>.
- El-Sawy M.M., Elsharkawy M.M., Abass J.M., Kasem M.H., 2017. Antiviral activity of 2-nitro-methyl phenol, zinc nanoparticles and seaweed extract against cucumber mosaic virus (CMV) in eggplant. *Antiviral Res.*, <https://doi.org/10.4172/2324-8955.1000173>.
- Elbeshehy E.K., Elazzazy A.M., Aggelis G., 2015. Silver nanoparticles synthesis mediated by new isolates of *Bacillus* spp., nanoparticle characterization and their activity against Bean Yellow Mosaic Virus and human pathogens. *Front. Microbiol.*, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00453>.
- Elgorban A.M., Aref S.M., Seham S.M., Elhindi K.M., Bahkali A.H., Sayed S.R., Manal M.A., 2016. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus versicolor* and evaluation of their activity on plant pathogenic fungi. *Mycosphere.* 7, 844–852, <https://doi.org/10.5943/mycosphere/7/6/15>.
- Elmer W., De La Torre-Roche R., Pagano L., Majumdar S., Zuverza-Mena N., Dimkpa C., Gardea-Torresdey J., White J.C., 2018. Effect of metalloids and metal oxide nanoparticles on *Fusarium wilt* of watermelon. *Plant Dis.* 102(7), 1394–1401, <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1621-RE>.
- Elshahawy I.E., Abouelnasr H.M., Lashin S.M., Darwesh O.M., 2016. First report of *Pythium aphanidermatum* infecting tomato in Egypt and controlling it using biogenic silver nanoparticles. *J. Plant Prot. Res.* 58(2), 137–151, <https://doi.org/10.24425/122929>.
- Elsner J., 2013. The Lycurgus cup. In: *New light on old glass: recent research on byzantine mosaics and glass*. British Museum Research, Publication No. 179, British Museum Press, Chapter 12.
- Erdem A.D., Metzler D.K., Huang C.P., 2015. The short-term toxic effects of TiO₂ nanoparticles toward bacteria through viability, cellular respiration, and lipid peroxidation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 17917–17924, <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5018-1>.
- Fayaz A.M., Balaji K., Girilal M., Yadav R., Kalaichelvan P.T., Venketesan R., 2010. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine* 6, 103–109, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.006>.
- Fazleeva R.R., Nasretidnova G.R., Osin Y.N., Yanilkin V.V., 2019. Mediated electrosynthesis of silver nanoparticles in a two-phase water-isooctane system. *Russ. Chem. Bull.* 68, 1525–1531, <https://doi.org/10.1007/s11172-019-2587-z>.
- Feng G., Cheng Y., Wang S.Y., Borca-Tasciuc D.A., Worobo R.W., Moraru C.I., 2015. Bacterial attachment and biofilm formation on surfaces are reduced by small-diameter nanoscale pores: how small is small enough? *NPJ Biofilms Microbiomes* 1, 15022-15031, <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2015.22>.
- Feris K., Otto C., Tinker J., Wingett D., Punnoose A., Thurber A., Kongara M., Sabetian M., Quinn B., Hanna C., Pink D., 2010. Electrostatic interactions affect nanoparticle-mediated toxicity to gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Langmuir* 26, 6, 4429–4436, <https://doi.org/10.1021/la903491z>.
- Fernandez E.J., Garcia-Barrasa J., Laguna A., Lopez-de-Luzuriaga J.M., Monge M., Torres C., 2008. The preparation of highly active antimicrobial silver nanoparticles by an organometallic approach. *Nanotechnology* 19, 185602, <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/18/185602>.
- Fernández-Iglesias N., Bettmer J., 2015. Complementary mass spectrometric techniques for the quantification of the protein corona: a case study on gold nanoparticles and human serum proteins. *Nanoscale* 7, 14324–14331.
- Filipe V., Hawe A., Jiskoot W., 2010. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm. Res.* 27(5), 796–810, <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>.
- Flemming H.C., Wingender J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
- Forestiere C., Miano G., Boriskina S.V., Dal Negro L., 2009. The role of nanoparticle shapes and deterministic aperiodicity for the design of nanoplasmonic arrays. *Opt. Express.* 17, 9648–9661. doi:10.1364/OE.17.009648.

- Frenk S., Ben-Moshe T., Dror I., Berkowitz B., Minz D., 2013. Effect of metal oxide nanoparticles on microbial community structure and function in two different soil types. *PLoS One* 8(12), e84441, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084441>.
- Friedman A., Blecher K., Sanchez D., Tuckman-Vernon C., Gialanella P., Friedman J.M., Nosanchuk, J.D., 2011. Susceptibility of Gram-positive and-negative bacteria to novel nitricoxide-releasing nanoparticle technology. *Virulence* 2, 217–221, <https://doi.org/10.4161/viru.2.3.16161>.
- Gaidhani S., Singh R., Singh D., Patel U., Shevade K., Yeshvekar R., Chopade B.A., 2013. Biofilm disruption activity of silver nanoparticles synthesized by *Acinetobacter calcoaceticus* PUCM 1005. *J. Mater. Sci. Lett.* 108, 324–327, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.07.023>.
- Gajbhiye M., Kesharwani J., Ingle A., Gade A., Rai M., 2009. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine: Nanotechnol. Biol. Med.* 5, 382–386, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.06.005>.
- Gan L., Zhang S., Zhang Y., He S., Tian Y., 2018. Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles by a halotolerant *Bacillus endophyticus* SCU-L. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 48(7), 582–588, <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1476880>.
- Gao W., Thamphiwatana S., Angsantikul P., Zhang L., 2014. Nanoparticle approaches against bacterial infections. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 6(6), 532–547, <https://doi.org/10.1002/wnan.1282>.
- Garcia-Saucedo C., Field J.A., Otero-Gonzalez L., Sierra-Alvarez R., 2011. Low toxicity of HfO₂, SiO₂, Al₂O₃ and CeO₂ nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Hazard. Mater.* 192, 1572–1579, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.06.081>.
- Gaumet M., Vargas A., Gurny R., Delie F., 2008. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.001>.
- Ge Y., Schimel J.P., Holden P.A., 2012. Identification of soil bacteria susceptible to TiO₂ and ZnO nanoparticles. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 6749–6758, <https://doi.org/10.1128/AEM.00941-12>.
- Gerber L.C., N. Moser N.A., Luechinger W.J., Stark R., Grass N., 2012. Phosphate starvation as an antimicrobial strategy: the controllable toxicity of lanthanum oxide nanoparticles. *Chem. Comm.* 48, 3869–3871, <https://doi.org/10.1039/c2cc30903c>.
- Ghasemian E., Naghoni A., Tabaraie B., Tabaraie T., 2012. *In vitro* susceptibility of filamentous fungi to copper nanoparticles assessed by rapid XTT colorimetry and agar dilution method. *Med. Mycol. J.* 22, 322–328, <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2012.09.006>.
- Giannousi K., Avramidis I., Dendrinos-Samara C., 2013. Synthesis, characterization and evaluation of copper based nanoparticles as agrochemicals against *Phytophthora infestans*. *RSC Advances* 3, 21743–21752, <https://doi.org/10.1039/c3ra42118j>.
- Gnanadhas D.P., Ben Thomas M., Thomas R., Raichur A.M., Chakravorty D., 2013. Interaction of silver nanoparticles with serum proteins affects their antimicrobial activity *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57, 10, 4945–4955, <https://doi.org/10.1128/aac.00152-13>.
- Gondil V.S., Kalaiyarasan T., Bharti V.K., Chhibber S., 2019. Antibiofilm potential of seabuckthorn silver nanoparticles (SBT@AgNPs) against *P. aeruginosa*. *Biotech.* 9, 402, <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1947-6>.
- Gou N., Onnis-Hayden A., Gu A.Z., 2010. Mechanistic toxicity assessment of nanomaterials by whole-cell-array stress genes expression analysis. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 44, 5964–5970, <https://doi.org/10.1021/es100679f>.
- Guerreiro-Tanomaru J.M., Trindade-Junior A., Costa B.C., da Silva G.F., Drullis Cifali L., Basso Bernardi M.I., Tanomaru-Filho M., 2014. Effect of zirconium oxide and zinc oxide nanoparticles on physicochemical properties and antibiofilm activity of a calcium silicate-based material. *Sci. World J.*, 975213, <https://doi.org/10.1155/2014/975213>.
- Gupta R., Rousseau D., 2012. Surface-active solid lipidnanoparticles as Pickering stabilizers for oil in water emulsions. *Food Funct.* 3, 302–311, <https://doi.org/10.1039/c2fo10203j>.
- Gutierrez F.M., Olive P.L., Banuelos A., Orrantia E., Nino N., Sanchez E.M., Ruiz F., Bach H., Av-Gay Y., 2010. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine-NBM* 6, 681–688, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.02.001>.

- Habash M.B., Park A.J., Vis E.C., Harris R.J., Khursigara C.M., 2014. Synergy of silver nanoparticles and aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5818–5830, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.03170-14>.
- Habimana O., Zanoni M., Vitale S., O'Neill T., Scholz D., Xu B., Casey E., 2018. One particle, two targets: A combined action of functionalised gold nanoparticles, against *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *J. Colloid Interface Sci.* 526, 419–428, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.05.014>.
- Hachicho N., Hoffmann P., Ahlert K., Heipieper H.J., 2014. Effect of silver nanoparticles and silver ions on growth and adaptive response mechanisms of *Pseudomonas putida* mt-2 FEMS. *FEMS Microbiol. Lett.* 355, 71–77, <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12460>.
- Hah H.J., Koo S.M., Lee S.H., 2003. Preparation of silver nanoparticles through alcohol reduction with organoalkoxysilanes. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 26, 467–471, <https://doi.org/10.1023/A:1020710307359>.
- Haque M.H., 2006. Application of the month: Carbon Nanotubes Sensors, Nano Sprint. CNT.
- Hartel R.W., 2013. Advances in food crystallization. *Food Sci. Technol. Annu Rev.* 4, 2770292, <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182530>.
- Hassan A.A., Howayda M.E., Mahmoud H.H., 2013. Effect of zinc oxide nanoparticles on the growth of mycotoxigenic mould. *SCPT.* 1, 66–74.
- He S., Feng Y., Ren H. Zhang Y., Gu N., Lin X., 2011. The impact of iron oxide magnetic nanoparticles on the soil bacterial community. *J. Soils Sedim.* 11, 1408–1417, <https://doi.org/10.1007/s11368-011-0415-7>.
- He T., Liu H., Zhou Y., Yang J., Cheng X., Shi H., 2014a. Antibacterial effect and proteomic analysis of graphenebased silver nanoparticles on a pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomaterials* 27, 673–682, <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9756-1>.
- He W., Kim H.K., Wamer W.G., Melka D., Callahan J.H., Yin J.J., 2014b. Photogenerated charge carriers and reactive oxygen species in ZnO/Au hybrid nanostructures with enhanced photocatalytic and antibacterial activity. *J. Am. Chem. Soc.* 136(2), 750–757, <https://doi.org/10.1021/ja410800y>.
- He S., Feng Y., Ni J., Sun Y., Xue L., Feng Y., Yu Y., Lin X., Yang L., 2016. Different responses of soil microbial metabolic activity to silver and iron oxide nanoparticles. *Chemosphere* 147, 195–202, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00823>.
- Hegde K., Brar S.K., Verma M., Surampalli R., 2016. Current understandings of toxicity, risks and regulations of engineered nanoparticles with respect to environmental microorganisms. *Nanotechnol. Environ. Eng.* 1, 5, <https://doi.org/10.1007/s41204-016-0005-4>.
- Hemeg H.A., 2017. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *Int. J. Nanomedicine* 12, 8211–8225, <https://doi.org/10.2147/IJN.S132163>.
- Hengzhuang W., Wu H., Ciofu O., Song Z., Høiby N., 2012. *In vivo* pharmacokinetics/ pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 56, 2683–2690, <https://doi.org/10.1128/AAC.06486-11>.
- Hetrick E.M., Shin J.H., Paul H.S., Schoenfisch M.H., 2009. Anti-biofilm efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *Biomaterials* 30, 2782–2789, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.052>.
- Hochella M.F. Jr, Spencer M.G., Jones K.L., 2015. *Environ Sci. Nano.* 2, 114–119, <https://doi.org/10.1039/C4EN00145A>.
- Holden P.A., Schimel J.P., Godwin H.A., 2014. Five reasons to use bacteria when assessing manufactured nanomaterial environmental hazards and fates. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 73–78, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.11.008>.
- Hossain M.M., Polash S.A., Takikawa M., Shubhra R.D., Saha T., Islam Z., Hossain S., Hasan M.A., Takeoka S., Sarker S.R., 2019. Investigation of the antibacterial activity and *in vivo* cytotoxicity of biogenic silver nanoparticles as potent therapeutics. *Biotechnol. Bioeng.* 7, 239, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00239>.
- Hosseinkhani P.A., Zand S., Imani M., Rezayi S., 2011. Determining the antibacterial effect of ZnO nanoparticle against the pathogenic bacterium, *Shigella dysenteriae* (type 1). *Int. J. Nano Dimens.* 1, 279–285, <https://doi.org/10.7508/IJND.2010.04.006>.
- Hsiao I-Lun, Hsieh Yi-Kong, Wang Chu-Fang, Chen I-Chieh, Huang Yuh-Jeen, 2015. Trojan-horse mechanism in the cellular uptake of silver nanoparticles verified by direct intra- and

- extracellular silver speciation analysis. *Environ. Sci. Technol.* 49, 6, 3813–3821. doi: 10.1021/es504705p
- Huang Z., He K., Song Z., Huang Yi., Li S., Mao Y., Harry, Ploehn J., Bao Y., Yu M., 2018. Antioxidative response of *Phanerochaete chrysosporium* against silver nanoparticle-induced toxicity and its potential mechanism. *Chemosphere*. 211, 573–583, <https://doi.org/10.2147/IJN.S355131>.
- Huangfu X., Xua Y. Liua C., Hea Q., Mab J., Maa Ch., Huanga R., 2019. A review on the interactions between engineered nanoparticles with extracellular and intracellular polymeric substances from wastewater treatment aggregates. *Chemosphere* 219, 766–783, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.044>.
- Hunt L.B., 1976. The true story of purple of Cassius. *Gold Bull.* 9 (4), 134–139, <https://doi.org/10.1007/BF03215423C>.
- Huq M.A., Akter S., 2021. Biosynthesis, characterization and antibacterial application of novel silver nanoparticles against drug resistant pathogenic *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella enteritidis*. *Molecules* 26, 5996, <https://doi.org/10.3390/molecules26195996>.
- Hwang G., Liu Y., Kim D., Li Y., Krysan D.J., Koo H., 2017. *Candida albicans* mannans mediate *Streptococcus mutans* exoenzyme GtfB binding to modulate cross-kingdom biofilm development *in vivo*. *PLOS Pathog.* 13(6), e1006407 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006407>.
- Iravani S., 2011. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.* 13, 2638–2650, <https://doi.org/10.1039/C1GC15386B>.
- Iravani S., Korbekandi H., Mirmohammadi S.V., Zolfaghari B., 2014. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res Pharm Sci.* 9(6), 385–406.
- Ishida K., Cipriano T.F., Rocha G.M., Weissmüller G., Gomes F., Miranda K., Rozental S., 2013. Silver nanoparticle production by the fungus *Fusarium oxysporum*: nanoparticle characterization and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109(2), 1–9, <https://doi.org/10.1590/0074-0276130269>.
- ISO/TS 27687:2008. Nanotechnologies — Terminology and definitions for nanoobjects — nanoparticle, nanofibre and nanoplate.
- Ivask A., El Badawy A., Kaweeteerawat C., Boren D., Fischer H, Ji Z., Ji Z., Chang Ch. H., Liu R., Tolaymat T., Telesca D., Zink J. I., Cohen Y., Holden P.A., 2014. Toxicity mechanisms in *Escherichia coli* vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver. *ACS Nano.* 8, 374–386, <https://doi.org/10.1021/nn4044047>.
- Jabłoński A., Zębek S., Mokrzycka A., 2010. Wybrane mechanizmy oporności bakterii na chemioterapeutyki. *Med. Weter.* 66, 7, 449–452.
- Jacobson K.H., Gunsolus I.L., Kuech T.R., Troiano J.M., Melby E.S., Lohse S.E., Hu D., Chrisler B.W., Murphy C.J., Orr G., Geiger F.M., Haynes Ch.L., Joel A. Pedersen J.A., 2015. Lipopolysaccharide density and structure govern the extent and distance of nanoparticle interaction with actual and model bacterial outer membranes. *Environ. Sci. Technol.* 49(17), 10642–10650, <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01841>.
- Jamdagni P., Khatri P., Rana J.S., 2018. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract of *Nyctanthes arbor-tristis* and their antifungal activity. *J. King Saud Univ. Sci.*, <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.10.002>.
- Jamieson T., Bakhshi R., Petrova D., Pocock R., Imani M., Seifalian A.M., 2007. Biological applications of quantum dots. *Biomaterials* 28, 4717–4732, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.014>.
- Jampílek J., Kráľová K., 2018. Benefits and potential risks of nanotechnology applications in crop protection. In: K. Abd-Elsalam, R. Prasad (eds), *Nanobiotechnology Applications in Plant Protection. Nanotechnology in the Life Sciences*, Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91161-8_8.
- Jana N.R., Gearheart L., Murphy C.J., 2001. Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio. Electronic supplementary information (ESI) available: UV–VIS spectra of silver nanorods. *Chem. Commun.* 617–618, <https://doi.org/10.1039/b100521i>.
- Jayaseelan C., Ramkumar R., Rahuman A.A., Perumal P., 2013. Green synthesis of gold nanoparticles using seed aqueous extract of *Abelmoschus esculentus* and its antifungal activity. *Ind. Crops Prod.* 45, 423–429, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.019>.

- Jeevanandam J., Barhoum A., Chan Y.S., Dufresne A., Danquah M.K., 2018. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J. Nanotechnol.* 9, 1050–1074, <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>.
- Jeong Y., Lim D.W., Choi J., 2014. Assessment of size-dependent antimicrobial and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *Adv. Mater. Sci. Eng.* ID 763807, <https://doi.org/10.1155/2014/763807>.
- Jiang L.P., Wang A.N., Zhao Y., Zhang J.R., Zhu J.J., 2004. A novel route for the preparation of monodisperse silver nanoparticles via a pulsed sonoelectrochemical technique. *Inorg. Chem. Commun.* 7, 506–509, <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2004.02.003>.
- Jiang W., Mashayekhi H., Xing S., 2009. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environ. Pollut.* 157, 1619–1625, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.025>.
- Jin R., Cao Y., Mirkin C.A., Kelly K.L., Schatz G.C., Zheng J.G., 2001. Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. *Sci.* 294, 1901–1903, <https://doi.org/10.1126/science.1066541>.
- Jing H., Mezgebe B., Hassan A.A., Sahle-Demessie E., Sorial G.A., Bennett-Stamper C., 2014. Experimental and modeling studies of sorption of ceria nanoparticle on microbial biofilms. *Bioresour. Technol.* 161, 109–117, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.015>.
- John M.S., Nagoth J.A., Ramasamy K.P., Mancini A., Giuli G., Nataello A., Ballarini P., Miceli C., Pucciarelli S., 2020. Synthesis of bioactive silver nanoparticles by a *Pseudomonas* strain associated with the antarctic psychrophilic protozoan *euplotes focardii*. *Mar. Drugs.* 18(1), 38, <https://doi.org/10.3390/md18010038>.
- Joo S.H., Aggarwal S., 2018. Factors impacting the interactions of engineered nanoparticles with bacterial cells and biofilms: Mechanistic insights and state of knowledge. *Environ. Manag. Today.* 225, 62–74, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.084>.
- Jung J., Oh H., Noh H., Ji J., Kim S., 2006. Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area. *J. Aerosol. Sci.*, 37, 1662–1670, <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2006.09.002>.
- Kaasalainen M., Aseyev V., von Haartman E., Karaman D.Ş., Mäkilä E., Tenhu H., Salonen J. 2017. Size, stability, and porosity of mesoporous nanoparticles characterized with light scattering. *Nanoscale Res. Lett.* 12, 74, <https://doi.org/10.1186/s11671-017-1853-y>.
- Kagawa J., 2002. Health effects of diesel exhaust emissions a mixture of air pollutants of worldwide concern. *Toxicology* 181–182, 349–53, [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00461-4](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00461-4).
- Kala A., Soosairaj S., Mathiyazhagan S., Raja P., 2016. Green synthesis of copper bionanoparticles to control the bacterial leaf blight disease of rice. *Curr. Sci.* 110, 2011–2014, <https://doi.org/10.18520/cs/v110/i10/2005-2011>.
- Kalboush Z.A., Hassan A.A., Gabr W.E., 2016. Control of rice blast and brown spot diseases by synthesized zinc oxide nanoparticles. *Egypt. J. Biol. Pest Control.* 26(4), 713–720.
- Kandi V., Kandi S., 2015. Antimicrobial properties of nanomolecules: potential candidates as antibiotics in the era of multi-drug resistance. *Epidemiol. Health.* 37, e2015020-0, <https://doi.org/10.4178/epih/e2015020.24>.
- Karimiyan A., Najafzadeh H., Ghorbanpour M., 2015. Antifungal effect of magnesium oxide, zinc oxide, silicon oxide and copper oxide nanoparticles against *Candida albicans*. *Zahedan J. Res. Med. Sci.* 17, 29–31, <https://doi.org/10.17795/zjrms-2179>.
- Kasprovicz M.J., Koziol M., Gorczyca A., 2010. The effect of silver nanoparticles on phytopathogenic spores of *Fusarium culmorum*. *Can. J. Microbiol.* 56, 247–253, <https://doi.org/10.1139/w10-012>.
- Kelsal R.W., Hamley I.W., Geoghegan M., 2008. Nanotechnology. PWN, Warszawa.
- Kendall M., Hodges N.J., Whitwell H., Tyrrell J., Cangul H., 2015. Nanoparticle growth and surface chemistry changes in cell-conditioned culture medium. *Proc. R. Soc. B: Biol.* 370(1661), <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0100>.
- Khan N.U., Ahmad A., Tahir K., Khan Z.U.H., Khan A.U., 2017. Visible light inactivation of *E. coli*, cytotoxicity and ROS determination of biochemically capped gold nanoparticles. *Microb. Pathog.* 107, 419–424, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.04.024>.

- Khan S.S., Mukherjee A., Chandrasekaran N., 2011. Studies on interaction of colloidal silver nanoparticles (SNPs) with five different bacterial species. *Colloids Surf. B* 87(1), 129–138, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.05.012>.
- Kim H.S., Kang H.S., Chu G.J., Byun H.S., 2008a. Antifungal effectiveness of nanosilver colloid against rose powdery mildew in greenhouses. *Solid State Phenom.* 135, 15–18, <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/ssp.135.15>.
- Kim K.J., Sung W.S., Moon S.K., Moon, Choi J.S., Kim J. G., Gun Lee D.G., 2008b. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1482–1484, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>.
- Kim S.W., Kim K.S., Lamsal K., Kim Y.J., Kim S.B., Jung M., Sim S.J., Kim H.S., Chang S.J., Kim J.K., Lee Y.S., 2009. An *in vitro* study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaella* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 760–764, <https://doi.org/10.4014/jmb.0812.649>.
- Kim S.W., Jung J.H., Lamasal K., Kim Y.S., Min J.S., Lee Y.S., 2012. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology* 40, 53–58, <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.053>.
- Kim T., Zhang Q., Li J., Zhang L., Jesse V. Jøkerst J.V., 2018. A gold/silver hybrid nanoparticle for treatment and photoacoustic imaging of bacterial infection. *ACS Nano*, 12 (6), 5615–5625, <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01362>.
- Kirschner K.N., Lins R.D., Maass A., Soares T.A., 2012. A glycam – based force field for simulations of lipopolysaccharide membranes: parametrization and validation. *J. Chem. Theory Comput.* 8, 4719–4731, <https://doi.org/10.1021/ct300534j>.
- Koebnik R., Locher K.P., van Gelder P., 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels and nutshell. *Mol. Microbiol.* 37, 239–253, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01983.x>.
- Köhler J.M., Abahmane L., Wagner J., Albert J., Mayer G., 2008. Preparation of metal nanoparticles with varied composition for catalytical applications in microreactors. *Chem. Engin. Sci.* 63(20), 5048–5055, <https://doi.org/10.1016/j.ces.2007.11.038>.
- Kourmouli A., Valenti M., van Rijn E., Beaumont H.J.E., Kalantzi O.I., Schmidt-Ott A., Bisko G., 2018. Can disc diffusion susceptibility tests assess the antimicrobial activity of engineered nanoparticles? *J. Nanopart. Res.* 20, 62, <https://doi.org/10.1007/s11051-018-4152-3>.
- Krajczewski J., 2018. Uruchamiana przez rezonans plazmonowy synteza różnych nanostruktur ze srebra. Praca doktorska. Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii, <https://depotuw.ceon.pl/handle/item/2740>.
- Krajczewski J., Kudelski A., 2015. Fotochemiczna synteza nanocząstek srebra i złota. *Wiad. Chem.* 69, 3.
- Krueger K.M., Al-Somali A.M., Falkner J.C., Colvin V.L., 2005. Characterization of nanocrystalline CdSe by size exclusion chromatography. *Anal. Chem.* 77(11), 3511–3515, <https://doi.org/10.1021/ac0481912>.
- Kumar A., Pandey A.K., Singh S.S., Shanker R., Dhawan A., 2011a. Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells. *Chemosphere* 83, 1124–1132, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.025>.
- Kumar N., Shah V., Walker V.K., 2011b. Perturbation of an arctic soil microbial community by metal nanoparticles. *J. Hazard. Mater.* 190, 816–822, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.04.005>.
- Kumar N.G., Pandey S.D., Mallick S., Ghosh S.K., Pramanik P., Ghosh A.S. 2020. Thiol stabilized copper nanoparticles exert antimicrobial properties by preventing cell division in *Escherichia coli*. *Indian J. Biochem. Biophys.* 57(04), 151–157.
- Kuntyi O., Shepida A., Sozanskyi M., Sukhatskyi Y., Mazur A., Andriy K., Bazylyak L., 2021. Sono-electrochemical synthesis of silver nanoparticles in sodium polyacrylate solution. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 11, 12202–12214, <https://doi.org/10.33263/BRIAC114.1220212214>.
- Kurzydłowski K., Lewandowska M., 2011. Nanomateriały inżynierskie konstrukcyjne i funkcjonalne. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.

- Lamsal K., Kim S.W., Jung J.H., Kim Y.S., Kim K.S., Lee Y.S., 2011. Application of silver nanoparticles for the control of *Colletotrichum* species *in vitro* and pepper anthracnose disease in field. *Mycobiology* 39, 194–199, <https://doi.org/10.5941/MYCO.2011.39.3.194>.
- Landini P., Antoniani D., Burgess J.G., Nijland R., 2010. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 813–823, <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2468-8>.
- Lara H.H., Ayala-Núñez N.V., Turrent L.C.I., 2010. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 615–621, <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0211-3> 2010.
- Lara H.H., Romero-Urbina D.G., Pierce C., Lopez-Ribot J.L., Arellano-Jiménez M.J., Jose-Yacamán M., 2015. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. *J. Nanobiotechnol.* 13, 91, <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0147-8>.
- Lee J.H., Gibson K.J., Chen G., Weizmann Y., 2015. Bipyramid templated synthesis of monodisperse anisotropic gold nanocrystals. *Nat. Commun.* 6, 1–9.
- Lee K.J., Park S.H., Govarthanan M., Hwang P.H., Seo Y.S., Cho M., Lee W.H., Lee J.Y., Kamala-Kannan S., Oh B.T., 2013. Synthesis of silver nanoparticles using cow milk and their antifungal activity against phytopathogens. *Mater. Lett.* 105, 128–131, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.04.076>.
- Lee N.Y., Ko W.C., Hsueh P.R., 2019. Nanoparticles in the treatment of infections caused by multidrug-resistant organisms. *Front. Pharmacol.* 10, 1153, <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01153>.
- Lee P.C., Meisel D.J., 1982. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *Phys. Chem.* 86, 3391, <https://doi.org/10.1021/j100214a025>.
- Lefebure D., Cabuil N.M., 1998. Monodisperse magnetic nanoparticles: preparation and dispersion in water and oils. *J. Mater.* 13, 2975–2981.
- Leid J.G., Ditto A.J., Knapp A., et al., 2012. *In vitro* antimicrobial studies of silver carbene complexes: activity of free and nanoparticle carbene formulations against clinical isolates of pathogenic bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 67(1), 138–148, <https://doi.org/10.1093/jac/dkr408>.
- Leung Y.H., Ng A.M.C., Xu X., Shen Z., 2014. Gethingsl L.A., Mechanisms of antibacterial activity of MgO: non-ROS mediated toxicity of MgO nanoparticles towards *Escherichia coli*. *Small.* 10, 6, 1171–1183, <https://doi.org/10.1002/smll.201302434>.
- Leung Y.H., Xu X., Ma A.P.Y., Liu F., Ng A.M.C., Shen Z., 2016. Toxicity of ZnO and TiO₂ to *Escherichia coli* cells. *Sci. Rep.* 6, 35243, <https://doi.org/10.1038/srep35243>.
- Li W.R., Xie X.B., Shi Q.S., Zen H-Y., Ou-Yang Y-S., Chen Y-B., 2010. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1115–1122, <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2159-5>.
- Li M., Pokhrel S., Jin X., Madler L., Damoiseaux R., Hoek E.M.V., 2011. Stability, bioavailability, and bacterial toxicity of ZnO and iron-doped ZnO nanoparticles in aquatic media. *Environ. Sci. Technol.* 45(2), 755–761, <https://doi.org/10.1021/es102266g>.
- Li K., Zhao X., Hammer B.K., Du S., Chen Y., 2013. Nanoparticles inhibit DNA replication by binding to DNA. modelling and experimental validation. *ACS Nano.* 7, 9664–74, <https://doi.org/10.1021/nn402472k>.
- Li J., Zhou H., Qian S., Liu Z., Feng J., Jin P., Liu X., 2014. Plasmonic gold nanoparticles modified titania nanotubes for antibacterial application. *Appl. Phys. Lett.* 104, 261110, <https://doi.org/10.1063/1.4885401>.
- Li H., Chen Q., Zhao J., Urmila K., 2015. Enhancing the antimicrobial activity of natural extraction using the synthetic ultrasmall metal nanoparticles. *Sci. Rep.* 5, 11033, <https://doi.org/10.1038/srep11033>.
- Li T., Senesi A.J., Lee B., 2016. Small angle X-ray scattering for nanoparticle research. *Chem Rev.* 116(18), 11128–80, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00690>.
- Liao S., Zhang Y., Pan X., Zhu F., Jiang C., Liu Q., Cheng Z., Dai G., Wu G., Wang L., Chen L., 2019. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Nanomed.* 14, 1469–1487, <https://doi.org/10.2147/IJN.S191340>.

- Lili H., Yang L., Mustapha A., Lin M., 2011. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiol. Res.* 166, 207–215, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.03.003>.
- Link S., El-Sayed M.A., 1999. Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods. *J. Phys. Chem. B.* 103(40), 8410–8426, <https://doi.org/10.1021/jp9917648>.
- Liu S., Huang W., Chen S., Avivi S., Gedanken A., 2001. Synthesis of X-ray amorphous silver nanoparticles by the pulse sonoelectrochemical method. *J. Non-Cryst. Solids*, 283, 231–236, [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(01\)00362-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(01)00362-3).
- Liu Z., Zhang M., Han X., Xu H., Zhang B., Yu Q., Li M., 2016. TiO₂ nanoparticles cause cell damage independent of apoptosis and autophagy by impairing the ROS-scavenging system in *Pichia pastoris*. *Chem. Biol. Interact.* 252, 9–18, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.029>.
- Liu Y.J., He L.L., Mustapha A., Li H., Hu Z.Q., Lin, M.S., 2009. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157: H7. *J. Appl. Microbiol.* 107(4), 1193–1201.
- Lok C.N., Ho C.M., Chen R., He Q.Y., Yu W.Y., Sun H., Kwong-Hang P., Chiu T.J., 2006. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J. Proteome Res.* 5, 916–924, <https://doi.org/10.1021/pr0504079>.
- Loo Y.Y., Rukayadil Y., Nor-Khaizura M.A.R., Kuan C.H., Chieng B. W., Nishibuchi M., Radu S., 2018. *In vitro* antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles against selected gram-negative foodborne pathogens. *Front. Microbiol.* 9, 1555, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01555>.
- López-Carballo G., Gómez-Estaca J., Catalá R., Hernández-Muñoz P., Gavara R., 2012. Active antimicrobial food and beverage packaging. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, <https://doi.org/10.1533/9780857095664.1.27>.
- Lu W., Lieber C.M., 2007. Nanoelectronics from the bottom up. *Nat. Mater.* 6, 841–850, [10.1038/nmat2028](https://doi.org/10.1038/nmat2028).
- Mafuné F., Kohno J., Takeda Y., Kondow T., Sawabe H., 2000. Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B* 104, 9111–9117. <https://doi.org/10.1021/jp001336y>.
- Magnusson K.E., Bayer M.E., 1982. Anionic sites on the envelope of *Salmonella typhimurium* mapped with cationized ferritin. *Cell Biophys.* 4, 163–75, <https://doi.org/10.1007/BF02918311>.
- Mah T.F., 2012. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 7, 1061–72, <https://doi.org/10.2217/fmb.12.76>.
- Majumdar T.D., Singh M., Thapa M., Dutta M., Singha M., Thapaa M., Duttad M., Mukherjee A., Ghosh Ch.K., 2019. Size-dependent antibacterial activity of copper nanoparticles against *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. A synthetic and mechanistic approach. *Colloids Interface Sci. Commun.* 32, 100190, <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2019.100190>.
- Mallmann E.J.J., Cunha F.A., Castro B.N.M.F., Maciel A.M., Menezes E.A., 2015. Antifungal activity of silver nanoparticles obtained by green synthesis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 57(2), 165–167, <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000200011>.
- Márquez I.G., Ghiyasvand M., Massarsky A, Babu M., Samanfar B., Omid K., Moon T.W., Smith M.L., Golshani A., 2018. Zinc oxide and silver nanoparticles toxicity in the baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 13(3), e0193111, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193111>.
- Martínez-Castañón G.A., Niño-Martínez N., Martínez-Gutierrez F., Martínez-Mendoza J.R., Ruiz F., 2008. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J Nanopart Res.* 10, 1343–1348, <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9428-6>.
- Maurer-Jones M.A., Gunsolus I.L., Meyer B.M., Christenson C.J., Haynes C.L., 2013. Impact of TiO₂ nanoparticles on growth, biofilm formation, and flavin secretion in *Shewanella oneidensis*. *Anal. Chem.* 85(12), 5810–5818, <https://doi.org/10.1021/ac400486u>.
- McClements D.J., 2007. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 47(7), 611–49, <https://doi.org/10.1080/10408390701289292>.

- McQuillan J.S., Shaw A.M., 2014. Differential gene regulation in the Ag nanoparticle and Ag⁺-induced silver stress response in *Escherichia coli*: a full transcriptomic profile. *Nanotoxicology* 8, 177–184, <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.870243>.
- McWilliams A., 2017. Global markets for nanocomposites, nanoparticles, nanoclays, and nanotubes. NAN021G, Global Markets, BBC Research Report.
- Medina A., Lambert R.J.W., Magan N., 2012. Rapid throughput analysis of filamentous fungal growth using turbidimetric measurements with the Bioscreen C: a tool for screening antifungal compounds. *Fungal Biol.* 116, 161–169, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.11.001>.
- Meghana S., Kabra P., Chakraborty S., Padmavathy N., 2015. Understanding the pathway of antibacterial activity of copper oxide nanoparticles. *RSC Adv.* 5, 12293–9. <https://doi.org/10.1039/C4RA12163E>.
- Mikhailova E.O., 2020. Silver nanoparticles: mechanism of action and probable bio-application. *J. Funct. Biomater.* 11, 84, <https://doi.org/10.3390/jfb11040084>.
- Mirzajani F., Askari H., Hamzelou S., Farzaneh M., Ghassempour A., 2013. Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 88, 48–54, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.018>.
- Mirzajani F., Ghassempour A., Aliahmadi A., Esmaili M.A., 2011. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Res.* 2011; 162, 542–9, <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.04.009>.
- Miyazawa T., Itaya M., Burdeos G.C., Nakagawa K., Miyazawa T., 2021. A critical review of the use of surfactant-coated nanoparticles in nanomedicine and food nanotechnology. *Int. J. Nanomed.* 16, 3937–3999, <https://doi.org/10.2147/IJN.S298606>.
- Mocek-Płóćiniak A., 2011. Wpływ metali ciężkich na mikroorganizmy oraz aktywność enzymatyczną gleby. *Rocz. Glebozn.* 4, 211–220.
- Modena M.M., Rühle B., Burg T.P., Wuttke S., 2019. Nanoparticle characterization: what to measure? *Adv. Mater.* 31, 1901556, <https://doi.org/10.1002/adma.201901556>.
- Mohamed A.A., Mohamed F.M., El-Rafie M.H., 2013. Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles by some yeast fungi. *Egypt. J. Chem.* 56, 91–110.
- Mondal K.K., Mani C., 2012. Investigation of the antibacterial properties of nanocopper against *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*, the incitant of pomegranate bacterial blight. *Ann. Microbiol.* 62, 889–893, <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0382-7>.
- Moreno-Martin G., Sanz-Landaluze J., Madrid Y., 2017. In: *Encyclopedia of analytical chemistry*, R.A. Meyers (ed.), John Wiley & Sons, Chichester, 1–24.
- Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T., Yacaman M.J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346–2353, <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>.
- Nagy A., Harrison A., Sabbani S., Munson R.S. Jr, Dutta P.K., Waldman W.J., 2011. Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes: release of silver ions and mechanism of antibacterial action. *Int. J. Nanomed.* 6, 1833–1852, <https://doi.org/10.2147/IJN.S24019>.
- Nair S., Sasidharan A., Rani V.V.D., Menon D., Nair S., Manzoor K., 2009. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *J. Mater. Sci.* 235–241, <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3548-5>.
- Nasrollahi A., Pourshamsian K.H., Mansourkiaee P., 2011. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. *Int. J. Nano. Dimens.* 1(3), 233–239, <https://doi.org/10.7508/ijnd.2010.03.007>.
- Nehra P., Chauhan R.P., Garg N., Verma K., 2018. Antibacterial and antifungal activity of chitosan coated iron oxide nanoparticles. *Br. Appl. Environ. Microbiol.* 75, 13–18, <https://doi.org/10.1080/09674845.2017.1347362>.
- Nel A., Xia T., Madler L., Li N., 2007. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622–627, <https://doi.org/10.1126/science.111439>.
- Neumeyer A., Bukowski M., Veith M., Lehr C.M., Daum, N., 2011. Propidium iodide labeling of nanoparticles as a novel tool for the quantification of cellular binding and uptake. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 7(4), 410–419.
- Ninganagouda S., Rathod V., Singh D., 2014. Characterization and biosynthesis of silver nanoparticles using a fungus *Aspergillus niger*. *Int. Lett. Nat. Sci.* 15, 49.

- Oh N., Park J.H., 2014. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int. J. Nanomed.* 9, 51–63, <https://doi.org/10.2147/IJN.S26592>.
- Qin H., Cao H., Zhao Y., Zhu C., Cheng T., Wang Q., Peng X., Cheng M., Wang J., Jin G., Jiang Y., Zhang X., Liu X., Chu P., 2014. *In vitro* and *in vivo* anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium. *Biomaterials* 35, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.040>.
- Olszewska M., Kocot A., Łaniewska-Trokenheim Ł. 2016. Analiza cytometryczna w mikrobiologicznych badaniach żywności. *Med. Weter.* 72, 162–167.
- Orendorff C.J., Sau T.K., Murphy C.J., 2006. Shape-dependent plasmon-resonant gold nanoparticles. *Small*, 2(5), 636–639, <https://doi.org/10.1002/sml.200500299>.
- Otero-Gonzalez L., Garcia-Sau,edo C., Field J.A., Sierra-Alvarez R., 2013. Toxicity of TiO₂, ZrO₂, Fe₀, Fe₂O₃, and Mn₂O₃ nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere* 93, 1201–1206, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.075>.
- Oves M., Rauf M.A., Hussain A., Qari A.H., Parwaz Khan A.A., Muhammad P., Rehman M.T., Alajmi M.F., Ismail I.I.M., 2019. Antibacterial silver nanomaterial synthesis from *Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens* and targeting biofilm formation. *Front. Pharmacol.* 10, 801, <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00801>.
- Padalia H., Chanda S., 2017. Characterization, antifungal and cytotoxic evaluation of green synthesized zinc oxide nanoparticles using *Ziziphus nummularia* leaf extract. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 45(8), 1751–1761, <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1282868>.
- Padmavathy N., Vijayaraghavan R., 2008. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles – an antimicrobial study. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 9, 1–7, <https://doi.org/10.1088/1468-6996/9/3/035004>.
- Pal S., Tak J.M., Song J.M., 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1712–1720, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02218-06>.
- Panáček A., Kolár M., Vecerová R., Pruček R., Soukupová J., Krystof V., 2009. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 30, 6333–6340, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.065>.
- Park K.H., Chhowalla M., Iqbal Z., Sesti F., 2003. Single-walled carbon nanotubes are a new class of ion channel blockers. *J. Biol. Chem.* 278(50), 50212–50216, <https://doi.org/10.1074/jbc.M310216200>.
- Park M.V.D.Z., Neigh A.M., Vermeulen J.P., Fonteyne L.J.J., Verharen H.W., Briedé J.J., Lovren H., Jong W.H., 2011. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* 32, 9810–9817, [10.1016/j.biomaterials.2011.08.085](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.085).
- Parvekar P., Palaskar J., Metgud S., Maria R., Dutta S., 2020. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *Biomater. Investig. Dent.*, 7, 1, 105–109, <https://doi.org/10.1080/26415275.2020.1796674>.
- Pasquet J., Chevalier Y., Pelletier J., Couval E., 2014. The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 457, 5, 263–274, <https://doi.org/10.1088/1757-899X/133/1/012055>.
- Patri A., Umbreit T., Zheng J., Nagashima K., Goering P., Francke-Carroll S., Gordon E., Weaver J., Miller T., Sadrieh N., McNeil S., Stratmeyer M., 2009. Energy dispersive X-ray analysis of titanium dioxide nanoparticle distribution after intravenous and subcutaneous injection in mice. *J. Appl. Toxicol.* 29, 662–672, <https://doi.org/10.1002/jat.1454>.
- Pelletier D.A., Suresh A.K., Holton G.A., McKeown C.K., Wang W., Gu B., Mortensen N.P., Allison D.P., Joy D.C., Allison M.R., Brown S.D., Phelps T.J., Doktycz M.J., 2010. Effects of engineered cerium oxide nanoparticles on bacterial growth and viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7981–9, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00650-10>.
- Pereira R., Geibel J., 1999. Direct observation of oxidative stress on the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* strains with atomic force microscopy. *Mol. Cell. Biochem.* 201, 17–24, <https://doi.org/10.1023/a:1007007704657>.
- Pereyra C.M., Gil, S.; Cristofolini, A.; Bonci, M.; Monge, M.P.; Montenegro, M.A.; Cavaglieri, L.R.. 2018. The production of yeast cell wall using an agroindustrial waste influences the

- wall thickness and is implicated on the aflatoxin B1 adsorption process. *Int. Food Res. J.* 111, 306–313, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.026>.
- Petica A., Gavrilu S., Lungua M.C., Buruntea N., Panzaru C., 2008. Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Mater. Sci. Eng.* 152, 22–27, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mseb.2008.06.021>.
- Pietrobon B., Kitaev V., 2008. Photochemical synthesis of monodisperse size – controlled silver decahedral nanoparticles and their remarkable optical properties. *Chem. Mater.* 20, 5186–5190, <https://doi.org/10.1021/cm800926u>.
- Pietrzak K., Twarużek M., Czyżowska A., Kosicki R., Gutarowska B., 2015. Influence of silver nanoparticles on metabolism and toxicity of moulds. *Acta Biochim. Pol.* 62, 851–857, https://doi.org/10.18388/abp.2015_1146.
- Poirier M., Simard J.C., Antoine F., Girard D., 2014. Interaction between silver nanoparticles of 20 nm (AgNP20) and human neutrophils: induction of apoptosis and inhibition of *de novo* protein synthesis by AgNP20 aggregates between silver nanoparticles of 20 nm. *J. Appl. Toxicol.* 34, 404–412, <https://doi.org/10.1002/jat.2956>.
- Pokrowiecki R., Zaręba T., Mielczarek A., Opalińska A., Wojnarowicz J., Majkowski M., Łojkowski W., Tyski S., 2013. Ocena bakteriobójczej aktywności koloidalnego roztworu nanocząstek srebra w stosunku do bakterii próchnicotwórczych. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 65, 197–206.
- Pomastowski P., Dziubakiewicz E., Buszewski B., 2012. Potencjał zeta, jego rola i znaczenie. *Anal. Nauka Prakt.* 2, 19–23.
- Ponmurugan P., Manjekarunambika K., Elango V., Gnanamangai B.M., 2016. Antifungal activity of biosynthesised copper nanoparticles evaluated against red root-rot disease in tea plants. *J. Exp. Nanosci.* 11, 13, <https://doi.org/10.1080/17458080.2016.1184766>.
- Prucek R., Tucek J., Kilianová M., Panáček A., Kvítek L., Filip J., Kolář M., Tománková K., Zbořil R., 2011. The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles. *Biomaterials.* 32, 4704–4713, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.039>.
- Pugazhendhi A., Prabhu R., Muruganatham K., Shanmuganathan R., Natarajan S., 2019. Anticancer, antimicrobial and photocatalytic activities of green synthesized magnesium oxide nanoparticles (MgONPs) using aqueous extract of *Sargassum wightii*. *J. Photochem. Photobiol. A.* 190, 86–97, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.01.020>.
- Radhakrishnan V.S., Dwivedi S.P., Siddiqui M.H., Prasad T., 2018. *In vitro* studies on oxidative stress-independent, Ag nanoparticles-induced cell toxicity of *Candida albicans*, an opportunistic pathogen. *Int. J. Nanomed.* 8, 13(T-NANO 2014 Abstracts), 91–96, <https://doi.org/10.2147/IJN.S125010>.
- Radzig M.A., Nadtochenko V.A., Koksharova O.A., Kiwi J., Lipasova V.A., Khmela I.A., 2013. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 102, 300–306, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.039>.
- Raghupathi K.R., Koodali R.T., Manna A.C., 2011. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir* 27(7), 4020–4028, <https://doi.org/10.1021/la104825u>.
- Rai A.K., Rai S.B., Rai D.K., 2003. Quantum chemical studies on the conformational structure of bacterial peptidoglycans and action of penicillin on cell wall. *J. Mol. Struct.* 626, 53–61, [https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(02\)00739-X](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(02)00739-X).
- Rai M.K., Deshmukh S.D., Ingle A.P., Gade A.K., 2012. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 112, 841–852, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x>.
- Rajiv P., Rajeshwari S., Venkatesh R., 2013. Bio-fabrication of zinc oxide nanoparticles using leaf extract of *Parthenium hysterophorus* L. and its size-dependent antifungal activity against plant fungal pathogens. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 112, 384–387, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.04.072>.
- Ramsden J.J., 2012. *Applied nanotechnology*. 1st ed., Elsevier.

- Rao C.N.R, Müller A., Cheetham A.K., 2007. Nanomaterials chemistry: recent developments and new directions. Weinheim, Wiley-VCH Verlag.
- Rathien D., Read L., 2005. Enabling technologies for Australian nanotechnology innovative industries. Prime Minister's Science, Engineering and Innovation Council.
- Ravikumar S., Gokulakrishnan R., Boomi P., 2012. The inhibitory effect of metal oxide nanoparticles against poultry pathogens. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 85–89.
- Raza M.A., Kanwal Z., Rauf A., Sabri A.N., Riaz S., Naseem S., 2016. Size- and shape-dependent antibacterial studies of silver nanoparticles synthesized by wet chemical routes. *Nanomaterials* 6, 74, <https://doi.org/10.3390/nano6040074>.
- Reddy K.M., Feris K., Bell J., Wingett D.G., Hanley C., Punnoose A., 2007. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Appl. Phys. Lett.* 90, <https://doi.org/10.1063/1.2742324>.
- Relkin P., Shukat R., Bourgaux C., Meneau F., 2011. Nanostructures and polymorphisms in protein stabilised lipid nanoparticles, as food bioactive carriers: contribution of particle size and adsorbed materials. *Procedia Food Sci.* 1, 246–250, <https://doi.org/10.1016/J.PROFOO.2011.09.039>.
- Ren G., Hu D., Cheng, E.W., Vargas-Reus M.A., Reip R., Allaker P.R.P., 2009. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int. J. Antimicrob. Agents* 33(6), 587–590, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.12.004>.
- Richards D.A., Antoine Maruani A., Chudasama V., 2017. Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction. *Chem. Sci.* 8, 63–77, <https://doi.org/10.1039/C6SC02403C>.
- Rincon A.G., Pulgarin C., Adler N., Peringer P., 2001. Interaction between *E. coli* inactivation and DBP-precursors – dihydroxybenzene isomers – in the photocatalytic process of drinking-water disinfection with TiO₂. *J. Photochem. Photobiol.* 139, 233–241, [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(01\)00374-4](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(01)00374-4).
- Rispoli F., Angelov A., Badia D., Kumar A., Seal S., Shah V., 2010. Understanding the toxicity of aggregated zero valent copper nanoparticles against *Escherichia coli*. *J. Hazard. Mater.* 180, 212–216, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.04.016>.
- Robinson I., 2013. Nanoparticle structure by coherent X-ray diffraction. *JPSJ* 82 (2), 021012, <https://doi.org/10.7566/JPSJ.82.021012>.
- Romanov S.G., Peschel U., Bardosova M., Essig S., Busch K., 2010. Plasmonic-photonic crystals: Hybrid colloidal plasmonic-photonic crystals (*Adv. Mater.* 22–23/2011). 82, 115403(1–11), <https://doi.org/10.1002/adma.201190082>.
- Roufou S.D., Sardella R., Valdramidis V., 2017. Assessing the adaptation capacity of *Penicillium expansum* in the presence of ZnO nanoparticles. Abstract in IAFP European Symposium. *Mycology* 9, 1, 43–48.
- Rousk J.K., Ackermann S.F., Curling D.L., 2012. Comparative toxicity of nanoparticulate CuO and ZnO to soil bacterial communities. *PLoS One* 7(3), e34197, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034197>.
- Runowski M., Ekner-Grzyb A., Mrówczyńska L., Balabhadra S., Grzyb T., Paczesny J., 2014. Synthesis and organic surface modification of luminescent, lanthanide-doped core/shell nanomaterials for potential bioapplications: spectroscopic, structural, and *in vitro* cytotoxicity evaluation. *Langmuir* 30, 9533–9543, <https://doi.org/10.1021/la501107a>.
- Ruparelia J.P., Chatterjee A.K., Duttgupta S.P., Mukherji S., 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater.* 4, 707–716, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>.
- Saharan V., Mehrotra A., Khatik R., Rawal P., Sharma S.S., Pal A., 2013. Synthesis of chitosan based nanoparticles and their *in vitro* evaluation against phytopathogenic fungi. *Int. J. Biol. Macromol.* 62, 677–683, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.012>.

- Salunke G.R., Ghosh S., Santosh Kumar R.J., Khade S., Vashisth P., Kale T., Chopade S., Pruthi V., Kundu G., Bellare J.R., Chopade B.A., 2014. Rapid synthesis and characterization of silver, gold, and bimetallic nanoparticles from the medicinal plant *Plumbago zeylanica* and their application in biofilm control. *Int. J. Nanomed.* 9, 2635–2653, <https://doi.org/10.2147/IJN.S59834>.
- Sardella D., Gatt R., Valdramidis V.P., 2017. Assessing the efficacy of zinc oxide nanoparticles against *Penicillium expansum* by automated turbidimetric analysis. *Mycology* 9(1), 43–48, <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1369187>.
- Sardella D., Gatt R., Valdramidis V.P., 2018. Turbidimetric assessment of the growth of filamentous fungi and the antifungal activity of zinc oxide nanoparticles. *J. Food Prot.* 81, 934–941, <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-448>.
- Satinder K.B., Verma M. 2011. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *Trends Analyt. Chem.* 30, 1, 2011.
- Savi G.D., da Silva P.M.M., Possato J.C., Barichello T., Castagnaro D., Scussel V.M., 2012. Biological activity of gold nanoparticles towards filamentous pathogenic fungi. *J. Nanopart. Res.* 20, 11–20, <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JNanoR.20.11>.
- Sawhney A.P.S., Condon B., Singh K.V., Pang, S.S., Li G., Hui D., 2008. Modern applications of nanotechnology in textiles. *Text. Res. J.* 78, 731–739, <https://doi.org/10.1177/0040517508091066>.
- Schuck P., Zhao H., Brautigam C., Ghirlando R., 2015. Basic principles of analytical ultracentrifugation. CRC Press, Boca Raton, FL, <https://doi.org/10.1201/b19028>.
- Seddighi N.S., Salari S., Izadi A.R., 2017. Evaluation of antifungal effect of iron-oxide nanoparticles against different *Candida* species. *IET Nanobiotechnol.* 11, 883–888, <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2017.0025>.
- Shah V., Collins D., Walker V.K., Shah S., 2014. The impact of engineered cobalt, iron, nickel and silver nanoparticles on soil bacterial diversity under field conditions. *Environ. Res. Lett.*, <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4171-x>.
- Shah V., Dobiášová P., Baldrian P., Nerud F., Kumar A., Seal S., 2010. Influence of iron and copper nanoparticle powder on the production of lignocellulose degrading enzymes in the fungus *Trametes versicolor*. *J. Hazard. Mater.* 178, 1141–1145, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat>.
- Shahbazi M.-A., Hamidi M., Mäkilä E.M., Zhang H., Almeida P.V., Kaasalainen M., Salonen J.J., Hirvonen J.T., Santos H., 2013. The mechanisms of surface chemistry effects of mesoporous silicon nanoparticles on immunotoxicity and biocompatibility. *Biomaterials* 34, 7776–7789, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.052>.
- Shaik M.R., Khan M., Kuniyil M., Al-Warthan A., Alkhathlan H.Z., Siddiqui M.R.H., Shaik J.P., Ahamed A., Mahmood A., Khan M., Adil S.F., 2018. Plant-extract-assisted green synthesis of silver nanoparticles using *Origanum vulgare* L. extract and their microbicidal activities. *Sustainability* 10, 913, <https://doi.org/10.3390/su10040913>.
- Shamaila S., Zafar N., Riaz S., Sharif R., Nazir J., Naseem S., 2016. Gold nanoparticles: An efficient antimicrobial agent against enteric bacterial human pathogen. *Nanomaterials* 6, 71, <https://doi.org/10.3390/nano6040071>.
- Sharma P., Goyal D., Chudasama B., 2021. Ecotoxicity of as-synthesised copper nanoparticles on soil bacteria. *J. Nanobiotechnol.* 15(2), 236–246, <https://doi.org/10.1049/nbt2.12039>.
- Shcherbakova E.N., Shcherbakov A., Andronov E.E., Gonchar L.N., Kalenskaya S.M., Chebotar V.K., 2016. Combined pre-seed treatment with microbial inoculants and Mo nanoparticles changes composition of root exudates and rhizosphere microbiome structure of chickpea (*Cicer arietinum* L) plants. *Symbiosis* 73, 57–69.
- Siakavella I.K., Lamari F., Papoulis D., Orkoulas M., Gkolfi P., Lykouras M., Avgoustakis K., Hatziantoniou S., 2020. Effect of plant extracts on the characteristics of silver nanoparticles for topical application. *Pharmaceutics* 12, 1244, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121244>.

- Sies H., 2017. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. *Redox Biol.* 11, 613–619, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>.
- Simonin M., Guyonnet J.P., Martins J.M.F., Ginot M., Richaume A., 2014. Influence of soil properties on the toxicity of TiO₂ nanoparticles on carbon mineralization and bacterial abundance. *J. Hazard. Mater.* 238, 176–185, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.004>.
- Sing K.S.W., 1989. The use of gas adsorption for the characterization of porous solids. *Colloids Surf.* 38(1), 113–124, [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(89\)80148-9](https://doi.org/10.1016/0166-6622(89)80148-9).
- Singh J., Vishwakarma K., Ramawat N., Raia P., Singh V.K., Mishra R.K., Sharma S., 2019. Nanomaterials and microbes' interactions: a contemporary overview. *Biotech* 9(3), 1–14.
- Singh P., Nanda A., 2013. Antimicrobial and antifungal potential of zinc oxide nanoparticles in comparison to conventional zinc oxide particles. *J. Chem. Pharm.* 5(11), 457–463.
- Singh R., Hano C., Nath G., Sharma B., 2021. Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Carissa carandas* L. and their antioxidant and antimicrobial activity against human pathogenic bacteria. *Biomolecules* 11, 299, <https://doi.org/10.3390/biom11020299>.
- Singh R.P., Ramarao P., 2012. Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 213(2), 249–259.
- Sirelkhatim A., Mahmud S., Seeni A., Haida N., Kaus M., Ann L.Ch., Khadijah S., Bakhori M., Hasan H., Mohamad D., 2015. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro. Lett.* 7(3), 219–242, <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>.
- Sivakamavalli J., Deepa O., Vaseeharan B., 2014. Discrete nanoparticles of ruta graveolens induces the bacterial and fungal biofilm inhibition. *Cell Commun. Adhes.* 21(4), 229–38, <https://doi.org/10.3109/15419061.2014.926476>.
- Skotny A., Pucińska J., 2013. Współczesna cytometria przepływowa. *Inż. Biomedyczna*, 19, 3–11.
- Skumryev V., Stoyanov S., Zhang Y., Hadjipanayis G., Givord D., Nogués J., 2003. Beating the superparamagnetic limit with exchange bias., *Nature*. 423, 850–853, <https://doi.org/10.1038/nature01687>.
- Słowik G., 2012. Podstawy mikroskopii elektronowej i jej wybrane zastosowania w charakterystyce katalizatorów nośnikowych. Uniwersytet Rzeszowski.
- Sohm B., Immel F., Bauda P., Pagnout C., 2015. Insight into the primary mode of action of TiO₂ nanoparticles on *Escherichia coli* in the dark. *Proteomics*. 15, 98–113, <https://doi.org/10.1002/pmic.201400101>.
- Sondi I., Salopek-Sondi B., 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* 275, 177–82, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>.
- Soni D., Bafana A., Gandhi D., Sivanesan S., Pandey R.A., 2014. Stress response of *Pseudomonas* species to silver nanoparticles at the molecular level. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 2126–2132, <https://doi.org/10.1002/etc.2670>.
- Sonohara R., Muramatsu N., Ohshima H., Kondo T., 1995. Difference in Surface properties between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as revealed by electrophoretic mobility measurements. *Biophys. Chem.* 55, 273–7, [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(95\)00004-H](https://doi.org/10.1016/0301-4622(95)00004-H).
- Sousa C.A., Soares H.M.V.M., Soares E.V., 2018. Nickel Oxide (NiO) nanoparticles induce loss of cell viability in yeast mediated by oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 31, 658–665, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00022>.
- Sousa C.A., Soares H.M.V.M., Soares E.V., 2019a. Metal(loid) oxide (Al₂O₃, Mn₃O₄, SiO₂ and SnO₂) nanoparticles cause cytotoxicity in yeast via intracellular generation of reactive oxygen species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 6257–6269, <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09903-y>.
- Sousa C.A., Soares H.M.V.M., Soares E.V., 2019b. Nickel oxide nanoparticles trigger caspase- and mitochondria-dependent apoptosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Res. Toxicol.* 32, 245–254, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00265>.

- Stamplecoskie K., Scaiano J., 2012. Silver as an example of the applications of photochemistry to the synthesis and uses of nanomaterials. *Photochem. Photobiol.* 88(4), 762–768. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01103.x>.
- Stankovic A., Dimitrijevic S., Uskokovic D., 2013. Influence of size scale and morphology on antibacterial properties of ZnO powders hydrothermally synthesized using different Surface stabilizing agents. *Colloids Surf. B.* 102, 21–28, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.033>.
- Strambeanu N., Demetrovici L., Dragos D., 2015. Nanoparticles promises and risks. *Springer Sci. Rev.*, https://doi.org/10.1007/978-3-319-11728-7_2.
- Studer A.M., Limbach L.K., Van Duc L., Krumeich F., Athanassiou E.K., Gerber L.C., Moch H., Stark W.J., 2010. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 197(3), 169–74, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.05.012>.
- Su Y., Zheng X., Chen Y., Li M., Liu K., 2015. Alteration of intracellular protein expressions as a key mechanism of the deterioration of bacterial denitrification caused by copper oxide nanoparticles. *Sci. Rep.* 5, 15824, <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>.
- Subbiahdoss G., Sharifi S., Grijpma D.W., Laurent S. van der Mei H.C., Mahmoudi M., Busscher H.J., 2012. Magnetic targeting of surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles yields antibacterial efficacy against biofilms of gentamicin-resistant staphylococci. *Acta Biomater.* 8(6), 2047–55, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.03.002>. PMID: 22406508.
- Sun M., Yu Q., Hu M., Hao Z., Zhang C., Li M., 2014. Lead sulfide nanoparticles increase cell wall chitin content and induce apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Hazard. Mater.* 273, 7–16, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.008>.
- Święciło A., Januś E., Święciło M., 2020. Nanocząstki metali – zastosowanie, toksyczność i implikacje zdrowotne. W: Środowiskowe i genetyczne uwarunkowania zdrowia ludzi i zwierząt, B. Pilarczyk, A. Tomza-Marciniak, R. Pilarczyk, Udała A. (red.), ZUT Szczecin, 165–180.
- Tamayo L.A., Zapata P.A., Vejar N.D., Azócar M.I., Gulppi M.A., Zhou X., Thompson G.E., Rabagliati F.M., Páez M.A., 2014. Release of silver and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and their penetration into *Listeria monocytogenes*. *Mater. Sci. Eng.* 40, 24–31, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.03.037>.
- Tanase C., Berta L., Coman N.A., Ros I., Man A., Toma F., Mocan A., Nicolescu A., Jakab-Farkas L., Biró D., Mare A., 2019. Antibacterial and antioxidant potential of silver nanoparticles biosynthesized using the spruce bark extract. *Nanomaterials* 9, 11, <https://doi.org/10.3390/nano9111541>.
- Taran N.Y., Gonchar O.M., Lopatko K.G., Batsmanova L.M., Patyka M.V., Volkogon M.V., 2014. The effect of colloidal solution of molybdenum nanoparticles on the microbial composition in rhizosphere of *Cicer arietinum* L. *Nanoscale Res. Lett.*, <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-289>.
- Taylor L., Schmitt H., Carrier W., Nakagawa M., 2005. Lunar Dust Problem: From Liability to Asset. *Proceedings of the 1st Space Exploration Conference: Continuing the Voyage of Discovery*, Space Exploration Conferences. American Institute of Aeronautics and Astronautics, <https://doi.org/10.2514/6.2005-2510>.
- Thapa R., Bhagat C., Shrestha P., Awal S., Dudhagara P., 2017. Enzyme-mediated formulation of stable elliptical silver nanoparticles tested against clinical pathogens and MDR bacteria and development of antimicrobial surgical thread. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 16, 39, <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0216-y>.
- Tiwari J.N., Tiwari R.N., Kim K.S., 2011. Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Prog. Mater. Sci.* 57, 724–803.
- Tran L., Chaudhry Q., 2010. Engineered nanoparticles and food: an assessment of exposure and hazard. *RSC Nanosci. R. Soc. Chem.*, 120–134.

- Tsuang Y.H., Sun J.S., Hung Y.Ch., Lu Ch.H., Shong Chang W.H., Wang Ch.Ch., 2008. Studies of photokilling of bacteria using titanium dioxide nanoparticles. *Artif. Organs* 32, 167–174, <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2007.00530.x>.
- Tsuj M., Ogino M., Matsuo R., Kumagai H., Hikino S., Kim T., Yoon S.H., 2010. Stepwise growth of decahedral and icosahedral silver nanocrystals in DMF. *Cryst. Growth Des.* 10, 296–301, <https://doi.org/10.1021/cg9009042>.
- Tvrđy K., Kamat P.V., 2009. Substrate driven photochemistry of CdSe Quantum dot film: charge injection and irreversible transformations on oxide surfaces. *J. Phys. Chem.* 113, 3765–3772, <https://doi.org/10.1021/jp808562x>.
- Valcárcel M., López-Lorente A.I., 2014. Gold nanoparticles in analytical chemistry. In: D. Barcelo (ed.), *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 3–35.
- vanLoon G.W., Duffy S.J., 2009. *Chemia środowiska: perspektywa globalna*. Wyd. PWN, Warszawa.
- Vasco M.S., Alves L.C., Corregidor V., Correia D., Godinho C.P., Sa-Correia I., Bettiol A., Watt F., Pinheiro T., 2017. 3D map distribution of metallic nanoparticles in whole cells using MeV ion microscopy. *J. Microsc.* 267, 227–236, <https://doi.org/10.1111/jmi.12561>.
- Vittori Antisari L., Carbone S, Gatti A., Vianello G., Nannipieri P., 2013. Toxicity of metal oxide (CeO₂, Fe₃O₄, SnO₂) engineered nanoparticles on soil microbial biomass and their distribution in soil. *Soil Biol. Biochem.* 60, 87–94, <https://doi.org/10.1007/s00128-020-03052-z>.
- Voinov M.A., Pagan J.O., Morrison E., Smirnova T.I., Smirnov A.I., 2011. Surface-mediated production of hydroxyl radicals as a mechanism of iron oxide nanoparticle biotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 133(1), 35–41, <https://doi.org/10.1021/ja104683w>.
- Vollath D., 2008. *Nanomaterials: An introduction to synthesis, properties and applications*. Weinheim, Wiley-VCH Verlag, 865–870.
- von Moos N., Bowen P., Slaveykova V.I., 2014. Bioavailability of inorganic nanoparticles to planktonic bacteria and aquatic microalgae in freshwater. *Environ. Sci. Technol.* 1, 214–232, <https://doi.org/10.1039/c3en00054k>.
- Von Nussbaum F., Brands M., Hinzen B., Weigand S., Häbich D., 2006. Antibacterial natural products in medicinal chemistry – exodus or revival. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 5072–5129, <https://doi.org/10.1002/anie.200600350>.
- Wagner G., Korenkov V., Judy J.D., Bertsch P.M., 2016. Nanoparticles composed of Zn and ZnO inhibit *Peronospora tabacina* spore germination *in vitro* and *P. tabacina* infectivity on tobacco leaves. *J. Nanosci.* 6, <https://doi.org/10.3390/nano6030050>.
- Wang C., Liu L.L., Zhang A.T., Xie P., Lu J.J., 2012. Antibacterial effects of zinc oxide nanoparticles on *Escherichia coli* K88, *Afr. J. Biotechnol.* 11, 10248–10254, <https://doi.org/10.5897/AJB11.3703>.
- Wang C., Kim Y.J., Singh P., Mathiyalagan R., Jin Y., Yang D.C., 2015. Green synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus methylotrophicus*, and their antimicrobial activity. *Artif Cells Nanomed. Biotechnol.* 44(4), 1127–1132, <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1011805>.
- Wang J., Shu K., Zhang S.Y., 2017. Effects of silver nanoparticles on soil microbial communities and bacterial nitrification in suburban vegetable soils. *Pedosphere* 27, 482–490, [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60344-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60344-8).
- Wang Z., Lee Y.H., Wu B., Horst A., Kang Y., Tang Y.J., Chen D.R., 2010. Anti-microbial activities of aerosolized transition metal oxide nanoparticles. *Chemosphere* 80(5), 525–529, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.047>.
- Weller H.A., Schmidt H.M., Koch U., Fojtik A., 1986. Onset of light absorption as a function of size of extremely small cds particles. *Chem. Phys. Lett.* 124, 557–560.
- Willmott G.R., 2018. Tunable resistive pulse sensing: better size and charge measurements for submicrometer colloids. *Anal. Chem.* 90(5), 2987–2995, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05106>.
- Woźniak A., Malankowska A., Nowaczyk G., Grześkowiak B.F., Tuśnio K., Słomski R., Zaleska-Medynska A., Jurga S., 2017. Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nano-

- particles for biomedical applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 28(6), 92, <https://doi.org/10.1007/s10856-017-5902-y>.
- Wypij M., Golinska P., Dahm H., Rai M., 2017. Actinobacterial-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic bacteria. *IET Nanobiotechnol.* 11, 336–342, <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2016.0112>.
- Xiu Z.M., Zhang Q.B., Puppala H.L., Colvin V.L., Alvarez P.J., 2012. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Lett.* 12, 4271–4275, <https://doi.org/10.1021/nl301934w>.
- Xu C., Peng C., Sun L., Zhang S., Huang H., Chen Y., Shi J., 2015. Distinctive effects of TiO₂ and CuO nanoparticles on soil microbes and their community structures in flooded paddy soil. *Soil Biol. Biochem.* 86, 24–33.
- Xu P., Van Kirk E., Zhan Y., Murdoch W., Radosz M., Shen Y., 2007. Targeted charge-reversal nanoparticles for nuclear drug delivery. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46, 4999–5002, <https://doi.org/10.1002/anie.200605254>.
- Xu T., Li J., Zhang S., Jin Y., Wang R., 2019. Integration of diagnosis and treatment in the detection and kill of *S. aureus* in the whole blood. *Biosens. Bioelectron.* 142, 111507, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111507>.
- Xue C., Millstone J. E., Li S., Mirkin, C.A., 2007. Plasmon-driven synthesis of triangular core-shell nanoprisms from gold seeds. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 8436–8439.
- Yamanaka M., Hara K., Kudo J., 2005. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(11), 7589–7593, <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7589-7593.2005>.
- Yang Y., Mathieu J. M., Chattopadhyay S., Miller J.T., Wu T., Shibata T., Guo W., Alvarez P.J., 2012. Defense mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 against quantum dots and their released heavy metals. *ACS Nano.* 6(7), 6091–6098, <https://doi.org/10.1021/nn3011619>.
- Yao N., Wang Z.L., 2005. Handbook of microscopy for nanotechnology. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- You T., Liu D., Chen J., Yang Z., Dou R., Gao X., Wang L., 2018. Effects of metal oxide nanoparticles on soil enzyme activities and bacterial communities in two different soil types. *J. Soils Sedim.* 8, 211–221, <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1716-2>.
- Yu H., Li J., Loomis R.A., Wang L.W., Buhro W.E., 2003. Two- versus three-dimensional quantum confinement in indium phosphide wires and dots. *Nat. Mater.* 2, 517–520, <https://doi.org/10.1038/nmat942>.
- Yuan Z., Li J., Cui L., Zu B., Zhang H., Yu C-P., 2013. Interaction of silver nanoparticles with pure nitrifying bacteria. *Chemosphere* 90, 1404–1411, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.032>.
- Zapór L., 2016. Strategia grupowania nanomateriałów. *Podst. Metody Oceny Środ. Pracy* 3(89), 5–15, <https://doi.org/10.5604/1231868X.1217548>.
- Zarei M., Jamnejad A., Khajehali E., 2014. Antibacterial effect of silver nanoparticles against four foodborne pathogens. *Jundishapur J. Microbiol.* 7(1), e8720, <https://doi.org/10.5812/jjm.8720>.
- Zeng J., Zheng Y., Rycenga M., Tao J., Li Z.Y., Zhang Q., Zhu Y., Xia Y., 2010. Controlling the shapes of silver nanocrystals with different capping agents. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 8552, <https://doi.org/10.1021/ja103655f>.
- Zhang J., Langille M.R., Mirkin C.A., 2011. Synthesis of silver nanorods by low energy excitation of spherical plasmonic seeds. *Nano Lett.* 11, 2495–2498, <https://doi.org/10.1021/nl2009789>.
- Zhang L., Jiang Y., Ding Y., Povey M., York D., 2007. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *J. Nanopart. Res.* 9(3), 479–489, <https://doi.org/10.1007/s11051-006-9150-1>.
- Zhang W., Bao S., Fang T., 2016a. The neglected nano-specific toxicity of ZnO nanoparticles in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* 6, <https://doi.org/10.1038/srep24839>.

- Zhang W., Li Y., Niu J.F., Chen Y.S., 2013. Photogeneration of reactive oxygen species on uncoated silver, gold, nickel, and silicon nanoparticles and their antibacterial effects. *Langmuir* 29(15), <https://doi.org/10.1021/la400500t>.
- Zhang X.F., Liu Z.G., Shen W., Gurunathan S., 2016b. Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 9, <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>.
- Zhang Y., Dasari T., Deng H., Yu H., 2015. Antimicrobial activity of gold nanoparticles and ionic gold. *J. Environ. Sci. Health.* 3, 286–327, <https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000199>.
- Zhang Z., Sèbe G., Rentsch D., Zimmermann T., Tingaut P., 2014. Ultralightweight and flexible silylated nanocellulose sponges for the selective removal of oil from water. *Chem. Mater.* 26, 2659–2668, <https://doi.org/10.1021/cm5004164>.
- Zhao Y., Sun X., Zhang G., Trewyn B.G., Slowing I.I., Lin V.S.-Y., 2011. Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: size and surface effects. *ACS Nano.* 5, 1366–1375, <https://doi.org/10.1021/nn103077k>.
- Zhao Y., Tian Y., Cui Y., Liu W., Ma W., Jiang X., 2010. Small molecule-capped gold nanoparticles as potent antibacterial agents that target gram-negative bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 12349–12356, <https://doi.org/10.1021/ja1028843>.
- Zheng X., Chen Y.G., Wu R., 2011. Long-term effects of titanium dioxide nanoparticles on nitrogen and phosphorus removal from wastewater and bacterial community shift in activated sludge. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7284–7290, <https://doi.org/10.1021/es2008598>.
- Zhou W., Wachs I.E., Kiely Ch.J., 2012. Nanostructural and chemical characterization of supported metal oxide catalysts by aberration corrected analytical electron microscopy. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 16, 1–22.
- Zhu J., Liu S., Palchik O., Koltypin Y., Gedanken A., 2000. Shape-controlled synthesis of silver nanoparticles by pulse sonoelectrochemical methods. *Langmuir* 16, 16, 6396–6399, <https://doi.org/10.1021/la991507u>.
- Zook H.A., 2001. Spacecraft measurements of the cosmic dust flux. In: *Accretion of extraterrestrial matter throughout Earth's history*, B. Peucker-Ehrenbrink, B. Schmitz (eds), Springer, Boston, MA, 75–92, https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8694-8_5.
- Žalneravičius R., Paškevičius A., Kurtinaitienė M., Jagminas A., 2016. Size-dependent antimicrobial properties of the cobalt ferrite nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* 18, 300, <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3612-x>.