

TALLINNA REALKOOL

MIRTEL MERILA

139.C, REAAL-MAJANDUSE ÕPPESUUND

# **HÕBEDA-KITOSAANI NANOKOMPOSIITIDE MÕJU LOODUSLIKULT LUMINESTSEERUVATELE BAKTERITELE *VIBRIO FISCHERI***

JUHENDAJAD ÕP MARTIN SAAR, MARILIIS SIHTMÄE JA KAJA KASEMETS (KEEMILISE JA BIOLOOGILISE FÜÜSIKA INSTITUUT)

## **SISSEJUHATUS**

Maailma Terviseorganisatsiooni ja Haiguste Ennetamise ja Tõrje Euroopa Keskuse andmetel on kasvavaks meditsiiniliseks probleemiks nii haiglainfektsioonide kõrge esinemissagedus kui ka antibiootikumi-resistentsete bakteritüvede laialdane levik, mis muudab infektsioonide ravi keeruliseks ja sageli ebaefektiivseks. Üks uudne ja perspektiivikas suund biomeditsiinis on antimikroobse toimega nanomaterjalide kasutamine ja seda eelkõige haavainfektsioonide ravis. Nii hõbedal kui ka levinud polüsahhariidil – kitosaanil – on antimikroobsed omadused, mis koostoimes võivad veelgi võimendada ning osutada biomeditsiinis perspektiivseks kombinatsiooniks. Nanomaterjalide kasutamiseks meditsiinilistel eesmärkidel on aga vaja teada nii nende tõhusust mikroorganismide inaktiveerimise osas kui ka ohutust inimesele ja looduskeskkonnale.

Üheks probleemiks on taoliste uudsete nanomaterjalide keskkonnaohutuse hindamisel vajalike andmete puudumine. Looduslikult helenduvate bakterite *Vibrio fischeri* (*Aliivibrio fischeri*) bioluminestsentsi inhibitsiooni testi saab edukalt kasutada erinevate kemikaalide keskkonnaohtlikkuse esmaseks hindamiseks.

Käesoleva töö eesmärk oli kolme erineva varem sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAgCS\_0,3, nAgCS\_1 ja nAgCS\_3) ja võrdlevalt tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakeste (Cit-Ag NO) mõju uurimine bakteriliigi *Vibrio fischeri* rakkudele. Selleks püstitas autor kaks uurimisküsimust:

- 1) milline on valitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide hüdrodünaamiline suurus ja pinnalaeng ning kui stabiilsed on need materjalid alglahuses ja testsöötmes;
- 2) kui mürgised on hõbeda-kitosaani nanokomposiidid testbakterile *V. fischeri*?

Uurimistöö koosneb kahest suuremast osast. Esimeses osas antakse ülevaade nanokomposiitide, kitosaani, bakteri *V. fischeri* ja bioluminestsentsi kohta. Teises osas kirjeldatakse katsetes kasutatud keemilisi ühendeid, töövahendeid, katsete metodikaid ning tutvustatakse ja analüüsitakse läbi viidud katsete tulemusi. Eksperimentaalne osa hõlmab hõbeda-nanokomposiitide omaduste ja toksilisuse hindamist: 1) hüdrodünaamilise suuruse, pinnalaengu ning suspensioonide stabiilsuse iseloomustamist alglauses ja testsöötmes, kasutades dünaamilise ja elektroforeetilise valgus-hajuvuse meetodit ning 2) toksilisuse testimist bakteriga *V. fischeri* kasutades modifitseeritud kineetilise bioluminestsentsi inhibitsiooni testi.

Töös kasutatud peamised kirjandusallikad koguti andmebaasidest nagu nt ResearchGate, ScienceDirect ning TalTechi digikogu, kust saadi teemakohaseid teadusartikleid ja -töid.

Käesoleva töö eksperimentaalne osa tehti Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudi (KBFI) Keskkonnatoksikoloogia laboris, Eesti Teadusagentuuri projekti „Antimikroobsed kitosaani nanokomposiidid biomeditsiinilisteks rakendusteks: efektiivsus ja ohutus“ (PRG749) raames.

Uurimistöö autor on tänulik KBFI teadlastele Mariliis Sihtmäele ja Kaja Kasemetsale, kes võimaldasid ligipääsu KBFI Keskkonnatoksikoloogia laborisse, abistasid katsete läbiviimisega ning andsid töö valmimise käigus nõu nii teoreetilistes kui ka praktilistes küsimustes. Lisaks tänan koolipoolset juhendajat Martin Saart, kes oli alati valmis vastama küsimustele ja andma tagasisidet.

# Sisukord

SISSEJUHATUS.....	1
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	4
1.1. Nanomaterjalid .....	4
1.2. Kitosaan .....	7
1.3. Looduslikult luminesceeruvad bakterid <i>Vibrio fischeri</i> .....	8
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	14
2.1. Kasutatud materjalid .....	14
2.2. Metoodika .....	15
2.3. Tulemused ja arutelu .....	18
2.3.1. Nanokomposiitide füüsikalised-keemilised omadused .....	18
2.3.2. Nanokomposiitide suspensioonide stabiilsus .....	19
2.3.3. Toksilisus bakteritele <i>Vibrio fischeri</i> .....	20
KOKKUVÕTE .....	23
KASUTATUD MATERJALID .....	25
RESÜMEE .....	29
ABSTRACT .....	30
Lisa 1. Suspensioonide stabiilsuse kvalitatiivne hindamine settimiskatsega.....	31
Lisa 2. Suspensioonide stabiilsuse kvantitatiivne määramine .....	32

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Nanomaterjalid

Nanomaterjalid on keemilised ained või materjalid, mis on nanomõõtmelise sisestruktuuri või pinnastruktuuriga ja millel on nanomõõtmes (1–100 nanomeetrit) vähemalt üks välismõõde. Eesliide „nano-“ näitab objekti äärmiselt väikest suurus. Seda kasutatakse ka SI ühikusüsteemis, et märkida suurusjärku  $10^{-9}$ , nt 1 nanomeeter (nm) on  $10^{-9}$  m. (ISO standard 18401:2017) Euroopa Liidu Teataja (2011) defineerib nanomaterjali kui loodusliku, juhuslikult tekkinud või tööstuslikult toodetud materjali, mis on sidumata olekus või esineb kämbu<sup>1</sup> või pahma<sup>2</sup> kujul. Selle lõimisest vähemalt 50% moodustab fraktsioon osakekestest, mille üks või mitu välismõõdet on vahemikus 1–100 nm. Konkreetsetes olukordades ning kui see on põhjendatud keskkonna-, tervise-, ohutuse- või konkurentsivõimeküsimumustega, võib osakeste suuruste vahemikku veelgi täpsustada ja lõimist iseloomustava suurusvahemiku piirmäära 50% asendada piirmääraga vahemikust 1–50%. (Euroopa Liidu Teataja, 2011).

Nanoosakeste suurus, kuju, laengut ja keemilisi komponente saab vastavalt vajadusele disainida (Puusta, 2022, lk 15). Praegu on enim kasutatavad nanomaterjalid nanotitaandioksiidid, nano-tsinkoksiidid, fullereenid, süsinik-nanotorud ja nanohõbe. Nende materjalide kasutamine tööstuses ja toodetes kasvab kiiresti. Uusi nanomaterjale ja nende kasutusviise arendatakse ning täiustatakse pidevalt. Paljusid nanomaterjale kasutatakse innovaatilistes rakendustes, näiteks katalüsaatoritena, elektroonikas, päikesepaneelides, akudes ja biomeditsiinis. (Käkinen, 2014, lk 13)

### **Nanomaterjalidega kaasnevad võimalikud ohud**

Nanomaterjalide erinevate uute omaduste peamine põhjus võrreldes nende mikroskaalas vastetega on osakeste suurus ja kuju. Peale nimetatute on samuti hulk teisi parameetreid, mis on nanomaterjalide funktsioonidele ja nendega seotud nähtustele omased ning võivad suurel määral mõjutada nn nanoskaalanähtusi. Sellised parameetrid on näiteks koostis, morfoloogia, kristallstruktuur ja pinnaomadused. Need nähtused hõlmavad nt optilisi (värvus), mehaanilisi (tõmbetugevus), keemilisi (katalüüs), elektrilisi (juhtivus) ja teisi omadusi. (ISO standard 18401:2017). Lisaks nanomaterjalide suurusele on oluline roll ka osakeste pinnalaengul, kuna on näidatud, et positiivselt laetud nanoosakesed võivad paremini seonduda mikroobirakkudega, mis on reeglina negatiivse pinnalaenguga ning seega olla mikroobidele toksilisemad (Kasemets *et al.*, 2019, lk 1043).

Nanomaterjalide potentsiaalseteks soovimatuteks kõrvalmõjudeks võivad olla interaktsioonid bioloogiliste süsteemidega ja toksilisus. Mida väiksem on osake, seda suurem on tema eripind

---

<sup>1</sup> Kämp – osake, mis koosneb tugevasti seotud või kokkusulatatud osakekestest.

<sup>2</sup> Pahm – nõrgalt seotud osakeste või kämpude kogum, mille välispindala on võrdne üksikute komponentide pindala summaga.

(materjali pindala massiühiku kohta,  $m^2/g$ ), mistõttu paikneb suhteliselt rohkem aatomeid osakese välispinnal ja seega suureneb ka osakese reaktiivsus ehk valmidus reageerida teiste ainetega. Kõrge reaktiivsus suurendab oluliselt nanoosakeste interaktsiooni ümbritseva keskkonnaga nt gaaside, orgaaniliste molekulide, sh valkude, DNA, rakumembraanide sidumise kaudu. See võib põhjustada muutusi elutähtsate biomolekulide omadustes, membraanikahjustusi, nanoosakeste suurenenud lahustumist ja reaktiivsete hapnikuühendite (ROS-ide) nagu nt hüdroksüülradikaal ( $\bullet OH$ ), vesinikperoksiid ( $H_2O_2$ ) ja superoksiidanioon ( $O_2^-$ ) moodustumist. Enim tunnustatud nanomaterjalide toksilisuse mehhanismiks arvataksegi olevat nende võime tekitada ROS-e ning metalliliste nanoosakeste puhul ka suurenenud lahustuvus. Samuti võivad sihipäraselt toodetud sünteetilised nanomaterjalid oma elutsükli käigus sattuda keskkonda, eeskätt veekogudesse, pinnasesse ja setetesse, saastades nii vastavaid keskkonnamaatrikseid kui ka ohustades seal elavaid organisme. (Nel *et al.*, 2006, lk 624)

### **Antimikroobse toimega nanokomposiidid**

Nanomaterjal (sh nanokomposiit) on materjal, millel on mistahes välismõõde, sisemine struktuur või pinnastruktuur nanosuuruses (1–100 nm). Nanokomposiit on kahest või enamast koostisosast koosnev liitmaterjal. Maatriksit moodustavad materjalid võivad olla erineva keemilise koostisega või materjalifaasis. Näiteks polümeermaatriks, mis sisaldab teatud omaduse parandamiseks lisatud nanoosakesi. (ISO standard 18401:2017) Siinse töö kontekstis on tegemist antimikroobse toimega nanokomposiitidega, kus omavahel on kombineeritud hõbeda nanoosakesed ja polüsahhariid kitosaan.

Antimikroobse toimega nanoosakesed ja nanokomposiidid on uudne alternatiiv bakteriaalsete infektsioonide vastu võitlemiseks. Metallilistel nanoosakestel – nt hõbedal, vasel, titaanil, kullal ja tsingil – on antimikroobsed omadused ja seetõttu saab neid kasutada erinevates biomeditsiinilistes ja antimikroobsetes tehnoloogiates ja toodetes. Teatud nanoosakesi (nt hõbedat, tsinki, vaske) juba kasutatakse haavasidemetes, implantaadides, kateetrites ja muudes toodetes, mis on mõeldud bakterite vastu võitlemiseks või kus peab bakterite arvukus väga madal olema. On näidatud, et positiivselt laetud ja suuruselt väiksemad osakesed võivad olla mikroorganismidele rohkem toksilised. (Ivask *et al.*, 2014, lk 1; Kubo *et al.*, 2018, lk 2) Nanoosakeste bakteritsiidse toime seletamiseks on välja pakutud erinevaid toimemehhanisme. Kui näiteks bakterite resistentsust antibiootikumide suhtes on palju uuritud ja mehhanismid valdavalt teada, siis nanoosakeste suhtes resistentsuse võimalikku teket veel täielikult uuritud pole ja siin võib nanoosakestel olla teatud eeliseid. Samuti on näidatud, et nanoosakesed võivad olla tõhusad antibiootikumide kandjad bakterirakkudesse, säilitades ravimi kontsentratsiooni ja spetsiifilisuse ning minimiseerides ka võimalikke kõrvaltoimeid ravi ajal. (Puusta, 2022, lk 15–16)

## Nanokomposiitide süntees

Molekulid, viirused, bakterid ja muud looduse elus ja eluta osad on talitlemiseks arenenud täpse suuruse, kuju ja keemilise koostisega. Antikehad tunnevad ära komplementaarsed antigeenid ja seostuvad nendega mittekovalentsete jõudude abil. Viirused on ikosaeedrilised, kuulikujulised või vardakujulised või neil võib olla asümmeetriline ehitus. Need geomeetriad võivad mõjutada viiruste võimet nakatada konkreetseid rakutüüpe ja muuta nende viibimisaega rakus. Rakkude elujõulisuse ja funktsioonide reguleerimiseks kogunevad valgud kompleksseteks ühikuteks, näiteks ribosoomideks. Kõik bioloogilised molekulid ja struktuurid on nanoskaalas. Kui tahetakse luua sünteetilisi nanomaterjale, mida on soov kasutada biomeditsiinis, tuleb välja selgitada, kuidas nende nanoosakeste füüsikalise-keemilised omadused mõjutavad bioloogilisi süsteeme. On võimalik sünteesida tohtul hulgal erineva suuruse, kuju ja erineva keemilise koostisega nanomaterjale, aga ka bioloogilisi molekule nagu peptiide ja oligonukleotiide. (Albanese *et al.*, 2012, lk 3)

Metalliliste nanoosakeste sünteesimiseks on välja töötatud mitu meetodit. On kaks sünteesi võimalust, nn ülalt-alla ja alt-üles meetodid. Ülalt-alla meetodid hõlmavad jahvatamist, nanolitograafiat<sup>3</sup> ja karastamist. Sellised meetodid ei võimalda head kontrolli osakeste suuruse ja struktuuri üle. Alt-üles meetod on viis, mida nanoosakeste sünteesil enamasti kasutatakse, kuna see hõlmab materjali ülesehitamist altpoolt väiksemast suuremani: aatomite, molekulide ja klastrite kaupa. (Cele, 2020, lk 1) Füüsikaline, keemiline, bioloogiline ja mõnel juhul hübriidtehnika on nanoosakeste tootmise peamised viisid. Nanoosakeste tootmise füüsikalised meetodid hõlmavad laserablatsiooni<sup>4</sup>, suure energiaga kiiritamist, pihustuspürolüüsi<sup>5</sup> ja ionide implanteerimist ning keemilised meetodid hõlmavad keemilise redutseerimise tehnikat, sonokeemilist meetodit<sup>6</sup>, soolgeeli protsessi<sup>7</sup>, mikroemulsiooni meetodit ja elektrokeemiat. Bioloogilised meetodid, mida nimetatakse ka roheliseks nanoosakeste biosünteesiks, hõlmavad taimeekstraktide, mikroorganismide, ensüümide ja isegi mõnede põllumajandusjäätmete kasutamist nanoosakeste sünteesil. Erinevalt keemilistest meetoditest, milles kasutatavad kemikaalid võivad põhjustada (keskkonna)toksilisust, peetakse bioloogilisi nanoosakeste sünteesimeetodeid keskkonnasäästlikuks lähenemisviisiks. Teatud juhtudel võivad bioloogiliselt toodetud nanoosakeste eriomadused, sealhulgas kõrge katalüütiline aktiivsus, madal toksilisus, kõrge

---

<sup>3</sup> Nanolitograafia – nanotehnoloogia haru, mis tegeleb nanoelektronika komponentide valmistamisega, mida kasutatakse mikroprotsessorites, mälukaartides ja rakendusotstarbelistes mikroskeemides.

<sup>4</sup> Laserablatsiooni meetod – võtete kogum süsinik-nanotorude tootmiseks.

<sup>5</sup> Pihustuspürolüüs – keemiliste ühendite lagundamise meetod, mille käigus kasutatav lähtelahus pihustatakse aerosooliks ning seejärel pürolüüsitakse kas kuumutatud substraadil või reaktoris.

<sup>6</sup> Sonokeemiline meetod – protsess, mille käigus kasutatakse sonokeemia võtteid, et viia molekulid keemilisse reaktsiooni tugeva ultraheli kiirgusega.

<sup>7</sup> Soolgeeli protsess – protsess, mille käigus prekursor lahustatakse (tavaliselt metallikalkoksiid) vees või alkoholis ja muundatakse geeliks kuumutamise ja segamise teel hüdrolyüüsis või alkoholüüsis.

stabiilsus ning hea biosobivus ja biolagunevus, eristada neid muude meetoditega toodetud nanoosakestest. (Rahimi, Doostmohammadi, 2019, lk 2)

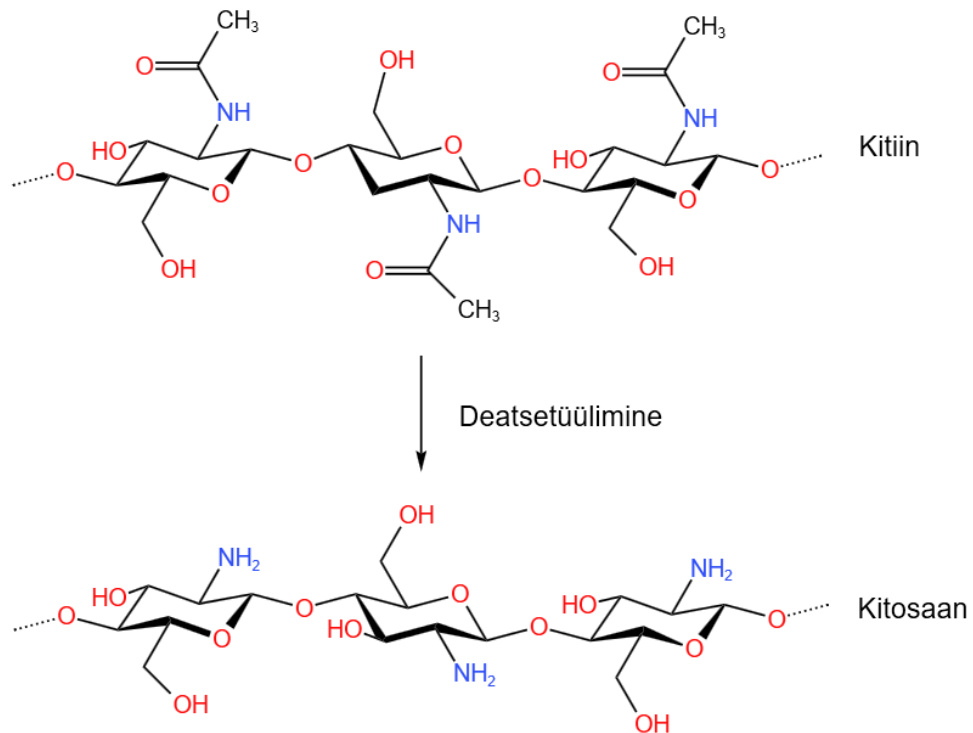
### **Hõbeda nanoosakesed**

Hõbedal (Ag) põhinevaid ühendeid ja nanoosakesi tuntakse antimikroobsete ainetena juba antiikajast. Kolloidset Ag nanoosakesi sisaldavat suspensiooni (kollargooli) kasutatakse meditsiinis aastast 1911. (Nowack *et al.*, 2011, lk 1177) Tänapäeval on hõbedat, kas ioonsel, kolloidisel või nanoosakeste kujul, laialdaselt kasutatud selle antimikroobsete omaduste pärast. Hõbeda nanoosakeste kasutamine on leidnud rakendust nt reoveepuhastuses, põllumajanduses ja tekstiilitööstuses. Samuti on hõbeda nanoosakesed kasutuses juba tarbekaupades, nagu tekstiilid, kosmeetika, filtrid, puhastusvahendid ja muudes toodetes. Mitu uuringut on näidanud, et hõbedal on antibakteriaalne toime paljude grampositiivsete (nt *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ja *Listeria monocytogenes*) ja gramnegatiivsete (nt *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* ja *Salmonella typhimurium*) bakterite vastu. Hõbe on ka aine, mida on kasutatud resistentsete ja biokilet moodustavate bakterite *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. flexneri* ja *S. aureus* vastu. (Kubo, 2019, lk 13) On näidatud, et hõbeda nanoosakesed või lahustunud hõbeda ioonid (Ag<sup>+</sup>) võivad tekitada reaktiivseid hapnikuvorme, kahjustada bakterite rakukesta ja membraani, häirida valgusünteesi ja ATP tootmist (Yin *et al.*, 2020, lk 2556).

## **1.2. Kitosaan**

Kitosaan on polükatioonne polüsahhariid, mida on perspektiivne kasutada biomeditsiinis, kuna ta on biosobiv ja biolagunev, antimikroobsete omadustega, kuid mittetoksiline inimesele. Lisaks annab aminorühmade olemasolu kitosaani struktuuris sellele kõrge bioloogilise aktiivsuse ja reaktsioonivõime. (Costa *et al.*, 2022, lk 2) Samuti on näidatud, et kitosaani saab edukalt kasutada redutseeriva ning stabiliseeriva polümeerina metalliliste nanoosakeste sünteesil (Mirda *et al.*, 2021, lk 2).

Kitosaan on kitiini deatsetüleeritud vorm (joonis 1), koosnedes D-glükoosamiini ja N-atsetüül-D-glükoosamiini jääkidest. Kitiinist on võimalik kitosaani saada peamiselt kahel viisil, ensümaatilisel ja keemilisel hüdrolüüsil. Kitiin ( $C_8H_{13}O_5N$ )<sub>n</sub> on looduses laialt levinud polümeer, nt on kitiin molluskite, putukate ja vähilaadsete väliskeleti põhikomponent. (Ahmed, Ikram, 2016, lk 2)



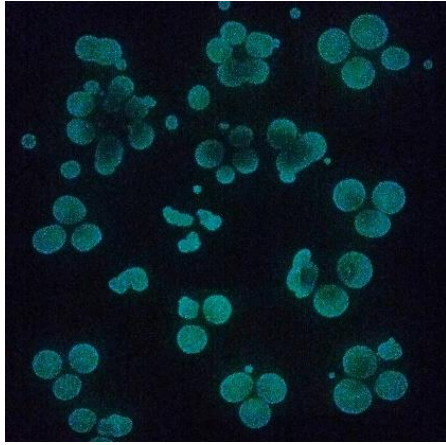
Joonis 1. Kitiini deatsetüülimine kitosaaniks (joonis tehtud programmiga KingDraw).

Kitiini kristalsed mikrofibrillid sisalduvad lüljalgsete eksoskelettides ja seente rakuseintes, kus need aitavad tekitada jäikust ning tugevust. Kitiini ja seda hüdrolüüsivaid ensüüme on leitud paljudes elusolendites nii maismaal kui ka vees. Kitiini lagundavad looduses ensüümid, millest tuntuim on kitinaas. Kitiini leidub ka fossiilides. Selle kristalse materjali kogunemine ja säilimine miljonite aastate jooksul tuleneb asjaolust, et kitiin on vees lahustumatu isegi kõrgetel temperatuuridel. (Dar, Galil, 2022, lk 6–7)

### 1.3. Looduslikult luminesceeruvad bakterid *Vibrio fischeri*

Bakter *Vibrio fischeri* (ametlik nimetus *Aliivibrio fischeri*), kuulub *Vibrionaceae* sugukonda. Sellesse sugukonda kuulub mitusada liiki baktereid. Inimpatogeensed liigid on nt kooleratekitaja *Vibrio cholerae*, sepsise tekitajad *Vibrio parahaemolyticus* ja *Vibrio vulnificus*. Mittepatogeensed liigid, sealhulgas ka mitmed kasulikud sümbiondid, moodustavad suurema osa *Vibrionaceae* esindajatest. Nende seas on ka käesoleva töö raames kasutatud bakter *Vibrio fischeri*. (Ruby *et al.*, 2005, lk 3004, LPSN)





Joonis 2. Bakteri *Vibrio fischeri* bioluminestseeruvad agarsöötmele kasvanud kolooniad, pildistatud pimedas.



Joonis 3. Bakteriga *Vibrio fischeri* sümbioosis elav kalmaar *Euprymna scolopes* (National Science Foundation, 2012).

*V. fischeri* (joonis 2) on looduslikult luminesseeruv gramnegatiivne merebakter, mis elutseb sümbioosis erinevate mereloomadega, nt leidub neid baktereid teatud kalmaaride ja kalade valgusorganites. Bakterid, arhed ja eukarüootsed (päristuumsed) mikroorganismid on paljudel juhtudel mitmerakuliste organismide üldlevinud ja lähedased kaaslased. Paljud neist mikroobidest on vajalikud oma peremeesorganismidele, mõjutades mitmeid aspekte, sealhulgas kasvukiirust, immuunfunktsiooni, toitainete jaotumist ja käitumist. Eriti põhjalikult on uuritud kalmaari *Euprymna scolopes* (joonis 3) ja valgust tootva bakteri *V. fischeri* sümbioosi. (Bosch, 2019, lk 2799) Äsja koorunud kalmaar *Euprymna scolopes* peab kätte saama *V. fischeri* rakud ümbritsevast mereveest (Norsworthy, Visick, 2013, lk 1). Selleks hakkab kalmaar peale koorumist eritama lima. *V. fischeri* selekteeritakse selles limas välja ainsa sümbiondina teiste samas keskkonnas olevate bakterite hulgast, kust ta siis edasi peremeesorganismi valgusorganisse liigub ja seal kogu oma eluea elab ja paljuneb. (Bosch, 2019, lk 2799) Kuna *V. fischeri* on merebakter ja elab ookeanides, siis on tema jaoks optimaalne kõrge soolsusega kasvukeskkond (ligi 20 g/l) ja kõige sobivam kasvutemperatuur 15 °C. (Christensen, Visick, 2020, lk 3; ISO standard 21338:2010)

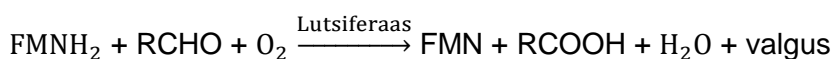
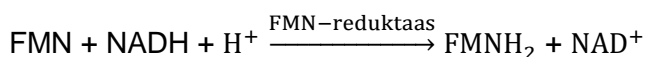
### **Bioluminestsents**

Bioluminestsents on organismi võime läbi keemiliste reaktsioonide toota ja kiirata mittesoojuslikku valgust. Maismaal on bioluminestsents suhteliselt haruldane nähtus, kuid ookeanis on see väga levinud, eriti pelaagilises (avaveelises) veesambas, kus 80% 200–1000 meetri sügavusel elavatest organismidest on bioluminestseeruvad. Bioluminestsents on kõige levinum nt kalade, kalmaaride, meduuside, putkloomade (sifonofooride), kammloomade, seente, bakterite, vetikate seas. Bioluminestsents tekib ensümaatiliste reaktsioonide tulemusena ja see on ka inimesele palja silmaga näha – tavaliselt sinakas, kuid võib ulatuda

peaaegu violetsest rohekaskollaseni ja väga harva ka punase värvuseni. Erinevatele eriti meresügavuses elavatele organismidele võib bioluminestsents olla vajalik kas ellujäämiseks (toidu ligi meelitamine, enda kaitsmine) või paljunemiseks (vastassugupoole leidmine). (NOAA Ocean Exploration)

Kõige arvukama rühma bioluminestseeruvatest organismidest moodustavad bakterid. Need bakteriliigid võivad olla nii vabalt elavad kui ka parasiidiks või sümbiondiks looduslikult mittehiilgavates organismides. Eriti laialt on helendavad bakterid levinud merekeskkonnas. Neid on isoleeritud erinevatest allikatest, sealhulgas mereveest, setetest, aga ka nt organismide valgusorganitest. Enamik helendavaid bakteriliike kuuluvad *Vibrionaceae* sugukonda (nt perekonnad *Vibrio* ja *Photobacterium*). (Shimomura, 2012, lk 31–32)

Bakterite kasv ja luminestsentsi intensiivsus sõltub mitmest tegurist, nagu nt hapniku kontsentratsioonist, toitainetest, temperatuurist ning autoinduktorist<sup>8</sup>. Valgusreaktsiooniks on vajalik bakterite arvukuse tõus teatud tasemeni, mis põhjustab autoinduktori lokaalset kontsentratsiooni tõusu ning seeläbi bioluminestsentsireaktsiooni kodeerivate geenide tootmise käivitumist. (Balows *et al.*, 1992, lk 3895) Bakterite bioluminestsents tekib keeruliste biokeemiliste reaktsioonide tulemusena. Bioluminestsentsireaktsioonis oksüdeeritakse ensüümi lutsiferaas<sup>9</sup> katalüüsimisel redutseeritud flaviinmononukleotiid (FMNH<sub>2</sub>) ja pikaahelaline rasvhappealdehüüd (RCHO), mille tulemusena eraldub sinakasroheline valgus (lainepikkusega 490 nm). (Shimomura, 2012, lk 31–32; NLM, FMN reductase) Bioluminestsentsi tekke reaktsioonid on välja toodud järgmisel skeemil:



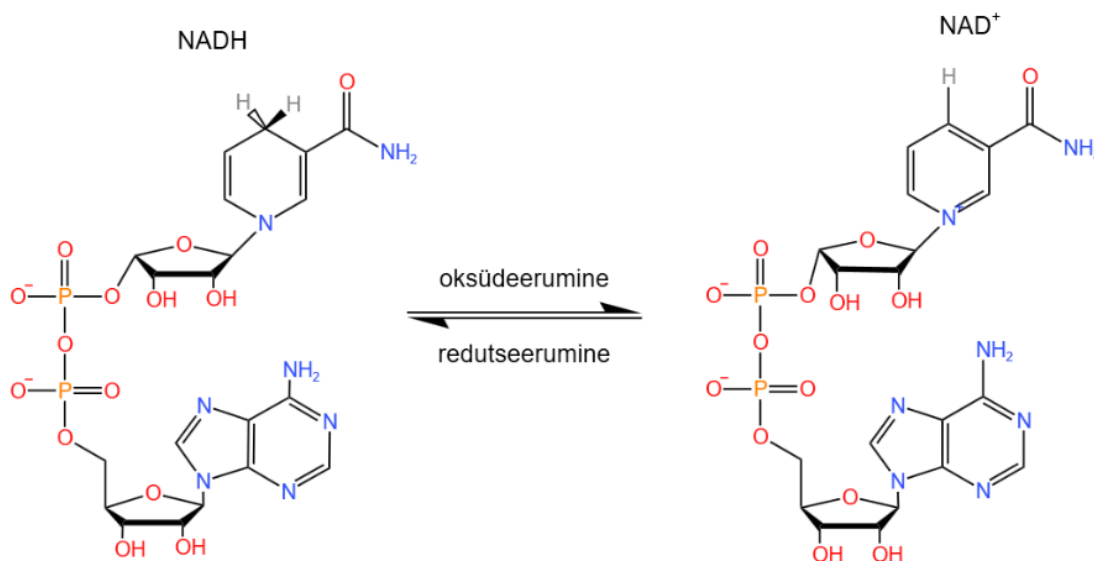
### **NADH ja NAD<sup>+</sup>**

NADH on koensüüm, mida leidub kõigis elusrakkudes. Selle keemiline valem on C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub>. See koosneb kahest nukleotiidist, millest üks nukleotiid sisaldab adenini alust ja teine nikotiinamiidi. NADH on ainevahetussaadus ning see on vajalik teatud ensüümide aktiveerimiseks. NADH on NAD<sup>+</sup> redutseeritud vorm ja NAD<sup>+</sup> on NADH oksüdeeritud vorm (joonis 4). Seda leidub looduses palju ja see osaleb paljudes ensümaatilistes reaktsioonides, milles see toimib elektronide kandjana, olles vaheldumisi oksüdeeritud (NAD<sup>+</sup>) ja redutseeritud (NADH). NAD<sup>+</sup> nimetatakse nadiidiks. Selle keemiline valem on C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub>. (PubChem, CID 5892; CID 439153) NADH ehk redutseeritud nikotiinamiid adeniin dinukleotiid on

<sup>8</sup> Autoinduktorid – signaalmolekulid, mis tekivad rakupopulatsiooni tiheduse muutuste tagajärjel.

<sup>9</sup> Lutsiferaas – ensüüm, mis kiirendab bioluminestsentsi ehk helendamist põhjustavat reaktsiooni.

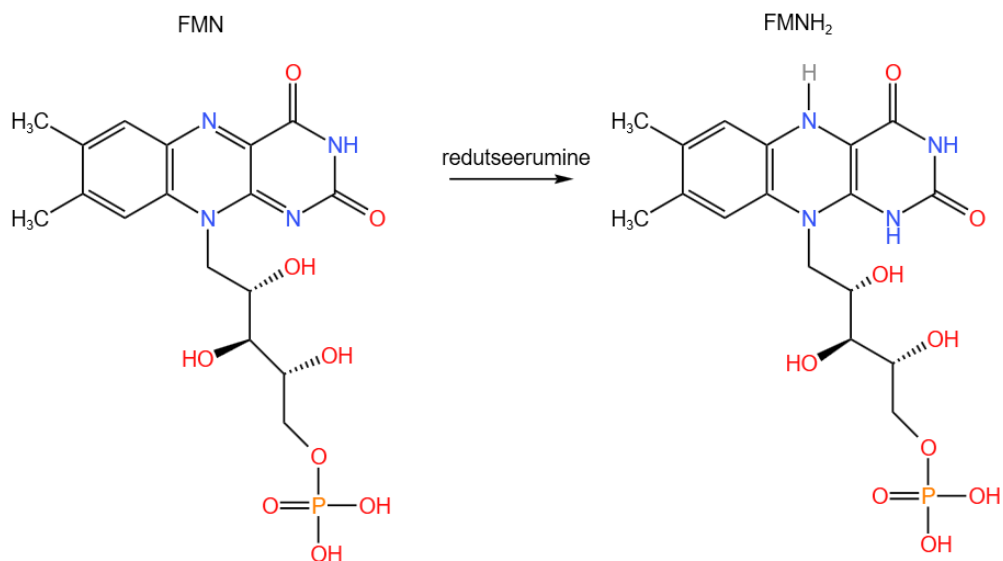
kemikaal, mida inimese kehas valmistatakse niatsiinist, mis on teatud tüüpi B-vitamiin. NADH aitab näiteks ka inimese kehal energiat toota. (Dellwo, 2022, lk 1)



Joonis 4. NADH oksüdeerumine ja NAD<sup>+</sup> redutseerumine (joonis tehtud programmiga KingDraw).

## FMN

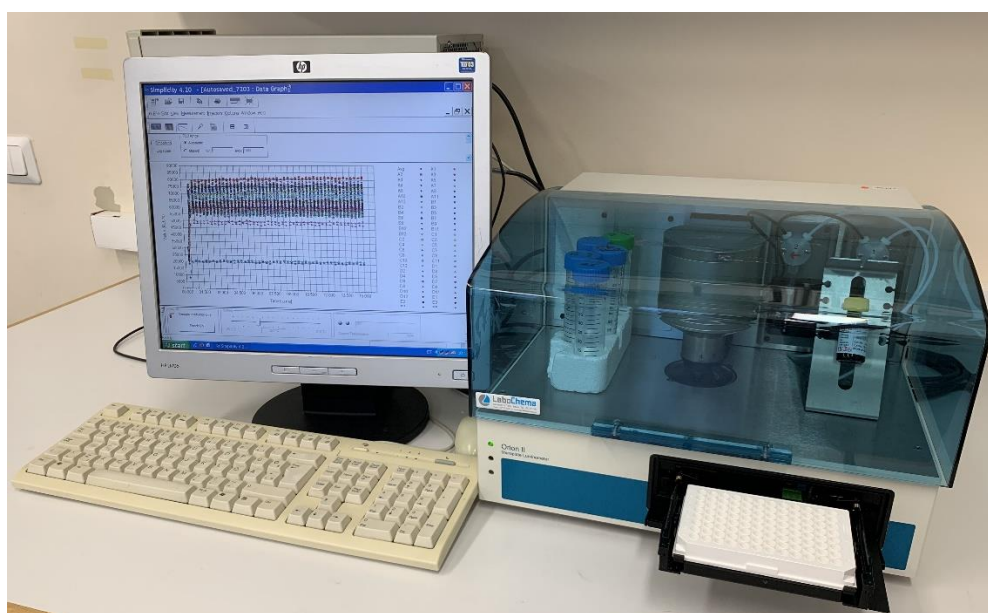
FMN on flaviin mononukleotiid. Selle keemiline valem on  $C_{17}H_{21}N_4O_9P$ . FMN on riboflaviin (vitamiin B2), milles primaarne hüdroksürühm on muudetud divesinikfosfaatestriks. Sellel on koensüümi roll ja see on vajalik teatud ensüümide aktiveerimiseks ning see on nt bakteri, inimese ja hiire ainevahetusesaadus. FMNH<sub>2</sub> on flaviin mononukleotiidi redutseeritud 1,5-dihüdrovorm (joonis 5). Selle keemiline valem on  $C_{17}H_{23}N_4O_9P$ . FMN-reduktaas on ensüüm, mis kasutab flaviinide redutseerimiseks NADH-d või NADPH-d. See osaleb paljudes bioloogilistes protsessides, mille funktsioonide, näiteks bakterite bioluminestsentsi jaoks on vaja redutseerida flaviini. (PubChem, CID 643976; CID 445395)



Joonis 5. FMN redutseerumine FMNH<sub>2</sub>-ks (joonis tehtud programmiga KingDraw).

### Toksilisuse testimine *Vibrio fischeri* bakteritega

Baktereid leidub kõikjal meid ümbritsevas keskkonnas (õhus, vees ja pinnases). Bakteritel on ainete lagundajatena väga oluline roll toiduahelas. Bioluminestseeruvaid baktereid (sh *Vibrio fischeri*) ning bioluminestsentsi inhibeerimise testi on laialdaselt kasutatud ökotoksilisuse testimiseks nii erinevate kemikaalide (sh nanomaterjalid), kui ka keskkonna- ja tööstusproovide puhul. Bioluminestsentsireaktsioon on tihedalt seotud bakteriraku energeetilise metabolismiga. (ISO standard 21338:2010) Tänu sellele on iga raku metabolismile mõjuv toksiline muutus (antud töös potentsiaalselt toksilise kemikaali põhjustatud kahjulik mõju) detekteeritav bioluminestsentsi vähenemise kaudu.



Joonis 6. Mikroplaatluminomeeter Orion II (*Berthold Detection Systems*, Saksamaa).

Looduslikult luminesceeruvaid baktereid, sh *V. fischeri*, on kemikaalide ökotoksilisuse määramiseks kasutatud alates 1979. aastast ehk juba enam kui 40 aastat. Käesolevas töös kasutati kemikaalide toksilisuse määramiseks modifitseeritud 30-min kineetilise bioluminestsentsi inhibitsiooni testi (ISO standard 21338:2010), mis sobib hästi värviliste, häguste ning tahkeid osiseid sisaldavate proovide jaoks. Antud uurimistöös kasutatud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide ja tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakeste suspensioonid olid värvilised. Toksiliste proovidega kokku puutudes bakterite *V. fischeri* bioluminestsents väheneb, kusjuures selle vähenemine on proportsionaalne proovi toksilisusega. Uuritavate kemikaalide toksilisust bakteritele väljendatakse bioluminestsentsi inhibitsioonina. Bioluminestsentsi mõõdetakse luminomeetriga ja selle tulemus väljendatakse suhtelise valgusühikuna (*Relative Light Units*, RLU). On olemas nii tuub- kui mikroplaatluminomeetreid. Käesolevas töös kasutati mikroplaatluminomeetrit (joonis 6), sest vastavalt tootja infole ja töögrupi varasematele eksperimentidele on osa protsessist automatiseeritud (bakterite dispenseerimine) ja proovimahud võivad olla väiksemad (50–100 µl).

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

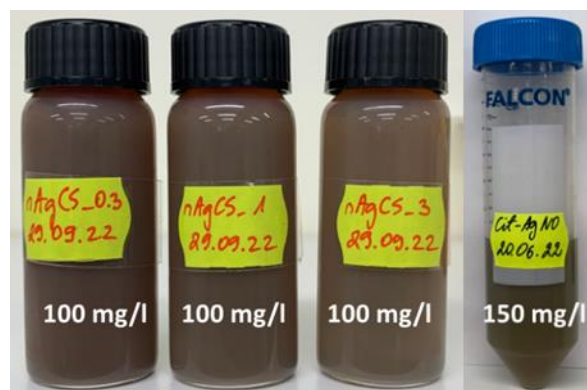
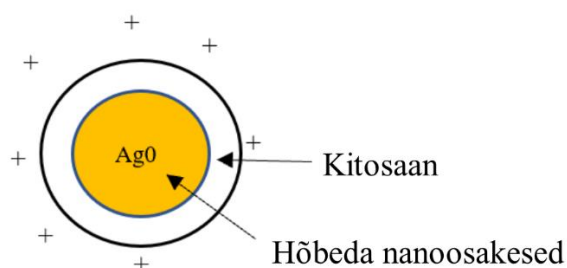
### 2.1. Kasutatud materjalid

#### Hõbeda-kitosaani nanokomposiidid

Käesolevas töös uuriti hõbeda (Ag) nanoosakestest ja kitosaanist (CS) koosnevaid hõbeda-kitosaani nanokomposiite (nAgCS), mis olid juba VAREM KBFI Keskkonnatoksikoloogia laboris sünteesitud hõbenitraadi ( $\text{AgNO}_3$ ) redutseerimisel trinaatriumtsitraadiga ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) (joonis 7). Kokku kasutati töös kolme nanokomposiiti erineva hõbeda ja kitosaani massisuhtega:

- 1) 1 osa hõbedat ja 0,3 osa kitosaani – nAgCS\_0,3
- 2) 1 osa hõbedat ja 1 osa kitosaani – nAgCS\_1
- 3) 1 osa hõbedat ja 3 osa kitosaani – nAgCS\_3

Kontrollina uuriti tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakesi (Cit-Ag NO) (joonis 7). Kõikide uuritud nanokomposiitide suspensioonide Ag kontsentratsioon oli 100 mg/l.



Joonis 7. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide lihtsustatud skeem (Puusta, 2022) (vasakpoolne paneel) ning uurimistöös käsitletud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAgCS) ja tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakeste (Cit-Ag NO) suspensioonid deioniseeritud vees (Milli-Q, Merck Millipore) (parempoolne paneel).

#### Toksilisuse testis kasutatud bakterid

Toksilisuse katses kasutati Aboatox OY (Turu, Soome) toodetud külmuivatatud bakteri *V. fischeri* (varem tuntud ka kui *Photobacterium phosphoreum* NRRL B-11177 ning kehtiva nimetusega *Aliivibrio fischeri*) preparaati. Seda säilitati  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures ning kasutati vastavalt tootja instruksioonidele. Külmuivatatud bakteripreparaadi rehüdreerimiseks kasutati spetsiaalset lahjendusvedelikku ehk diluenti (1243-551 Reagent), mille pH oli 7 ning mis sisaldas 1 l deioniseeritud vee kohta 20 g naatriumkloriidi ( $\text{NaCl}$ ), 2,035 g magneesiumkloriidheksahüdraati ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ja 0,30 g kaaliumkloriidi ( $\text{KCl}$ ). Katse jaoks valmistati kokku 0,5 l diluenti ja bakterikultuuri rehüdreerimiseks lisati  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  välja võetud *V. fischeri* preparaadi pudelisse 12 ml diluenti, mis oli seisnud  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures. Seejärel

stabiliseeriti saadud bakterisuspensiooni vähemalt 30 minutit +4 °C juures ning siis veel 30 minutit toatemperatuuril (u 20 °C) enne toksilisuse testi alustamist.

## 2.2. Metoodika

### Nanomaterjalide füüsikalise-keemiliste omaduste iseloomustamine

Kasutades dünaamilist (*Dynamic Light Scattering*, DLS) ja elektroforeetilist (*Electrophoretic Light Scattering*, ELS) valgushajuvuse meetodit ning instrumenti Malvern Zetasizer Nano ZC (Malvern Instruments Ltd, UK), määrati hõbeda-kitosaani nanokomposiitide ja tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakeste keskmine hüdrodünaamiline suurus ( $D_h$ ), pinnalaeng ( $\zeta$ -potentsiaal) ning polüdisperssuse indeks (*Polydispersity Index*, PDI). Töös käsitletud nanomaterjalide omadusi analüüsiti võrdlevalt deioniseeritud vees ja bakterite testsöötmes (2% NaCl).

Uuritavate nanomaterjalide suspensioonide stabiilsust hinnati 24-h settimiskatsega:

- 1) kvalitatiivselt proovide visualiseerimisega 2% NaCl-s kontsentratsioonil 50 mg Ag/l;
- 2) kvantitatiivselt dünaamilise valgushajuvuse meetodil võrdlevalt deioniseeritud vees ja 2% NaCl lahuses kontsentratsioonil 10 mg Ag/l.

Nanoosakeste suuruse määramiseks lahuses kasutatakse dünaamilist valguse hajumist (DLS), mida nimetatakse ka footonkorrelatsioonispektroskoopiaks või kvaasielastseks valguse hajumiseks. Suspensioonis olevate osakeste või molekulide Browni liikumine põhjustab laservalguse hajumist erineva intensiivsusega. DLS mõõdab osakeste hüdrodünaamilist suurust laseri valguse hajumise mehhanismi abil, mis läbib kolloidlahust, ja analüüsib hajutatud valguse intensiivsuse muutust aja funktsioonina. Nende intensiivsuse kõikumiste analüüs annab Browni liikumise kiiruse ja seega ka osakeste suuruse, kasutades Stokes-Einsteini seost. Osakeste Browni liikumine korreleerub nende hüdrodünaamilise suurusega. Mida väiksem on osake, seda kiiremini see hajub ja DLS-i instrument genereerib korrelatsioonifunktsiooni, mis on matemaatiliselt seotud osakese suuruse ja selle ajast sõltuva valguse hajumise võimega. DLS-i on kasutatud dispergeerivate<sup>10</sup> kolloidsete proovide osakeste suuruse mõõtmiseks, proovide stabiilsuse uurimiseks ja agregatsiooni või aglomeratsiooni tuvastamiseks. (Raval *et al.*, 2019, lk 371)

Elektroforeetiline valguse hajumine mõõdab dispersioonis olevate osakeste või lahuses olevate molekulide elektroforeetilist liikuvust. See liikuvus muundatakse sageli zeta- ( $\zeta$ -) potentsiaaliks, et võimaldada materjalide võrdlemist erinevates katsetingimustes. ELS ühendab valguse hajumise elektroforeesiga. Dispersiooni (pihusesse) viiakse kaks elektroodi. Elektroodidele rakendatakse elektrivälja ja iga laetud osake või molekul liigub elektroodi suunas,

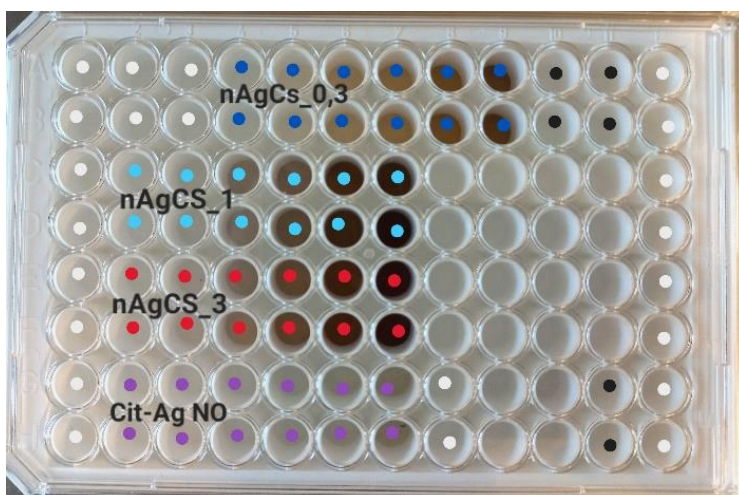
---

<sup>10</sup> Dispergeeriv aine – kemikaal, mille abil emulgeeritakse, hajutatakse või stabiliseeritakse mingisse keskkonda sattunud ainet.

mis on selle osakese laengu märgiga vastandmärgiline, kiirusega, mis sõltub selle laengust. Mõõdetud elektroforeetiline liikuvus muudetakse tavaliselt zeta-potentsiaaliks, mis näitab osakese pinnalaengut. ELS-i kasutamine on tavaliselt seotud dispersiooni stabiilsuse ja koostise rakendustega. Osakesed või molekulid, millel puudub netolaeng, võivad omavahel seostuda, mis võib olla väljakutseks sellistes süsteemides, mis on alati agregatsioonile. Osakesed või molekulid, millel on kas neto-positiivne või neto-negatiivne laeng, hoiavad üksteisest paremini distantse, luues stabiilse süsteemi. (Malvern Panalytical)

### Kineetiline bioluminestsentsi inhibitsiooni test

Valitud kemikaalide toksilisuse määramiseks kasutati modifitseeritud *V. fischeri* 30-min kineetilise bioluminestsentsi inhibitsiooni testi (ISO standard 21338:2010), millega saab analüüsida ka värvilisi ja häguseid lahuseid või suspensioone ning tahkeid osiseid sisaldavaid proove, kuna iga proov on iseenda kontrolliks. Katse viidi läbi 96-kaevuga mikroplaadidel ja toatemperatuuril (20 °C), mitte 15 °C juures, nagu näeb ette ISO standard, kuna töös kasutatud luminomeetri temperatuuri ei olnud võimalik reguleerida toatemperatuurist madalamale.

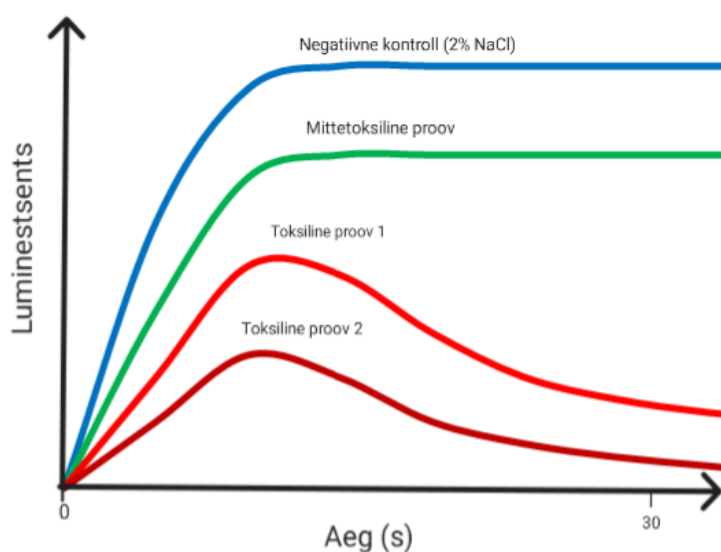


Joonis 8. Mikroplaat koos käesolevas töös uuritud kemikaalidega, kus valgega märgitud negatiivne kontroll (2% NaCl) ja mustaga positiivne kontroll ( $ZnSO_4$ ). Erinevate värvidega on tähistatud testitud komponendid.

96 kannuga luminestsentsi määramiseks sobiva mikroplaadi (Greiner Bio-One, Austria) igasse kaevu pipeteeriti 100  $\mu$ l testitava kemikaali lahust 2% NaCl-s (joonis 8). Seejärel asetati mikroplaat luminomeetrisse (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Saksamaa), kus selle testkambris dispenseeriti igasse mikroplaadi kaevu 100  $\mu$ l bakterisuspensiooni (*V. fischeri*). Luminestsents registreeriti (tarkvaraga Simplicity Version 4.2) esimese 30 sekundi jooksul pärast aktiivse bakterisuspensiooni dispenseerimist ning uuesti pärast 30-minutilist inkubeerimist. Kui uuritav aine on bakterile toksiline, siis põhjustab see luminestsentsi vähenemise (inhibitsiooni) (joonis 9). Negatiivse kontrollina kasutati 2% NaCl ning positiivse kontrollina ISO standardis ühte ette nähtud kemikaali, tsinksulfaati ( $ZnSO_4$ ), mis põhjustab



uuritavatel bakteritel bioluminestsentsi inhibitsiooni. Kõik testitavad nanomaterjalid ja kemikaalid ning nende lahjendused (nanomaterjalide puhul: 0,1; 1; 5; 10; 25 ja 50 või 75 mg Ag/l ning ZnSO<sub>4</sub> puhul: 0,8; 1,6; 3,1; 6,3; 12,5 ja 25 mg Zn/l) valmistati 2% NaCl-s. Kõiki uuritavaid kemikaale testiti kolmel erineval päeval, iga kemikaali kuues lahjenduses ja kahes korduses. Igasse katsesse kaasati alati nii negatiivne kui ka positiivne kontroll. Toksilisuse väärtused (poolefektiivne kontsentratsioon, EC<sub>50</sub><sup>11</sup>) arvutati doosi-vastuse kõverate põhjal REGTOXi tarkvaraga Microsoft Exceli jaoks, kasutades Log-normal mudelit (Vindimian, 2023, lk 1).



Joonis 9. Lihtsustatud skeem bakterite bioluminestsentsi 30-sekundi kineetika kohta peale erinevate proovidega kokkupuudet.

### Elulemuse test

Kineetilise bioluminestsentsi inhibeerimise testi lõpus teostati elulemuse test (nn *Spot test*), et hinnata toksilistele kemikaalidele eksponeeritud bakterite (antud juhul *V. fischeri*) võimet moodustada kolooniaid agarsöötmel. Selleks inkubeeriti baktereid koos uuritavate kemikaalidega toatemperatuuril 1 ja 24 tundi. Elulemuse testi jaoks pipeteeriti igast mikroplaadi kaevust 3 µl proovi eelnevalt valmistatud Beneckea-Harvey (BH) agarsöötmele, mis 1 l deioniseeritud vee kohta sisaldas 3 g pärmiekstrakti, 5 g trüptooni, 2 ml 99% glütserooli, 30 g naatriumkloriidi (NaCl), 9,45 g dinaatriumvesinikfosfaat dodekahüdraati (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O), 1 g kaaliumdivesinikfosfaati (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,5 g diammooniumfosfaati ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,3 g magneesiumsulfaatheptahüdraati (MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) ja 15 g agarit. Sööde autoklaaviti 121 °C juures 15 minutit ja valati steriilsetele Petri tassidele. 72 tunni möödudes hinnati visuaalselt

<sup>11</sup> Kemikaali poolefektiivne kontsentratsioon, EC<sub>50</sub>, mis põhjustab 50%-list efekti (antud katsete puhul bakterite bioluminestsentsi languse).

kolooniate moodustumist agarsöötmele ning määrati nanomaterjalide minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon (*Minimum Bactericidal Concentration*, MBC) – väikseim testitud kontsentratsioon, mis tapab bakterid (ei teki enam bakterikolooniaid agarsöötmele).

## 2.3. Tulemused ja arutelu

### 2.3.1. Nanokomposiitide füüsikalised-keemilised omadused

Käesolevas töös mõõdeti kolme hõbeda-kitosaani nanokomposiidi (nAgCS\_0,3, nAgCS\_1 ja nAgCS\_3) ning tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakeste (Cit-Ag NO) keskmist hüdrodünaamilist suurust, pinnalaengut ning polüdisperssuse indeksit (PDI) deioniseeritud vees ning bakteri testsöötmes (2% NaCl lahus) (tabel 1).

Tabel 1. Uuritud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAgCS) ning tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakeste (Cit-Ag NO) füüsikalised-keemilised omadused deioniseeritud vees ja toksilisuse testsöötmes (2% NaCl) kontsentratsioonil 10 mg Ag/l.

Hõbeda-kitosaani nanokomposiidi d (nAgCS)	Ag:CS sisaldus, mg/l	Primaar - suurus <sup>(1)</sup> , nm	Hüdrodünaamiline suurus (Dh), nm		Polüdisperssuse indeks (PDI)		ζ-potentsiaal <sup>(2)</sup> , mV
			DI vesi	2% NaCl	DI vesi	2% NaCl	
nAgCS_0,3	100 : 30	40–50	102	113	0,22	0,29	+15,8
nAgCS_1	100 : 100	40–50	91	91	0,32	0,27	+21,8
nAgCS_3	100 : 300	40–50	79	110	0,45	0,29	+26,4
Cit-Ag NO	100 : 0	40–50	36	248	0,48	0,30	–36,1

<sup>(1)</sup> transmissioonelektronmikroskoopia analüüsi tulemus, ei saadud käesoleva töö raames

<sup>(2)</sup> ζ-potentsiaali ei olnud 2% NaCl-s võimalik mõõta.

Kõigi uuritavate hõbeda-kitosaani nanokomposiitide primaarsuurused olid 40–50 nm ning nende keskmised hüdrodünaamilised suurused deioniseeritud vees ja testsöötmes vastavalt 79–102 nm ja 91–113 nm. Deioniseeritud vees mõõdetud tulemustest nähtub, et mida suurem oli kitosaani osakaal nanokomposiidis, seda väiksem oli selle hüdrodünaamiline suurus (nAgCS\_3 Dh = 79 nm vs nAgCS\_0,3 Dh = 102 nm). 2% NaCl puhul sellist korrelatsiooni ei olnud. Kahe nanokomposiidi, nAgCS\_0,3 ja nAgCS\_3, hüdrodünaamilised suurused testsöötmes (2% NaCl) olid mõnevõrra suuremad kui deioniseeritud vees (kuni 1,4 korda), nAgCS\_1 puhul sellist erinevust ei olnud.

Tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakeste primaarsuurus oli samuti 40–50 nm ning keskmine hüdrodünaamiline suurus testsöötmes (2% NaCl) pea seitse korda suurem kui deioniseeritud vees, vastavalt 248 ja 36 nm. See võib olla põhjustatud osakeste agregatsioonist kõrgema ioonse jõuga lahuses.

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide pinnalaengut oli võimalik mõõta ainult deioniseeritud vees. Põhjuseks, miks seda testsöötmes ei saanud mõõta, võivad olla lahustunud  $\text{Na}^+$  ja  $\text{Cl}^-$  ioonid, mis segavad nanokomposiitide pinnalaengu mõõtmist. Kõikide nAgCS komposiitide  $\zeta$ -potentsiaal oli positiivne ( $>+15$  mV), mis võib olla tingitud kitosaani mõjust nanokomposiitidele, kuna ilma kitosaanita olid tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakesed negatiivselt laetud ( $-36$  mV).  $\zeta$ -potentsiaal annab infot osakeste stabiilsuse kohta suspensioonis. Kui  $\zeta$ -potentsiaali väärtus on suurem kui  $+30$  mV või väiksem kui  $-30$  mV on tegemist stabiilse suspensiooniga ja see tuleneb osakeste vahelisest elektrostaatilisest tõukumisest. Väiksema  $\zeta$ -potentsiaaliga suspensioonides (absoluutväärtus  $< 30$  mV) võivad osakesed agregeeruda tänu osakeste vahelistele Van der Waalsi jõududele. (Yerragopu *et al.*, 2020, lk 40) Kõige suurem  $\zeta$ -potentsiaal hõbeda-kitosaani nanokomposiitidest oli nAgCS\_3 ( $+26,4$  mV) ja kõige väiksem nAgCS\_0,3 ( $+15,8$  mV). Tsitraadiga kaetud hõbeda nanokomposiitide  $\zeta$ -potentsiaal oli seevastu negatiivne ( $-36,1$  mV). Siit saab järeldada, et deioniseeritud vees kõige stabiilsemad olid tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakesed ja suurema kitosaani sisaldusega nAgCS nanokomposiidid.

Kõikide hõbeda-kitosaani nanokomposiitide PDI deioniseeritud vees oli väiksem kui 0,5 ja testsöötmes (2% NaCl) ligikaudu 0,3. Deioniseeritud vees oli kõige väiksem nAgCS\_0,3 PDI väärtus (0,22) ja kõige suurem nAgCS\_3 väärtus (0,45), testsöötmes olid kõikide nAgCS komposiitide kui ka Cit-Ag NO polüdisperssuse indeksid samaväärsed (ca 0,30). Uuritavatest proovidest kõige suurem PDI väärtus (0,48) oli tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakestel deioniseeritud vees. Polüdisperssuse indeks (PDI) näitab osakeste suurusel põhinevat suspensioonide homo- või heterogeensust. PDI, mille väärtus on suurem kui 0,7, viitab laiale suurusjaotusele ja PDI, mille väärtus on väiksem kui 0,3, viitab homogeensele osakeste populatsioonile (Ovtšinnikova 2022: 27). Sellest lähtudes, saab järeldada, et testsöötmes (2% NaCl) oli kõikide uuritud nanokomposiitide populatsioonid homogeensed. Deioniseeritud vees oli väiksema kitosaani sisaldusega hõbeda-kitosaani nanokomposiitide populatsioonid homogeensemamad kui suurema kitosaani sisaldusega komposiitide populatsioonid (nAgCS\_0,3 PDI = 0,22 vs nAgCS\_3 PDI = 0,45).

### **2.3.2. Nanokomposiitide suspensioonide stabiilsus**

#### **Kvalitatiivne hindamine**

Uuritavate nanomaterjalide suspensioonide stabiilsust hinnati kvalitatiivselt (visuaalselt) settimiskatses 2 % NaCl-s kontsentratsioonil 50 mg Ag/l 24 h jooksul ajapunktidel 0 min, 30

min, 1 h, 3 h ja 24 h ning tulemused on esitatud lisas 1. Selleks pipeteeriti 1 ml analüüsivat suspensiooni 2 ml plastküvettesse ja pildistati ajapunktidel, mis valiti vastavalt bakteritega tehtavate testide pikkusele (30-min kineetiline bioluminestsentsi inhibeerimise test ning 1-h ja 24-h elulemuse test). Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide lahuste värvuses erilist muutust esimese 3 h jooksul ei toimunud. Peale 24 h inkubatsiooni oli nAgCS\_0,3 lahus võrreldes alglaheusega mõnevõrra heledamaks muutunud, kuid mitte läbipaistvaks. nAgCS\_1 ja nAgCS\_3 puhul oli peale 24 h näha vaid õrna värvuse kadumist, kuid mitte märkimisväärselt. Tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakeste puhul oli erinevust lahuse värvuses näha juba peale 30 minutit ning peale 3 h inkubatsiooni oli Cit-Ag NO välja settinud ning lahus läbipaistev. Nende andmete põhjal oli neljast uuritavast suspensioonist kõige stabiilsem 2% NaCl-s nAgCS\_3 ning kõige ebastabiilsem Cit-Ag NO, mis settis visuaalsel hinnangul juba esimese paari tunniga. Siit saab järeldada, et mida suurem on kitosaani sisaldus nanokomposiitides, seda stabiilsemad need suspensioonid on 2% NaCl lahuses.

### **Kvantitatiivne hindamine**

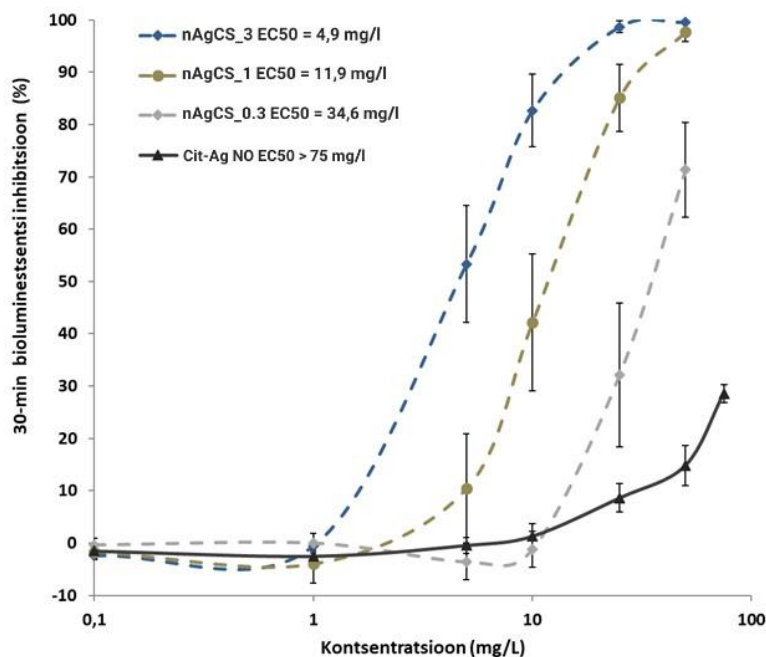
Kvantitatiivselt hinnati uuritavate nanomaterjalide suspensioonide stabiilsust dünaamilise valgushajuvuse meetodil (ingl *Dynamic Light Scattering/Mean Count Rate*) nii deioniseeritud vees kui ka 2% NaCl lahuses kontsentratsioonil 10 mg Ag/l ning tulemused on esitatud lisas 2. Instrument, Malvern Zetasizer Nano ZC, mõõtis 24 h jooksul dünaamilise valgushajumise meetodil osakeste hulka mõõtküvetis, mõõtühikuks oli kcps (ingl *kilo counts per second*) ehk keskmine detektorisse jõudvate footonite ehk elektromagnetilist vastastikmõju vahendavate osakeste arv sekundis. 10 kcps võrdub 10 000 footoniga sekundis. Kõikide hõbeda-kitosaani nanokomposiitide 0 h mõõtmistulemused deioniseeritud vees jäid sõltuvalt proovist 260–480 kcps juurde ning 24 tunni jooksul jäi see tulemus stabiilseks. NaCl 2% lahuses seevastu muutusid mõõtmistulemused 24 h jooksul kõigis neljas uuritavas suspensioonis ja tulemused olid kooskõlas kvalitatiivselt läbi viidud settimiskatsega (va Cit-Ag NO tulemus). Kõige stabiilsem 2% NaCl-s oli nAgCS\_3 suspensioon ja kõige ebastabiilsem Cit-Ag NO suspensioon (sadenes 2% NaCl ca 4 tunniga). Seega, 4 uuritavast nanomaterjalist kõige stabiilsem nii deioniseeritud vees kui ka NaCl 2% lahuses oli nAgCS\_3.

### **2.3.3. Toksilisus bakteritele *Vibrio fischeri***

#### **Kineetiline bioluminestsentsi inhibitsiooni test**

Analüüsitud nanomaterjalide doos-vastus kõverad ning nende toksilisus (30-min  $EC_{50}$  väärtused) bakterile *V. fischeri* on esitatud joonisel 10 ja tabelis 2. Kõige mürgisemaks osutus bakterirakkudele nAgCS\_3 (30-min  $EC_{50}$  = 4,9 mg/l), mille toksilisus oli sarnane positiivse kontrollina kasutatud tsinksulfaadiga (30-min  $EC_{50}$  = 6,9 mg Zn/l) ning mis oli seitse korda toksilisem kui nAgCS\_0,3. Tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakesed olid kõige vähem toksilised, 30-min  $EC_{50}$  > 75 mg Ag/l (kõrgeim testitud kontsentratsioon). Saadud tulemustest

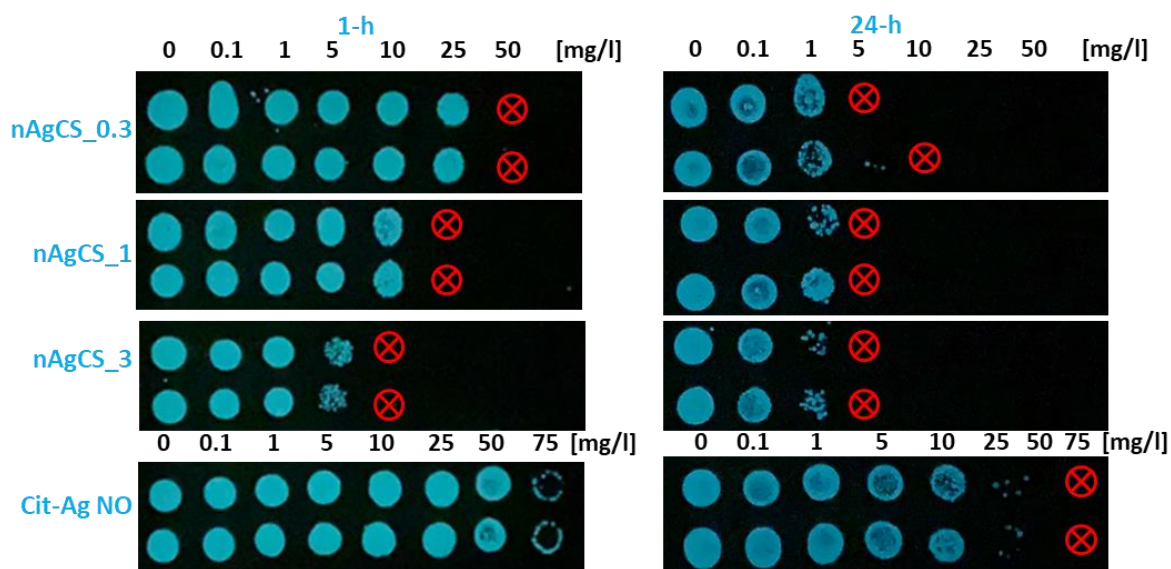
saab järeldada, et hõbeda-kitosaani nanokomposiitide mürgisus sõltus eelkõige kitosaani sisaldusest nanokomposiitides. Samuti on teada, et hõbeda nanoosakesi ümbritsev kitosaan stabiliseerib nanokomposiidi suspensiooni (joonis 7), hoiab ära agregatsiooni ja soodustab selle positiivse pinnalaengu tõttu seondumist negatiivselt laetud bakterirakuga. Kui hõbeda-kitosaani nanokomposiidid on bakterile kinnitunud, võivad hõbeda lahustunud ioonid rakku siseneda ja häirida raku toimimist. (Puusta, 2022)



Joonis 10. Testitud hõbeda nanomaterjalide doos-vastus kõverad ning nende toksilisus (30-min  $EC_{50}$  väärtused; pooleefektiivne kontsentratsioon) bakterile *V. fischeri* (Märkus: X-telg on logaritmilises skaalas).

### Bakterite elulemus

Minimaalse bakteritsiidse kontsentratsiooni (MBC) määramiseks kasutati elulemuse testi, inkubeerides baktereid koos uuritavate kemikaalidega 1 ja 24 tundi toatemperatuuril. Saadud tulemused on esitatud joonisel 11 ja tabelis 2. Tulemustest saab järeldada, et kõige tugevam toksiline toime on kõige suurema kitosaani sisaldusega nanokomposiidil – nAgCS\_3 (nAgCS\_3: 1-h MBC = 10 ja 24-h MBC = 5 mg Ag/l vs nAgCS\_0,3: 1-h MBC = 50 ja 24-h MBC = 5–10 mg Ag/l; Cit-Ag NO: 1-h MBC > 75 ja 24-h MBC = 75 mg Ag/l). See tulemus langeb kokku ka bioluminestsentsi inhibitsiooni testiga (joonis 10).



⊗ – MBC väärtus, bakterite kasvu ei olnud

Joonis 11. Testitud hõbeda nanomaterjalide 1- ja 24-h minimaalse biotsiidse kontsentratsiooni (MBC, mg Ag/l) väärtused bakterile *Vibrio fischeri*.

Tabel 2. Testitud hõbeda nanomaterjalide toksilisus (30-min EC<sub>50</sub> ning 1-h ja 24-h MBC väärtused) bakterile *Vibrio fischeri*.

Ag nanomaterjalid	30-min EC <sub>50</sub> , [mg Ag/l]	1-h MBC, [mg Ag/l]	24-h MBC, [mg Ag/l]
nAgCS_0,3	34,6	50	5–10
nAgCS_1	11,9	25	5
nAgCS_3	4,9	10	5
Cit-Ag NO	>75	>75	75

Vastavalt lihtsustatud keskkonnaohtlikkuse klassifikatsioonile (Bondarenko *et al.*, 2016, lk 1234)<sup>12</sup>, saab hinnata uuritud hõbeda-kitosaani nanokomposiite mürgiseks (nAgCS\_3) ja kahjulikuks (nAgCS\_1, nAgCS\_0,3). Seega ei tohiks sellised ühendid sattuda oma elutsükli vältel loodusesse. Teisalt on need ühendid tugeva antimikroobse toimega ja seega perspektiivsed kasutada biotsiidsete ühenditena biomeditsiinis või materjalitehnoloogias.

<sup>12</sup> Kemikaalide ohtlikkuse klassifikatsiooni kriteeriumid ökotoksikoloogias EC<sub>50</sub> väärtuste alusel: EC<sub>50</sub> ≤ 1 mg/l – väga mürgine; 1 < EC<sub>50</sub> ≤ 10 mg/l – mürgine; 10 < EC<sub>50</sub> ≤ 100 mg/l – kahjulik; EC<sub>50</sub> > 100 mg/l – ei klassifitseerita/ei ole keskkonnaohtlik.

# KOKKUVÕTE

Üha suuremaks probleemiks meditsiinis on antibiootikum-resistentsete bakteritüvede laialdane levik ning samuti haiglainfektsioonide kõrge esinemissagedus. Kui antibiootikumid 20. sajandil kasutusele tulid, usuti, et need aitavad lahti saada kõigist bakteriaalsetest haigustest. Antibiootikumid on tänapäevani väga olulised ravimid, kuid kiire antibiootikumi-resistentsete bakteritüvede tekkimine ja levik vähendavad nende tõhusust. Need probleemid muudavad infektsioonide ravi keeruliseks ja ebaefektiivseks. Üheks lahenduseks võiksid olla antimikroobse toimega nanomaterjalid ja nende kasutamine eelkõige haavainfektsioonide ravis ja meditsiiniseadmete pinnal. Nii hõbedal kui ka kitosaanil on antimikroobsed omadused, mis koostoimes võivad veelgi võimendada ning osutada biomeditsiinis perspektiivseks kombinatsiooniks.

Siinses uurimistöös uuriti nelja nanomaterjali füüsikalisi-keemilisi omadusi ning toksilisust looduslikult luminesceeruvale bakterile *Vibrio fischeri*. Katsetes kasutati kolme erineva hõbeda-kitosaani massisuhtega nanokomposiiti: 1:0,3 – nAgCS\_0,3, 1:1 – nAgCS\_1 ja 1:3 – nAgCS\_3. Lisaks hõbeda-kitosaani nanokomposiitidele uuriti tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakesi. Käesoleva töö peamised tulemused ja järeldused on järgmised:

- 1) hõbeda-kitosaani nanokomposiitide hüdrodünaamilised suurused deioniseeritud vees ja testsöötmes (2% NaCl) jäid nanoskaalasse ning olid vastavalt 79–102 nm ja 91–113 nm;
- 2) tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakeste hüdrodünaamiline suurus deioniseeritud vees oli nanoskaalas (36 nm), kuid testsöötmes (2% NaCl) ligi seitse korda suurem (248 nm), mis võib olla põhjustatud osakeste agregatsioonist;
- 3) hõbeda-kitosaani nanokomposiitide  $\zeta$ -potentsiaal oli positiivne (16–26 mV), mis on ilmselt tingitud kitosaani mõjust, sest ilma kitosaanita ning tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakesed olid negatiivselt laetud (–36 mV); mida rohkem kitosaani oli nanokomposiitides, seda positiivsem oli laeng; positiivse laenguga osakesed seostuvad paremini bakterite negatiivse pinnaga, seega võivad avaldada ka toksilisemat mõju;
- 4) testbakteri, *V. fischeri*, kineetilise bioluminestsentsi inhibitsiooni ja elulemuse testis osutasid kõige mürgisemaks uuritud nanomaterjalidest nAgCS\_3 (30-min  $EC_{50}$  = 4,9 mg Ag/l; 1-h MBC = 10 ja 24-h MBC = 5 mg Ag/l), mis moodustasid ühtlasi ka kõige stabiilsema suspensiooni; kõige vähem mürgisemaks osutasid teistest oluliselt ebastabiilseim suspensioon tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakestega (30-min  $EC_{50}$  > 75 mg Ag/l; 1-h MBC > 75 ja 24-h MBC = 75 mg Ag/l).

Edasisel uurimisel võiks hõbeda-kitosaani nanokomposiitide toksilisust uurida ka teistele organismidele. Sealt saab edasi arendada ja sünteesida nanokomposiite, mida oleks võimalik

tulevikus kasutada biomeditsiinis mikroobide kasvu pärssijana, kuid mis oleksid ka võimalikult keskkonnasäästlikud. Samuti saab uurida hõbeda-kitosaani nanokomposiitide erinevaid sünteesimisviise ning nende mõjusid nanokomposiitide omadustele. Lisaks hõbedaühenditele saab laiendada uurimisareaali teiste potentsiaalsete antimikroobsete ühendite ja nende mõjule (keskkonna)organismidele.

Uurimistöö käigus sai autor tutvuda lähemalt teadlase tööga. Sai tutvuda nii laboratoorse tööga kui ka erinevate teadusartiklite ja -tööde lugemise ja analüüsimisega. Töö käigus saadi juurde erinevaid oskusi, mis tulevad kasuks järgnevatel teadustöödel ja igapäevaelus. Kogu protsess oli aeganõudev ning kohati raske, kuid kindlasti väga kasulik.



## KASUTATUD MATERJALID

Ahmed, S., Ikram, S. 2016. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. Kättesaadav:

[https://www.researchgate.net/publication/303767031\\_Chitosan\\_Based\\_Scaffolds\\_and\\_Their\\_Applications\\_in\\_Wound\\_Healing](https://www.researchgate.net/publication/303767031_Chitosan_Based_Scaffolds_and_Their_Applications_in_Wound_Healing) (18.02.2023).

Albanese, A., Tang, P. A., Chan, W. C. W. 2012. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. Kättesaadav:

<https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124> (06.11.2022).

Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Sclifer, K. H. 1992. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Kättesaadav: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4757-2191-1?page=3#about-this-book> (19.02.2023).

Bondarenko, O. M., Heinlaan, M., Sihtmäe, M., Ivask, A., Kurvet, I., Joonas, E., Jemec, A., Mannerström, M., Heinonen, T., Rekulapelly, R., Singh, S., Zou, J., Pyykkö, I., Drobne, D., Kahru, A. 2016 Multilaboratory evaluation of 15 bioassays for (eco)toxicity screening and hazard ranking of engineered nanomaterials: FP7 project NANOVALID. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1196251> (18.02.2023).

Bosch, T. C. G. 2019. Squid genomes in a bacterial world. Kättesaadav: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1822166116> (23.10.2022).

Cele, T. 2020. *Preparation of Nanoparticles*. Kättesaadav: <https://www.intechopen.com/chapters/71103> (05.01.2023).

Christensen, D. G., Visick, K. L. 2020. *Vibrio fischeri*: Laboratory Cultivation, Storage, and Common Phenotypic Assays. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7337994/> (23.10.2022).

Costa, E. M., Silva, S., Machado, M., Sousa, S. C., Tavarina, F. K., Pintado, M. 2022. Chitosan Nanoparticles as Bioactive Vehicles for Textile Dyeing: A Proof of Concept. Kättesaadav: <https://www.mdpi.com/2073-4360/14/22/4821> (12.11.2022).

Dar, S. A., Galil, F. M. A. A. 2022. Biodegradation, Biosynthesis, Isolation, and Applications of Chitin and Chitosan. Kättesaadav: [https://www.researchgate.net/publication/364606714\\_Biodegradation\\_Biosynthesis\\_Isolation\\_and\\_Applications\\_of\\_Chitin\\_and\\_Chitosan](https://www.researchgate.net/publication/364606714_Biodegradation_Biosynthesis_Isolation_and_Applications_of_Chitin_and_Chitosan) (12.11.2022).

Dellwo, A. 2022. Health Benefits of NADH. Can the supplement treat chronic fatigue and Parkinson's? Kättesaadav: <https://www.verywellhealth.com/nadh-for-fibromyalgia-chronic-fatigue-syndrome-715795> (14.11.2022).

Euroopa Liidu Teataja 2011. Komisjoni soovitus, 18. oktoober 2011, nanomaterjali määratluse kohta EMPs kohaldatav tekst. Kättesaadav: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/?uri=CELEX%3A32011H0696&qid=1668880060099> (15.11.2022).

ISO 2010. ISO standard 21338:2010. Kättesaadav: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:21338:ed-1:v1:en> (18.02.2023).

ISO 2017. ISO/TR standard 18401:2017. Kättesaadav: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:tr:18401:ed-1:v1:en> (18.02.2023).

Ivask A., Kurvet, I., Kasemets, K., Blinova, I., Aruoja, V., Suppi, S., Vija, H., Käkinen, A., Titma, T., Heinlaan, M., Visnapuu, M., Koller, D., Kisand, V., Kahru, A. 2014. Size-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria, Yeast, Algae, Crustaceans and Mammalian Cells In Vitro. Kättesaadav: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0102108&type=printable> (18.02.2023).

Kasemets K., Käosaar S., Vija H., Fascio U., Mantecca P. 2019. Toxicity of differently sized and charged silver nanoparticles to yeast *Saccharomyces cerevisiae* BY4741: A nanobiointeraction perspective. Kättesaadav: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31107118/> (18.02.2023).

Kubo, A. 2019. Toxicological Profiling of Copper Oxide and Silver Nanoparticles and Polyoxometalate Ionic Liquids with Medically Relevant Bacteria and Mammalian Cells in vitro [doktoritöö]. Kättesaadav: <https://digikogu.taltech.ee/et/item/09b9de24-2a9e-4c0b-9472-9980a3ee8d92> (12.11.2022).

Kubo, A. L., Capjak, I., Vrček, I. V., Bondarenko, O. M., Kurvet, I., Vija, H., Ivask, A., Kasemets, K., & Kahru, A. 2018. Antimicrobial potency of differently coated 10 and 50 nm silver nanoparticles against clinically relevant bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2018.06.027> (18.02.2023).

Käkinen, A. 2014. The Role of Physico-chemical Properties and Test Environment on Biological Effects of Copper and Silver Nanoparticles [doktoritöö]. Kättesaadav: <https://digikogu.taltech.ee/et/item/c00b9984-1141-49c6-9d70-7e9ae5d51af4> (12.11.2022).

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). Family *Vibrionaceae*. Kättesaadav: <https://lpsn.dsmz.de/family/vibrionaceae> (23.07.2023).

Malvern Panalytical 2018. Zetasizer range. Kättesaadav: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range> (27.02.2023).

Mirda, E., Idroes, R., Khairan, K., Tallei, T. E., Ramli, M., Earlia, N., Maulana, A., Idroes, G. M., Muslem, M., Jalil, Z. 2021. Synthesis of Chitosan-Silver Nanoparticle Composite Spheres and Their Antimicrobial Activities. Kättesaadav: <https://www.mdpi.com/2073-4360/13/22/3990>, (18.02.2023).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5892, Nadide. Kättesaadav: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/NAD%2B> (14.11.2022).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 643976, Flavin mononucleotide. Kättesaadav: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/643976> (14.11.2022).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 445395, 1-Deoxy-1-(7,8-dimethyl-2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-benzo[G]pteridin-1-ID-10(5H)-YL)-5-O-phosphonato-D-riitol. Kättesaadav: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445395>, (14.11.2022).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 439153, 1,4-Dihydronicotinamide adenine dinucleotide. Kättesaadav: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1\\_4-Dihydronicotinamide-adenine-dinucleotide](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_4-Dihydronicotinamide-adenine-dinucleotide) (14.11.2022).

National Library of Medicine (NLM). FMN reductase. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=%22FMN+Reductase%22> (15.11.2022).

Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. Kättesaadav: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16456071/> (18.02.2023).

NOAA Ocean Exploration. National Oceanic and Atmospheric Administration, U.S. Department of Commerce. What is bioluminescence? Kättesaadav: <https://oceanexplorer.noaa.gov/facts/bioluminescence.html> (13.11.2022).

Norsworthy, A. N., Visick, K. L. 2013. Gimme shelter: How *Vibrio fischeri* successfully navigates an animals multiple environments. Kättesaadav: [https://www.researchgate.net/publication/259354518\\_Gimme\\_shelter\\_How\\_Vibrio\\_fischeri\\_s\\_uccessfully\\_navigates\\_an\\_animals\\_multiple\\_environments](https://www.researchgate.net/publication/259354518_Gimme_shelter_How_Vibrio_fischeri_s_uccessfully_navigates_an_animals_multiple_environments) (13.11.2022).

Nowack, B., Krug, H. F., Height, M. 2011. 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. Kättesaadav: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es103316q> (18.02.2023).

Ovtšinnikova, J. 2022. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide toksilisus pärmseentele *Candida albicans* ja *Candida glabrata* [magistritöö]. Kättesaadav: <https://digikogu.taltech.ee/en/item/5fd391db-3589-44e6-b57b-0243a2bd53da> (10.01.2023).

Puusta, I. 2022. Synthesis of silver-chitosan nanocomposites and their antibacterial activity [magistritöö]. Tallinn: Tallinna Ülikool.

- Rahimi, H. R., Doostmohammadi, M. 2019. Nanoparticle Synthesis, Applications, and Toxicity. Kättesaadav: <https://www.intechopen.com/chapters/69099> (05.01.2023).
- Raval, N., Maheshwari, R., Kalyane, D., Youngren-Ortiz, S. R., Chougule, M., Tekade, R. 2019. Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. Kättesaadav: [https://www.researchgate.net/publication/330338751\\_Importance\\_of\\_Physicochemical\\_Characterization\\_of\\_Nanoparticles\\_in\\_Pharmaceutical\\_Product\\_Development](https://www.researchgate.net/publication/330338751_Importance_of_Physicochemical_Characterization_of_Nanoparticles_in_Pharmaceutical_Product_Development) (27.02.2023).
- Ruby, E. G., Urbanowski, M., Campbell, J., Dunn, A., Faini, M., Gunsalus, R., Lostroh, P., Lupp, C., McCann, J., Millikan, D., Schaefer, A., Stabb, E., Stevens, A., Visick, K., Whistler, C., Greenberg, E. P. 2005. Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: A symbiotic bacterium with pathogenic congeners. Kättesaadav: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0409900102> (23.10.2022).
- Shimomura, O. 2012. Bioluminescence. Chemical Principles and Methods. Singapur: World Scientific Publishing, lk 31–33.
- Vindimian, E. 2023. Macro REGTOX documentation. Kättesaadav: [http://www.normalesup.org/~vindimian/DOC\\_en\\_web/doc\\_en\\_2.html](http://www.normalesup.org/~vindimian/DOC_en_web/doc_en_2.html) (18.02.2023)
- Yerragopu, P. S., Hiregoudar, S., Nidoni, U., Ramappa, K. T., Sreenivas, A. G., Doddagoudar, S. R. 2020. Chemical Synthesis of Silver Nanoparticles Using Tri-sodium Citrate, Stability Study and Their Characterization. Kättesaadav: <https://journalirjpac.com/index.php/IRJPAC/article/view/416> (11.01.2023).
- Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., Chu, C. H. 2020. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. Kättesaadav: <https://www.dovepress.com/the-antibacterial-mechanism-of-silver-nanoparticles-and-its-applicatio-peer-reviewed-fulltext-article-IJN> (18.02.2023).

## RESÜMEE

### Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide mõju looduslikult luminesceeruvatele bakteritele *Vibrio fischeri*

Maailma Terviseorganisatsiooni andmetel on antimikroobne resistentsus üks kümnest suurimast inimkonda ähvardavast ülemaailmsest rahvatervise ohust. Nanotehnoloogia on üks valdkondi, millel on suur potentsiaal luua uusi tõhusaid antimikroobseid ühendeid biomeditsiinilisteks rakendusteks. Nii hõbedal (Ag) kui ka polüsahhariidil kitosaanil (CS) on antimikroobsed omadused, mis koostoimes võivad veelgi võimendada ning osutada biomeditsiinis perspektiivseks kombinatsiooniks.

Käesolevas uurimistöös käsitleti nelja nanomaterjali füüsikalisi-keemilisi omadusi ning toksilisust looduslikult luminesceeruvale bakterile *Vibrio fischeri*. Uuriti kolme erineva Ag-CS massisuhtega nanokomposiiti: 1 : 0,3 (nAgCS\_0,3), 1 : 1 (nAgCS\_1) ja 1 : 3 (nAgCS\_3). Lisaks Ag-CS nanokomposiitidele uuriti ka tsitraadiga kaetud Ag nanoosakesi (Cit-Ag NO). Uuritavate nanomaterjalide füüsikalisi-keemilisi omadusi iseloomustati alglahuses (deioniseeritud vesi) ja testsöötmes (2% NaCl) ning määrati nende hüdrodünaamiline suurus, pinnalaeng ning suspensioonide stabiilsus kasutades dünaamilise ja elektroforeetilise valgushajuvuse meetodit. Toksilisuse testimine teostati bakteriga *V. fischeri* kasutades modifitseeritud kineetilise bioluminestsentsi inhibitsiooni ja elulemuse testi. Käesoleva töö peamised tulemused ja järeldused: 1) Ag-CS nanokomposiitide hüdrodünaamilised suurused deioniseeritud vees ja testsöötmes jäid ülemisse nanokaalasse ning olid vastavalt 79–102 nm ja 91–113 nm; 2) Cit-Ag NO hüdrodünaamiline suurus deioniseeritud vees oli nanoskaalas (36 nm), kuid testsöötmes ca seitse korda suurem (248 nm), mis võib olla põhjustatud agregatsioonist; 3) Ag-CS nanokomposiitide  $\zeta$ -potentsiaal (pinnalaeng) oli positiivne (+16–26 mV), mis on ilmselt tingitud kitosaani mõjust, sest ilma kitosaanita ja tsitraadiga kaetud hõbedanaanoosakesed olid negatiivselt laetud (–36 mV); 4) hõbedal ja kitosaanil on sünergiline toime, kineetilise bioluminestsentsi inhibitsiooni ja elulemuse testis bakteriga *V. fischeri* osutus kõige mürgisemaks nAgCS\_3 (30-min  $EC_{50}$  = 4,9 mg Ag/l; 1-h MBC = 10; 24-h MBC = 5 mg Ag/l), mis oli ühtlasi ka kõige stabiilsem suspensioon ja kõige vähem mürgisemaks teistest ebastabiilsem suspensioon tsitraadiga kaetud hõbedanaanoosakestega (30-min  $EC_{50}$  > 75 mg Ag/l; 1-h MBC > 75; 24-h MBC = 75 mg Ag/l).

## ABSTRACT

### Effects of silver-chitosan nanocomposites on the bioluminescent bacteria *Vibrio fischeri*

According to the World Health Organisation, antimicrobial resistance is one of the top ten global public health threats facing humanity. Nanotechnology is one of the fields with great potential to create new effective and safe antimicrobials for biomedical applications enabling to reduce infections and the development of antibiotic-resistant. Silver (Ag) and chitosan (CS) have antimicrobial properties, which could be a promising combination in biomedicine or material technology.

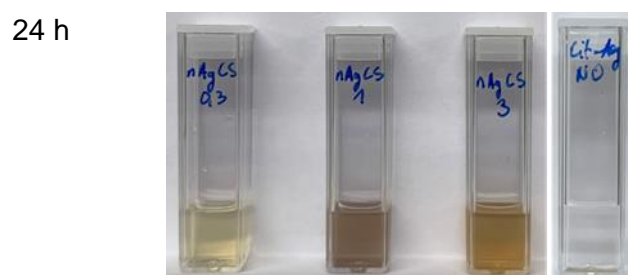
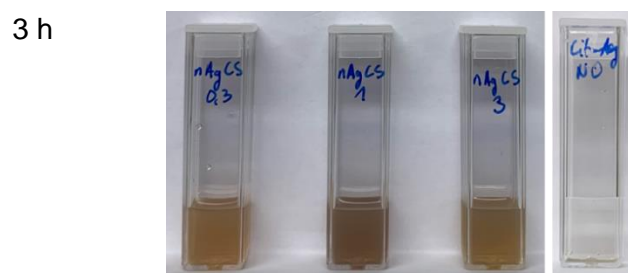
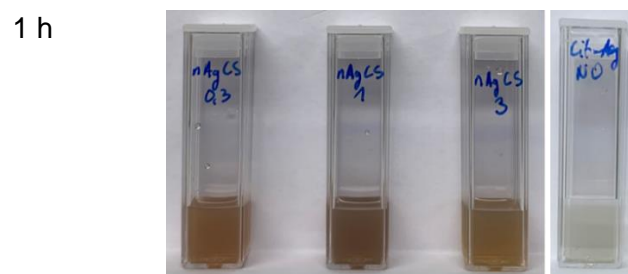
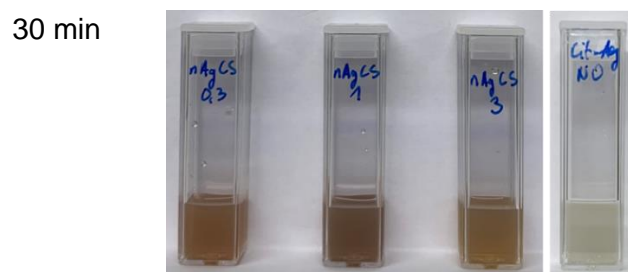
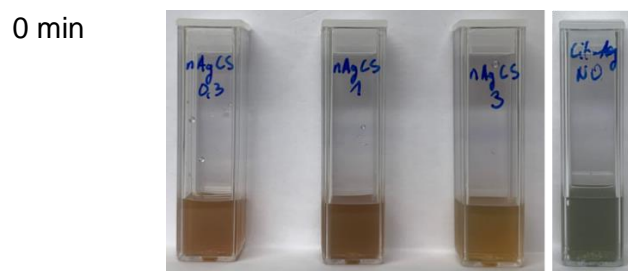
The aim of this research was to investigate three types of Ag-CS nanocomposites with the weight ratio of Ag-CS: 1 : 0.3 (nAgCS-0,3), 1 : 1 (nAgCS-1) and 1 : 3 (nAgCS-3). In addition, citrate-coated Ag nanoparticles were studied. In this research, the physicochemical properties and toxicity to the naturally luminescent bacterium *Vibrio fischeri* of these four nanomaterials were analysed. The main methods used in the experiments were dynamic and electrophoretic light scattering method, bacterial kinetic bioluminescence inhibition and viability test. The main results and conclusions of this study are as follows: 1) the hydrodynamic sizes of Ag-CS nanocomposites in deionized water and test medium (2%NaCl) remained in the upper nanoscale and were 79–102 and 91–113 nm, respectively; 2) the hydrodynamic size of citrate-coated Ag nanoparticles in deionized water was in the nanoscale (36 nm), but in the test medium about seven times larger (248 nm), which may be caused by aggregation; 3) the  $\zeta$ -potential (surface charge) of Ag-CS nanocomposites was positive (+16–26 mV), which is probably due to the effect of chitosan, because Ag nanoparticles without chitosan and coated with citrate were negatively charged (–36 mV); 4) in the kinetic bioluminescence inhibition and viability test with the bacteria *V. fischeri*, the most stable suspension nAgCS\_3 proved to be the most toxic (30-min  $EC_{50}$  = 4,9 mg Ag/l; 1-h MBC = 10; 24-h MBC = 5 mg Ag/l) and the least toxic was the most unstable suspension with the citrate-coated Ag nanoparticles (30-min  $EC_{50}$  > 75 mg Ag/l; 1-h MBC > 75; 24-h MBC = 75 mg Ag/l).

Acknowledgements: this research has been supported by the Estonian Research Council Grant PRG749.

## Lisa 1. Suspensioonide stabiilsuse kvalitatiivne hindamine settimiskatsega

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAgCS\_0,3, nAgCS\_1, nAgCS\_3) ja tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakeste (Cit-Ag NO) suspensioonide stabiilsuse kvalitatiivne hindamine settimiskatsega 2 % NaCl lahuses kontsentratsioonil 50 mg Ag/l.

Ajapunkt	Uuritavad nanokomposiidid
----------	---------------------------



## Lisa 2. Suspensioonide stabiilsuse kvantitatiivne määramine

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (nAgCS\_0,3, nAgCS\_1, nAgCS\_3) ja tsitraadiga kaetud hõbeda nanoosakeste (Cit-Ag NO) stabiilsuse kvantitatiivne määramine 24 h jooksul deioniseeritud vees ning 2 % NaCl lahuses kontsentratsioonil 10 mg Ag/l.

