



Статья

Биогенные наночастицы серебра, дважды обработанные 8М мочевиной Проявлять превосходную антибактериальную и противогрибковую активность, Коммерческие химически синтезированные аналоги

Терренс Рэвин 1,* , Цюньин Юань 2 1 и Макенна Хауэлл

¹ Факультет биомедицинских наук, Университет Южной Алабамы, Мобил, AL 36688, США

² Биологические науки и науки об окружающей среде, Alabama A&M University, Normal, AL 35762, США * Адрес для переписки: travine@southalabama.edu

Аннотация: Биогенные наночастицы серебра (b-AgNP) были получены внеклеточно с использованием клеточного лизата генетически модифицированной *Escherichia coli* и разделены на три группы. Каждая группа получала различную обработку, чтобы определить, какая из них лучше всего удаляет остаточный материал клеточного лизата. Первую группу обрабатывали дважды, используя только воду (вода ×2), вторую — 8М мочевиной один раз (8М мочевина ×1), а третью — дважды (8М мочевиной ×2). Впоследствии каждую группу оценивали на предмет ее способности ингибировать рост шести бактериальных и двух грибковых патогенов. Тестирование проводилось с использованием метода минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Для сравнения были включены коммерчески производимые c-AgNP. Во всех случаях наибольшее ингибирование роста микробов продемонстрировали b-AgNP (8М мочевина ×2). И наоборот, коммерческие AgNP не продемонстрировали какого-либо ингибирования роста при самой высокой протестированной концентрации 10 мкг/мл. Считается, что более высокая антибактериальная активность b-AgNP (8М мочевина ×2) по сравнению с b-AgNP (8М мочевина ×1) и b-AgNP (вода ×2) обусловлена большей степенью биофункционализации (покрытия), происходящей во время двух последовательных обработок.



Цитирование: Рэвин, Т.; Юань, К.;

Хауэлл, М. Биогенные наночастицы

серебра, дважды обработанные с использованием 8М

мочевины, демонстрируют

превосходную антибактериальную и противогрибковую

активность по сравнению с

коммерческими химически синтезированными аналогами. **Прим.** Введение

Нано 2022, 3, 187–201. <https://doi.org/10.3390/applnano3040014>

10.3390/applnano3040014 _

Академический редактор: Рамарадж Бупатия

Поступила: 27 сентября 2022 г.

Принято: 28 октября 2022 г.

Опубликовано: 31 октября 2022 г.

Примечание издателя: MDPI сохраняет нейтралитет

в отношении заявлений о юрисдикции в

опубликованных картах и институциональной принадлежности.



Копирайт: © 2022 авторов.

Лицензиат MDPI, Базель, Швейцария.

Эта статья находится в открытом доступе.

распространяется на условиях и

условия Creative Commons

Лицензия с указанием авторства (CC BY)

(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Ключевые слова: биогенный; наночастицы серебра; 8М мочевина; противомикробная активность; минимальная ингибирующая концентрация; функционализированный

Антимикробные металлические наночастицы (НЧ) обычно включают в различные материалы, чтобы предотвратить их разрушение микробами, такими как бактерии и грибы. Например, добавление биоцидных НЧ в текстильные изделия может остановить/замедлить разрушение материала, тем самым расширяя возможности его использования. Наночастицы серебра (AgNP) очень эффективны либо для уменьшения количества загрязняющих микробов, либо для их полной ликвидации. Следовательно, это помогает ограничить их распространение. Биоцидные AgNP были интегрированы в повязки на раны и медицинские устройства, такие как зубные имплантаты, сердечно-сосудистые имплантаты и датчики визуализации. Дополнительные медицинские применения включают использование AgNP в качестве антибиопленочных агентов, противоопухолевых агентов и стимуляторов заживления костей. Более того, AgNP наносятся на оптоэлектронные устройства, используемые в электронной промышленности для контроля роста микробов [1,2].

Полезность AgNP привела к взрывному росту индустрии нанобиотехнологий. Это вызвало соответствующее увеличение производства AgNP. По оценкам, в 2011 году для коммерческого или промышленного использования было произведено около 280 тонн AgNP [3]. В 2021 году это число увеличится примерно до 500 тонн годового мирового производства. В эту цифру также входят AgNP, произведенные для использования в электронной промышленности. В 2020 году рынок наночастиц серебра оценивался в 1,5 миллиарда долларов США, и ожидается, что к 2030 году он достигнет 6,6 миллиарда долларов США [5].

Химический синтез представляет собой основной метод быстрого производства большого количества AgNP. Этот процесс включает использование сильного восстановителя для преобразования химического соединения, такого как нитрат серебра (AgNO₃), в металлические частицы размером в нанометровом диапазоне. Использование наноматериалов на основе серебра изначально было затруднено из-за их нестабильности.

от окисления. Чтобы решить эту проблему, добавляют стабилизатор, предотвращающий быстрое окисление AgNP [2]. Хотя химический синтез очень эффективен, он также производит большое количество агрессивных химических отходов, которые в конечном итоге попадают в окружающую среду. Соответственно, альтернативные методы зеленого синтеза используются, чтобы помочь сократить постоянно растущий объем химических отходов, связанных с производством наноматериалов серебра.

Синтез зеленого может происходить либо химическим путем, либо биогенезом. Оба процесса производят AgNP, которые оказывают меньшее воздействие на окружающую среду [6]. Химический зеленый синтез предполагает использование природных веществ, таких как растительные экстракты, для производства химически синтезированных AgNP (с-AgNP), но с меньшим количеством связанных с ними токсичных отходов. Как следует из названия, биогенные AgNP (b-AgNP) получают либо путем введения серебряного субстрата в живые микробоподобные бактерии, либо с использованием супернатантов микробных культур, либо с использованием лизатов цельных клеток микробов [7]. b-AgNP, полученные этим методом, по-видимому, перспективны в борьбе с инфекциями, связанными с биопленками, поскольку биопленки, как правило, содержат патогены, устойчивые к антибиотикам.

AgNP эффективно контролируют рост широкого спектра микробов, включая устойчивые к антибиотикам бактерии, вызывающие инфекции. Тем не менее, их использованию препятствует присущий им уровень токсичности для человека и связанная с этим опасность для окружающей среды [9]. Хотя спрос на AgNP продолжает расти, соответствующих усилий по снижению их воздействия на окружающую среду не предпринималось, независимо от метода их синтеза. Аналогичным образом, в качестве потенциальной замены ищутся другие металлические наночастицы с эквивалентной или большей антимикробной активностью по сравнению с AgNP, но с пониженной токсичностью. Однако продемонстрированная противомикробная эффективность AgNP делает его главным претендентом на дальнейшее использование до тех пор, пока не будет найдена подходящая замена. Следовательно, весьма желательно получение долговечных b-AgNP, проявляющих антимикробное действие широкого спектра при более низкой рабочей концентрации.

Новизна этого исследования заключается в двух отдельных выводах. Во-первых, различия в антимикробной эффективности, наблюдаемые между протестированными b-AgNP и с-AgNP, демонстрируют, что b-AgNP превосходят с-AgNP в контроле роста микробов. Во-вторых, различия, наблюдаемые в антимикробной эффективности каждого типа b-AgNP, по-видимому, являются результатом различий в их постпроизводственной обработке. Теперь мы сообщаем о том, что b-AgNP проявляют превосходную антимикробную активность при значительно более низких концентрациях, чем коммерческие с-AgNP.

2. Материалы и методы

2.1. Подготовка наночастиц

Клеточные лизаты ранее охарактеризованных рекомбинантных клеток *Escherichia coli* DH5 α использовали для получения b-AgNP [10,11]. При этом аликвоту 15% глицеринового исходного раствора клеток *Escherichia coli* DH5 α объемом 10 мкл переносили в 10 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл карбенициллина, и выращивали в течение ночи при 37 °C на шейкере-инкубаторе при 250 об/мин. Затем ночную культуру клеток центрифугировали, клетки ресуспендировали в 100 мл LB в присутствии карбенициллина и повторно инкубировали при 37 °C, периодически контролируя оптическую плотность (ОП).

Когда OD₆₀₀ достигала 0,9, клетки центрифугировали при 4500 G в течение 15 мин. Полученный осадок клеток промывали 25 мл 50 mM натрий-фосфатного буфера (pH 9) и ресуспендировали в 2 мл 50 mM натрий-фосфатного буфера (pH 9). Затем клетки обрабатывали ультразвуком на льду в течение трех циклов по 60 импульсов с выходной мощностью 20% с интервалом в 1 минуту между каждым циклом. Лизат центрифугировали для удаления клеточного дебриса. Растворимый внутриклеточный экстракт добавляли к 100 мл 50 mM натрий-фосфатного буфера (pH 9), содержащего 1 mM AgNO₃. Эту бесклеточную реакционную смесь инкубировали при 37 °C при непрерывном встряхивании со скоростью 250 об/мин в течение 4 дней. Затем b-AgNP собирали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин. Осадки обрабатывали ультразвуком в 50 mM натрий-фосфатном буфере (pH 9) в течение 1 минуты на льду и центрифугировали при 3000 G в течение 4 минут.

Восстановленные b-AgNP были разделены на 3 группы, каждая из которых обрабатывалась по-своему. Первую группу гранулированных b-AgNP ресуспендировали в чистой H₂O путем обработки ультразвуком на льду в течение 1 мин. b-AgNP собирали центрифугированием при 17 000 об/мин в течение 15 мин при 4 °C. Этот этап промывки повторяли один раз, а затем b-AgNP ресуспендировали в чистой H₂O. Этот набор был обозначен как b-AgNP (вода ×2).

вторую группу b-AgNP обрабатывали ультразвуком в 8М мочеvine на льду в течение 1 минуты и помещали на орбитальную шейкер при 360 об/мин в течение 30 минут при 37 °C, а затем осаждают центрифугированием при 17 000× g. за 20 мин. Осадок дважды промывали чистой водой и ресуспендировали ультразвуком. в чистой H2O. Этот набор был обозначен как b-AgNP (8М мочеvина ×1). Третья группа была обрабатывали аналогично b-AgNP (8М мочеvина ×1), но включали вторую обработку ультразвуком в 8М мочеvину надосадочной жидкости, выделенную после первой 8М промывки мочеvиной. b-AgNP отмывали дважды чистой H2O и ресуспендировали в чистой H2O. Этот набор был обозначен как b-AgNP. (8М мочеvина ×2).

Коммерческие c-AgNP были получены как от Alfa Aesar (№ по каталогу J67099), так и от Alfa Aesar (№ по каталогу J67099). Fisher Scientific (Уолтем, Массачусетс, США) и SkySpring Nanomaterial s (кат. № 0115CY); (Хьюстон , Техас, США). Alfa Aesar c-AgNP имели размер 100 нм и доводились до 0,02 мг/мл. в 2 мМ цитрате натрия. Наноматериалы SkySpring также имели размер 100 нм, но были получен в порошкообразном виде. b-AgNP (вода ×2), b-AgNP (8М мочеvина ×1) и Все образцы b-AgNP (8М мочеvины ×2) получали суспендированы в чистой воде. Они были затем лиофилизировали с использованием установки для лиофилизации Labconco (Канза-Сити, Миссури, США). Затем порошок c-AgNP SkySpring и лиофилизированные b-AgNP были адаптированы к Концентрация 0,02 мг/мл в 2 мМ цитрате натрия соответствует концентрации c-AgNP Alfa Aesar. Двукратные серийные разведения каждого типа AgNP готовили в янтарной емкости с коническим дном емкостью 1,5 мл. микроцентрифужных пробирках (VWR, Атланта, Джорджия, США) с использованием стерильной деионизированной воды. Все разведения до проведения испытаний хранились при температуре 4 °C.

2.2. Проверенные микробы

Изученные бактерии включали Escherichia coli (ATCC 25922), Staphylococcus aureus. (ATCC 29213) и Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853). Штаммы, устойчивые к антибиотикам (ОЛБ) включали метициллин-резистентный Staphylococcus aureus или MRSA (ATCC 45300), ванкомицин-резистентный Enterococcus faecalis или VRE (ATCC 51299) и бета-лактамазы расширенного спектра действия. Escherichia coli или ESBL (изолят пациента). Тестируемые грибы включали Candida albicans (ATCC 60193) и Aspergillus fumigatus (KM 8001); (Таблица 1). Исходные культуры поддерживались периодическое пассирование на питательном агаре, поддерживающем рост, и инкубирование при температуре 37 °C в условиях комнатной температуры. условиях (без CO2). Одну хорошо изолированную колонию тест-бактерии перенесли в чашку со свежим агаром и инкубировали в течение 24 часов перед каждым анализом. Грибы инкубировали в течение 48 часов перед антимикробное тестирование.

Таблица 1. Характеристики тестируемых бактерий и грибов (n = 8).

Функции	Микробы					
	Энтерококк фекальный ¹	Эшерихия палочка ²	Псевдомонада синегнойная палочка	стафилококк aureus ³	Кандида альбиканцы	Аспергилл фумигатус
Микроб тип	Бактерия	Бактерия	Бактерия	Бактерия	Грибок	Грибок
Окраска по Граму реакция	Позитивный	Отрицательный	Отрицательный	Позитивный	Н/Д	Н/Д
Морфология	сферический (кокк)	стержнообразный (бацилла)	стержнообразный (бацилла)	сферический (кокк)	Дрожжи (овал)	Форма (нитевидный)
Метаболизм	Факультативный анаэробный	Факультативный анаэробный	Обязать аэробный	Факультативный анаэробный	Ферментация	^{Питательное вещество} ассимиляция

¹ Enterococcus faecalis представлял собой штамм энтерококка, устойчивый к ванкомицину (VRE). ² Включены как расширенный спектр бета-лактамазы (ESBL) Escherichia coli и штаммы Escherichia coli, не относящиеся к ESBL. ³ Включены как метициллин-чувствительные (MSSA) и метициллин-резистентный (MRSA) золотистый стафилококк.

Для всех тестируемых бактерий 2–3 хорошо изолированные колонии переносили в 3 мл катионно-скорректированного бульона Мюллера-Хинтона (MH) (Remel, Lenexa, KS, США) в стерильной пробирке со стеклянной крышкой. винтовая верхняя часть. Суспензию отрегулировали так, чтобы она соответствовала стандарту мутности МакФарланда 0,5%. с использованием денситометра DEN-1 McFarland (Grant-Bio, Бивер-Фолс, Пенсильвания, США), в результате чего

в $\sim 1,0 \times 10^8$ колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл-1. Дополнительное разведение 0,5% 1:100. скорректированный образец готовили в бульоне МН с выходом приблизительно $1,0 \times 10^6$ колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл-1.

Для дрожжей *Candida albicans* 4–6 хорошо изолированных колоний удаляли из 48-часовой чашки с питательным агаром и помещали в стерильную стеклянную пробирку с завинчивающейся крышкой, содержащую 3 мл бульона Мюллера-Хинтона (МН) (Remel, Lenexa, KS, США). Суспензию доводили до соответствия стандарту мутности МакФарланда 0,5%, как было описано ранее для бактерий. Дополнительное разведение 1:100 не проводилось.

Для борьбы с плесенью *Aspergillus fumigatus* пять 48-часовых чашек с питательным агаром, содержащими активно растущие колонии плесени, заливали 5 мл 0,9% стерильного физиологического раствора. Интактные грибковые колонии разрушали с помощью стерильного распределителя клеток (Fisher Scientific 14-665-231, Питтсбург, Пенсильвания, США) путем энергичного перемещения распределителя вперед и назад по всей поверхности планшета, создавая суспензию. Эту суспензию переносили в коническую центрифужную пробирку емкостью 50 мл (Fisher Scientific 12-565-271, Питтсбург, Пенсильвания, США) и энергично перемешивали на вортексе в течение 30 с при максимальной настройке миксера. Полученный раствор доводили до стандарта мутности МакФарланда 0,5%.

Количество бактерий или грибов в исходном инокуляте МИС определяли следующим образом. Готовили десятикратные серийные разведения инокулята с откорректированной мутностью в 0,9% стерильном физиологическом растворе. Аликвоту каждого разведения объемом 100 мкл (0,1 мл) переносили в отдельную чашку с питательным агаром и распределяли по ее поверхности с помощью стерильного распределителя клеток. Чашки инкубировали в течение 24 или 48 часов, проверяли рост и подсчитывали колонии. Колониеобразующие единицы (КОЕ)/мл-1 определяли путем подсчета количества колоний бактерий или грибов, присутствующих на чашке для разбавления, демонстрируя от 10 до 100 колоний. Это число умножалось на величину, обратную серийному разведению, а затем умножалось на десять, чтобы учесть объем образца 100 мкл (0,1 мл), распределенный по каждому счетному планшету.

2.3. Тестирование минимальной ингибирующей концентрации

(МИК). Образец каждого разведения тестируемых наночастиц объемом 100 мкл распределяли по отдельным лункам 96-луночного микротитровального планшета (рис. 1). В каждую лунку, содержащую разведение наночастиц, вводили аликвоту тестируемого микробного инокулята объемом 100 мкл. Это привело к разведению каждой концентрации наночастиц в тестовых лунках в соотношении 1:2 в диапазоне от 10 мкг/мл до 0,04 мкг/мл. Отрицательный контроль роста, состоящий из 200 мкл бульона МН без микробов, был включен для обнаружения потенциального экзогенного загрязнения бульона. Отдельный положительный контроль роста, состоящий из 100 мкл только 2 мМ цитрата натрия (без наночастиц) плюс 100 мкл аликвоты микробного инокулята, использовали, чтобы проверить, способствует ли один лишь 2 мМ цитрат натрия ингибированию роста. Инокулированный микротитровальный планшет закрывали плотно прилегающей крышкой, а бока обертывали Parafilm® для предотвращения высыхания образца во время инкубации. Планшет помещали в инкубатор MaxQ 4450 (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) и выдерживали в течение 24 часов (бактерии) или 48 часов (грибы) при температуре 37 °C в условиях окружающей среды.

с постоянным вращением со скоростью 100 об/мин.

Среду PMI 1640 с добавлением 2% глюкозы обычно используют для тестирования МИК грибов в клинических лабораторных условиях [12,13]. Вместо этого в текущем исследовании для проведения тестирования МПК на грибы использовался бульон МН. Это позволило провести более прямое сравнение с результатами бактериальной МИК. Бульон МН поддерживает рост грибов и использовался для тестирования пробирок с зародышами *Candida albicans* вместо сыворотки [14]. Кроме того, контрольная лунка, содержащая тестовый инокулят *Candida albicans* или *Aspergillus fumigatus* без наночастиц, демонстрировала заметный рост при каждой достигнутой МПК.

В дополнение к первоначальному тестированию МИК все 3 b-AgNP и c-AgNP Alfa Aesar были повторно протестированы год спустя с использованием того же метициллин-чувствительного бактериального штамма *Staphylococcus aureus* (MSSA). Это было сделано для определения количества остаточной антимикробной активности, если таковая имеется, которая присутствовала после длительного хранения при 4 °C. c-AgNP SkySpring, которые не были получены до первоначального тестирования МИК, также были включены в анализ стабильности.

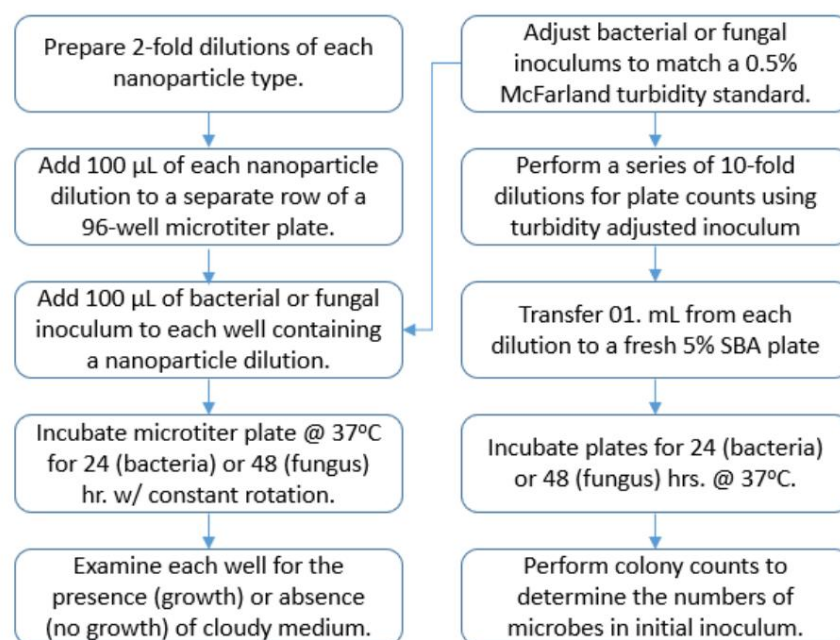


Рисунок 1. Схема тестирования. Упрощенная диаграмма, показывающая общие шаги, выполняемые в ходе процесс тестирования.

2.4. Спектроскопия

Среду PMI 1640 с добавкой 2% глюкозы обычно используют для определения МИК грибов. Был проведен прямой отбор проб каждого 0,02 мг/мл в 2 мМ растворе AgNP цитрата натрия. В настоящее исследование использовался буферный раствор для проведения как видимой (vis-) так и инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FT-IR). Виз-спектроскопия осуществлялась с использованием Thermo Scientific Evolution 350 UV-VIS. Результаты Виз-спектроскопии поддерживают рост грибов и использовался для проведения спектрометрии *Candida albicans*, а программное обеспечение Thermo Scientific «Insight 2» использовалось для отображения полученных результатов. Тестирование через зародышевую пробирку вместо сыворотки [14]. Кроме того, контрольная лунка, содержащая *Can-data* (Уолтем, Массачусетс, США). ИК-Фурье было выполнено с использованием Thermo Scientific Nicolet Dida *albicans* или *Aspergillus fumigatus* тестовый инокулят без наночастиц продемонстрировал i550 FTIR со встроенным аксессуаром ATR (Уолтем, Массачусетс, США). AgNPs для рентгеновской энергии - заметный рост в каждом MIC достигнут.

Анализ дисперсионной спектроскопии (EDS) ресуспендировали в чистой воде путем обработки ультразвуком. В дополнение к первоначальному тестированию МИК все 3 b-AgNP и c-AgNP Alfa Aesar были повторно проверены перед анализом. Сканирующий трансмиссионный электрон Hitachi HD2700 с коррекцией aberrations протестировано год спустя с использованием того же бэкамикроскопа, чувствительного к метициллину *Staphylococcus aureus* (MSSA) (Hitachi, Токио, Япония), который использовался для получения спектра EDS. териальный штамм. Это было сделано для определения количества остаточной противомикробной активности, если таковая имеется, которая присутствовала после длительного хранения при 4 °C. c-AgNP SkySpring, у которых не были получены до первоначального тестирования МИК, также были включены в анализ стабильности.

Образцы AgNP с концентрацией 0,02 мг/мл в 2 мМ цитрате натрия готовили для просвечивающей

электронной микроскопии (ПЭМ) следующим образом. Примерно 5,0 мл каждого образца

2.4. Спектроскопия

центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5810R (Энфилд, Коннектикут, США) при 3000× g. 5 минут, а большие осадки отбрасывали. Образцы были обработаны ультразвуком при заданном импульсе.

Выполняется как для видимой (vis-) так и для инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FT-IR). 5-кратный цикл с использованием ультразвукового аппарата Fisher Scientific FB120, оснащенного Qsonica модель CL-18. Виз-спектроскопия осуществлялась с использованием зонда UV-VIS Thermo Scientific Evolution 350 (Ньютаун, Коннектикут, США). Затем аликвоту супернатанта объемом 2 мл перенесли в

Для отображения результата используют спектрометр и программное обеспечение Thermo Scientific «Insight 2» — микроцентрифужную пробирку 2.0 и центрифугируют с использованием Hettich Labnet 2323 K (Gosheim, данные (Уолтем, Массачусетс, США). ИК-Фурье осуществляли с использованием прибора Thermo Scientific Nicolet i550 FTIR со встроенным аксессуаром ATR (Уолтем, Массачусетс, США). AgNP для рентгеновской энергии - отброшены. Оставшиеся 0,5 мл энергично встряхивали и пипетировали вверх и вниз.

Анализ дисперсионной спектроскопии (EDS) нескольких раз ресуспендировали в чистой воде путем обработки ультразвуком. Для анализа сканирующий трансмиссионный электрон Hitachi HD2700 с коррекцией aberrations протестировано год спустя с использованием того же бэкамикроскопа, чувствительного к метициллину *Staphylococcus aureus* (MSSA) (Hitachi, Токио, Япония), который использовался для получения спектра EDS. Длительность спектра EDS составляла 100 мксек (Hitachi, Токио, Япония).

Перед проверкой им дали полностью высохнуть на воздухе. Последующее ТЕМ-обследование было выполнено с использованием JEOL JEM 1400, работающего на 80 кВ.

Для транс-2.6 были приготовлены образцы AgNP с концентрацией 0,02 мг/мл в 2 мМ цитрате натрия.

Размер частиц. Для анализа дисперсионной спектроскопии (ПЭМ) следующим образом. Примерно 5,0 мл каждого образца было центрифугировано на центрифуге Eppendorf 5810R (Энфилд, Коннектикут, США) при 3000× g. 5 минут, а большие осадки отбрасывали. Образцы были обработаны ультразвуком при заданном импульсе.

Выполняется как для видимой (vis-) так и для инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FT-IR). 5-кратный цикл с использованием ультразвукового аппарата Fisher Scientific FB120, оснащенного Qsonica модель CL-18. Виз-спектроскопия осуществлялась с использованием зонда UV-VIS Thermo Scientific Evolution 350 (Ньютаун, Коннектикут, США). Затем аликвоту супернатанта объемом 2 мл перенесли в

Уолтем, Массачусетс, США). Продолжительность счета составляла 70–290 с. Среднее значение пик №1, представляющий максимальную интенсивность, использовался для определения диаметра частиц (нм). и ширина (нм). Измерения дзета-потенциала не поддерживались этой моделью анализатора. Были проведены прямые измерения как b-AgNP (8М мочевины ×2), так и c-AgNP Alfa Aesar. также выполнено по микрофотографиям ТЕМ с использованием программного обеспечения ImageJ. Двадцать случайных измерения проводились для каждого типа образцов AgNP.

3. Результаты

3.1. МИК-тестирование

b-AgNP (8М мочевины ×2) продемонстрировали наибольшую антимикробную активность в 8/8 случаях. (100%) микробов по МИК-тесту (табл. 2–4). Самая низкая МПК b-AgNP (8М мочевины ×2) 0,31 мкг/мл зафиксировано для бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и ESBL- *Escherichia coli* и самая высокая МПК 2,50 мкг/мл для плесени *Aspergillus fumigatus*. За исключением плесени *Aspergillus fumigatus*, все три типа b-AgNP были эффективны против каждый протестированный бактериальный и грибковый штамм. Перечислены в порядке эффективности против *Candida albicans* представляли собой b-AgNP (8М мочевины ×2) в концентрации 1,25 мкг/мл, b-AgNP (8М мочевины ×1) в концентрации 2,50 мкг/мл и b-AgNP (вода ×2) при 5,00 мкг/мл. Напротив, антимикробной активности нет. был продемонстрирован c-AgNP Alfa Aesar в концентрации 10 мкг/мл, самой высокой оцененной концентрации, у 8/8 (100%) протестированных микробов. Аналогичный результат >10 мкг/мл был отмечен для SkySpring. c-AgNP (SkySpring), включенные в тестирование на грибок и стабильность. Сами по себе b-AgNP (8М мочевины ×2) Диапазон МИК 0,31–2,50 мкг/мл представляет собой эффективную концентрацию, по меньшей мере, в 4–32 раза больше, чем c-AgNP (> 10 мкг/мл).

Таблица 2. Минимальные ингибирующие концентрации (МПК) тестируемых наночастиц против *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* после 24-часовой инкубации при температуре 37 °C на воздухе.

Наночастица	МИК (мкг/мл)		
	кишечная палочка (5,0 × 10 ⁵)	синегнойная палочка (7,5 × 10 ⁵)	Золотистый стафилококк (MSSA) (7,5 × 10 ⁵)
b-AgNP (вода ×2) b-AgNP	1,25	1,25	2,50
(8М мочевины ×1) b-AgNP	1,25	1,25	1,25
(8М мочевины ×2) c-AgNP	0,31	0,31	0,62
(Alfa Aesar)	10,0	10,0	10,0

MSSA = метициллин-чувствительный *Staphylococcus aureus*, () = колониеобразующие единицы на мл-1

Таблица 3. Минимальные ингибирующие концентрации (МПК) тестируемых наночастиц в отношении устойчивости к антибиотикам штаммы *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* после 24-часовой инкубации при 37 °C в окружающем воздухе.

Наночастица	МИК (мкг/мл)		
	Эшерихия фекалис (VRE) (0,6 × 10 ⁵)	Эшерихия коли (ESBL) (5,0 × 10 ⁵)	Золотистый стафилококк (MRSA) (5,5 × 10 ⁵)
b-AgNP (вода ×2) b-AgNP	2,50	1,25	2,50
(8М мочевины ×1) b-AgNP	2,50	0,62	2,50
(8М мочевины ×2) c-AgNP	1,25	0,31	0,62
(Alfa Aesar)	10,0	10,0	10,0

VRE = ванкомицин-резистентный энтерококк, ESBL = бета-лактамазы расширенного спектра, MRSA = метициллин- резистентный золотистый стафилококк, () = колониеобразующие единицы на мл-1

Таблица 4. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) протестированных наночастиц против дрожжей *Candida albicans* и плесени *Aspergillus fumigatus* после 48-часовой инкубации при 37 °С в окружающем воздухе.

Наночастица	МИК (мкг/мл)	
	грибковые микроорганизмы <i>альбиканс</i> (1,0 × 10 ⁵)	<i>Aspergillus fumigatus</i> (1,0 × 10 ⁵)
b-AgNP (вода ×2) b-AgNP	5,00	10
(8М мочевины ×1) b-AgNP (8М	2,50	10
мочевина ×2) c-AgNP (Alfa	1,25	2,50
Aesar) c-AgNP (SkySpring)	10	10
	10	10

() = колониеобразующие единицы на мл-1

3.2.

Спектроскопия. Визу-спектроскопия коммерческих c-AgNP Alfa Aesar выявила наличие двух пиков поглощения. Первый пик, видимый при 418,6 нм, был очень близок к 420 нм, что соответствует значению наночастиц серебра (рис. 2) [6]. Второй более широкий пик был отмечен при 525,5 нм. b-AgNP (вода ×2) показали пик при 406,6 нм, вблизи первого пика c-AgNP Alfa Aesar, но аналогичный пик не наблюдался ни для b-AgNP (8М мочевины ×1) , ни для b-AgNP (8М мочевины ×2). Все три типа b-AgNP продемонстрировали пики, сгруппированные около 570 нм в диапазоне от 562,8 до 584,3 нм. См. «Дополнительные данные» для отдельных спектров и подгонки остатков Фойта (доступно онлайн: <https://www.mathworks.com/matlabcentral/>) . обмен файлами/57603-voigt-line-shape-fit (по состоянию на 25 ок

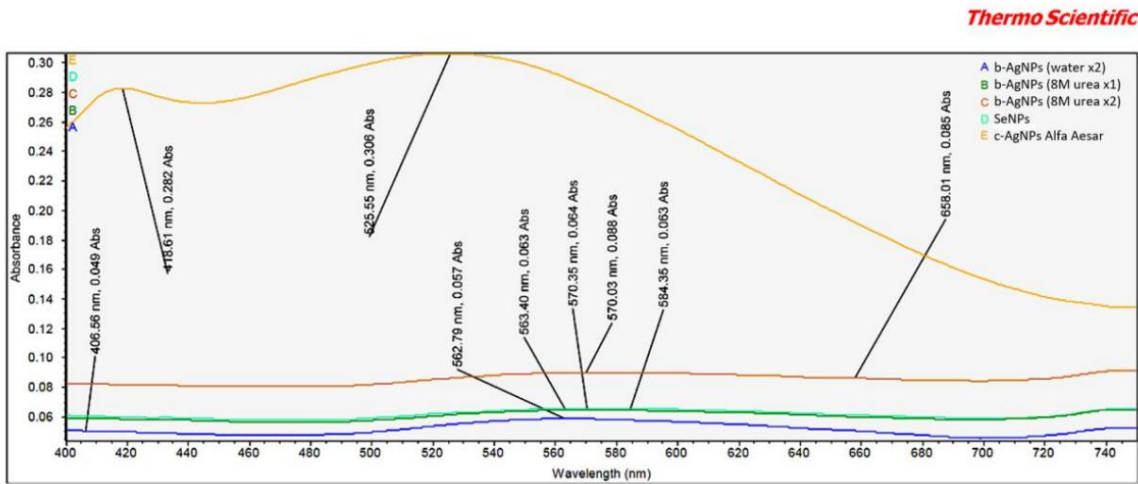


Рисунок 2. Видимые спектры тестируемых наночастиц. Пики поглощения показаны для всех трех b-AgNP (A–C), НЧ селена, не связанных с текущим исследованием (D), и c-AgNP Alfa Aesar (E).

ИК-Фурье анализ образцов b-AgNP (8М мочевины ×2) и образцов c-AgNP Alfa Aesar продемонстрировал в основном схожие картины поглощения, за исключением двух небольших пиков, наблюдаемых для c-AgNP Alfa Aesar при 2359,87 см-1 и Длина волны 2336,46 см-1 (рис. 3). Оба пика наблюдались в средней ИК-области длин волн. Еще двумя отмеченными различиями были пики при 667,86 см-1 для c-AgNP Alfa Aesar и 507,55 см-1 для b-AgNP (8М мочевины ×2). Ни один из них, по-видимому, не находится в частотном диапазоне, связанном с характерной функциональной

ИК-Фурье анализ образцов b-AgNP (8М мочевины ×2) и образцов c-AgNP Alfa Aesar продемонстрировал в основном схожие характеристики поглощения, за исключением двух небольших пиков, наблюдаемых для c-AgNP Alfa Aesar при 2359,87 см⁻¹ и Длина волны 2336,46 см⁻¹ (рис. 3). Оба пика наблюдались в средней ИК-области длин волн. Еще двумя отмеченными различиями были 667,86 см⁻¹ для c-AgNP Alfa Aesar и 507,55 см⁻¹ для b-AgNP (8М мочевины ×2). Ни один из них, по-видимому, не находится в частотном диапазоне, связанном с характерной функциональной группой.

Прил. Нано 2022, 3

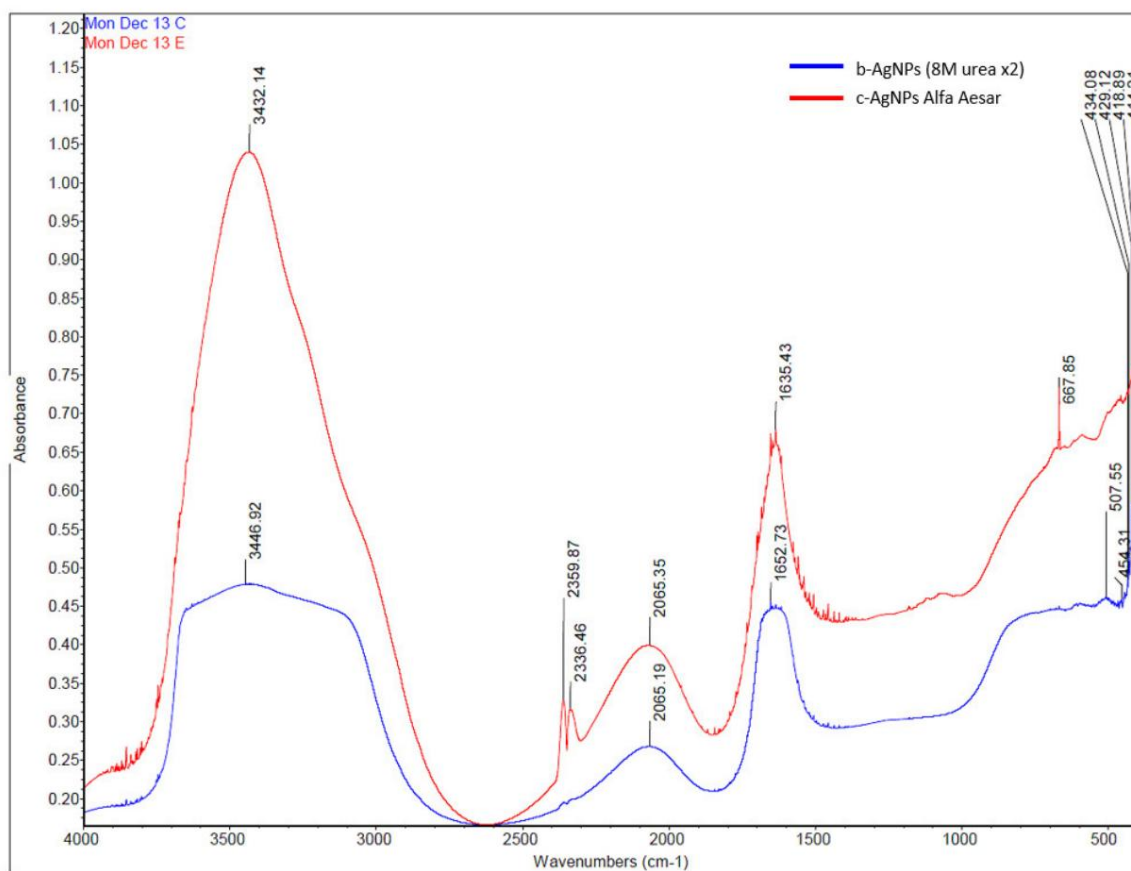


Рисунок 3. Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (FT-IR). Характеристики поглощения (C/blue) b-AgNP (2×8М мочевины) и (E/red) c-AgNP Alfa Aesar.

Спектр ЭДС выявил наличие сигнала в температурном диапазоне энергетического от 3 (рис. 3) до 11 кЭВ. Одновременно был обнаружен ионизирующий излучатель, работающий ниже 11 кЭВ. Наблюдались небольшие различия в интенсивности пиков, особенно в области 400–1000 см⁻¹. Для b-AgNP (8М мочевины ×2) и c-AgNP Alfa Aesar (рис. 3) в порядке убывания энергии пиков были: 3432, 3446, 2336, 2359, 2065, 1652, 1635, 667, 507, 454, 434, 429, 418, 414 см⁻¹.

3.3. ТЭМ

Прямое сравнение AgNP (8М мочевины ×2) и Alfa Aesar c-AgNP TEM-микрофотографии показали в основном AgNP сферической формы, но также и некоторые различия между ними. Изображение AgNP (8М мочевины ×2) выявило не только многочисленные одиночные НЧ, при просмотре с увеличением 12 000×, а также наличие случайных небольших агрегатов (рис. 5). Напротив, при просмотре с увеличением 3000× c-AgNP были более одинаковыми по размеру без подобных агрегатов. Исследование b-AgNP (вода ×2) и b-AgNP (8М мочевины ×1) микрофотографии (не показаны) также показали AgNP сферической формы вместе с некоторыми мелкими агрегатами.

3.4. Определение размера

Анализ Zetasizer показал, что c-AgNP Alfa Aesar были наиболее стабильными в размер ~129 нм (см. табл. 5). Это значение было близко к заявленному размеру ядра 100 нм с диапазоном 98–115 нм, указанным в сопроводительном сертификате анализа. Напротив, большая гетерогенность наблюдалась между размерами 3 b-AgNP. Внесен в список в порядке возрастания размера были b-AgNP (8М мочевины ×2) при ~156 нм, b-AgNP (8М вода ×2) при ~176 нм и b-AgNP (8М мочевины ×1) при ~329 нм. Следует также отметить, что комки были видны в образце b-AgNP (8М мочевины ×1), что, возможно, способствовало его измерению большего размера. Эти комки не могли быть легко рассеяны ультразвуком. Это

Следует также отметить, что образец из более поздней партии b-AgNP (8M мочевины ×2) отправили на размерный анализ. Пик 1 включал частицы размером 147,4 нм со средним Z-140,9 нм. и зета-потенциал -44,4 мВ. Дзета-потенциал указывал на хорошие b-AgNP (8M мочевины ×2). стабильность. Измерения проводились методом DLS с использованием Malvern Zetasizer Nano ZS при b-AgNP (8M мочевины ×2) суспендировали в чистой воде.

Прил. Нано 2022, 3, НА ЭКСПЕРТНУЮ РЕЦЕНЗИЮ

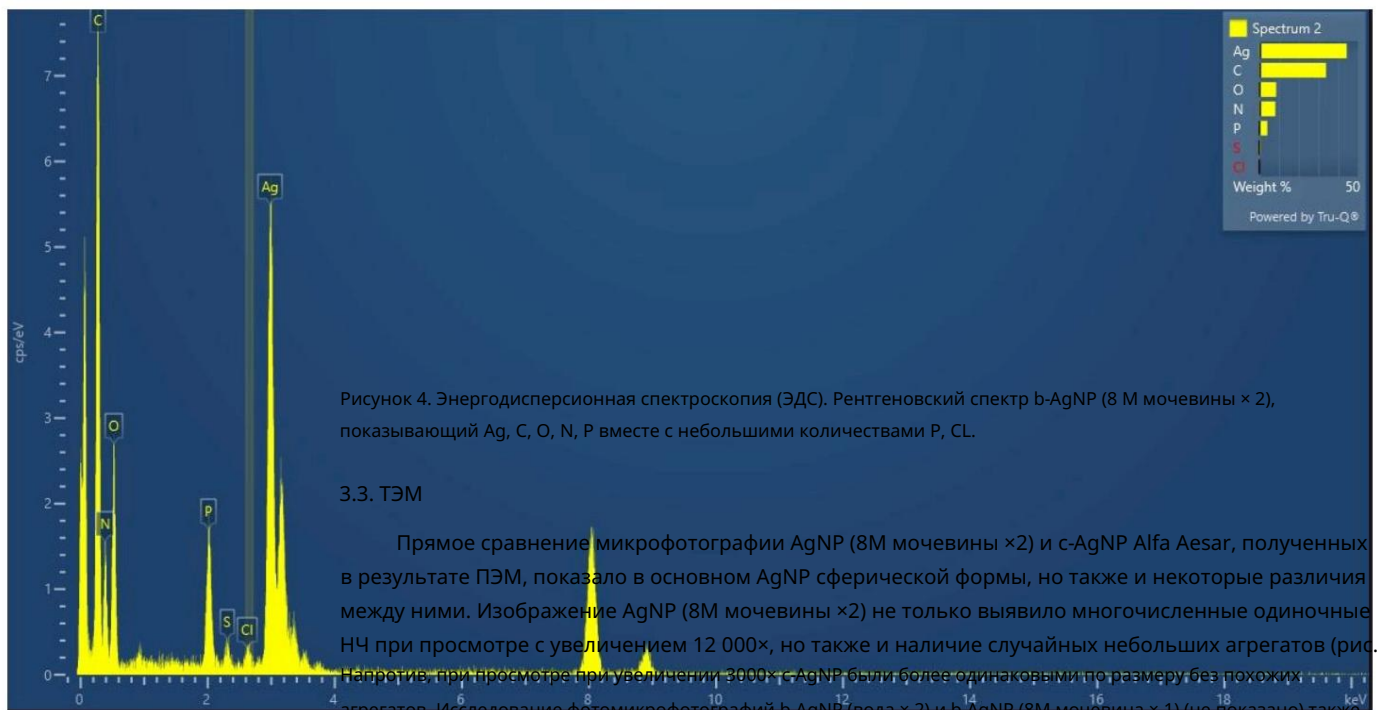
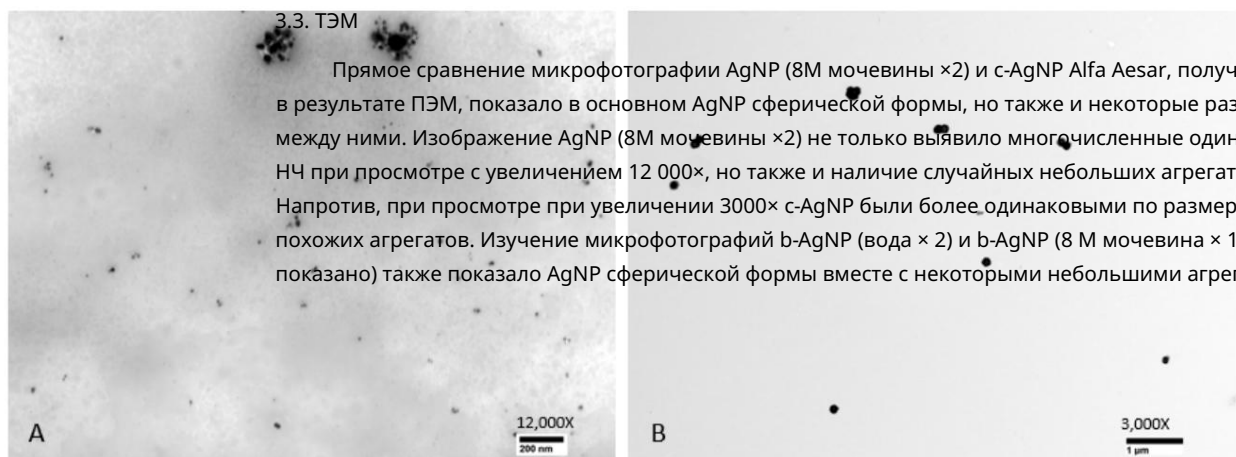


Рисунок 4. Энергодисперсионная спектроскопия (ЭДС). Рентгеновский спектр b-AgNP (8 M мочевины × 2), показывающий Ag, C, O, N, P вместе с небольшими количествами P, CL.

3.3. ТЭМ

Прямое сравнение микрофотографии AgNP (8M мочевины ×2) и c-AgNP Alfa Aesar, полученных в результате ПЭМ, показало в основном AgNP сферической формы, но также и некоторые различия между ними. Изображение AgNP (8M мочевины ×2) не только выявило многочисленные одиночные НЧ при просмотре с увеличением 12 000×, но также и наличие случайных небольших агрегатов (рис. 5). Напротив, при просмотре при увеличении 3000× c-AgNP были более одинаковыми по размеру без похожих агрегатов. Исследование фотомикрофотографий b-AgNP (вода × 2) и b-AgNP (8M мочевины × 1) (не показано) также показало AgNP сферической формы вместе с небольшими частицами. Рентгеновский спектр b-AgNP (8M мочевины ×2), указывающий на Ag, C, O, N, P вместе с небольшими количествами P, CL.



3.3. ТЭМ

Прямое сравнение микрофотографии AgNP (8M мочевины ×2) и c-AgNP Alfa Aesar, полученных в результате ПЭМ, показало в основном AgNP сферической формы, но также и некоторые различия между ними. Изображение AgNP (8M мочевины ×2) не только выявило многочисленные одиночные НЧ при просмотре с увеличением 12 000×, но также и наличие случайных небольших агрегатов (рис. 5). Напротив, при просмотре при увеличении 3000× c-AgNP были более одинаковыми по размеру без похожих агрегатов. Изучение микрофотографий b-AgNP (вода × 2) и b-AgNP (8 M мочевины × 1) (не показано) также показало AgNP сферической формы вместе с некоторыми небольшими агрегатами.

Рисунок 5. Просвечивающие электронные микрофотографии. Препараты наночастиц (A) b-AgNP (8M мочевины ×2) при 12000-кратном увеличении и (B) Alfa Aesar c-AgNP при 3000-кратном увеличении.

Рисунок 5. Просвечивающие электронные микрофотографии. Препараты наночастиц (A) b-AgNP (8M мочевины × 2) при 12 000- кратном увеличении и (B) Alfa Aesar c-AgNP при 3000-кратном увеличении.

Таблица 5. Измерения частиц методом DLS с использованием Malvern ZEN 1600 Zetasizer.

Наночастицы	Размер	Ширина
AgNP (вода ×2)	176,3 нм	12,95 нм
AgNP (8М мочевины ×1)	329,8 нм	56,66 нм
AgNP (8М мочевины ×2)	156,1 нм	12,98 нм
AgNP (коммерческий)	129,2 нм	40,55 нм

Контроль частиц латекса ThermoFisher (61 нм ± 4) = 65,2 нм.

Анализ микрофотографий TEM с использованием программного обеспечения ImageJ выявил средний диаметр b-AgNP (8М мочевины × 2) 28,7 нм в диапазоне размеров от 15,5 до 49,1 нм. Измерения агрегатов b-AgNP (8 М мочевины × 2) находились в диапазоне 148–170 нм. Напротив, c-AgNP Alfa Aesar имели длину 143,5 нм в диапазоне 103,3–179,91 нм. В товарном образце агрегаты не отмечены.

4. Дискуссия

В совокупности эти результаты показывают, что b-AgNP, полученные с использованием материала клеточного лизата, действительно представляют собой наночастицы серебра. Поддержка обеспечивается результатами Vis-спектра, FT-IR, TEM и EDS. Кроме того, результаты показывают, что обработка b-AgNP в два раза увеличивает их антимикробную активность против микроорганизмов.

Визуальный спектр выявил два интересных объекта, касающихся c-AgNP Alfa Aesar (рис. 2). Во-первых, интенсивности пиков как при 418,6 нм, так и при 525,5 нм были заметно выше, чем у b-AgNP. По-видимому, это указывает на относительную разницу в концентрациях между b-AgNP и c-AgNP Alfa Aesar. Этот результат хорошо коррелирует с аналогичными различиями в пиковой амплитуде между этими двумя AgNP, продемонстрированными с помощью ИК-Фурье анализа. Он поддерживает b-AgNP, особенно b-AgNP (8М мочевины ×2), поскольку они более биоактивны, чем c-AgNP Alfa Aesar при использовании в более низкой начальной концентрации. Во-вторых, появился неожиданный пик при 525,5 нм. В сопроводительном паспорте безопасности Alfa Aesar c-AgNP (SDS) в качестве компонентов указаны вода, цитрат натрия (дигидрат) и серебро [15]. Значение этого пика остается неизвестным, несмотря на запрос, отправленный в Alfa Aesar.

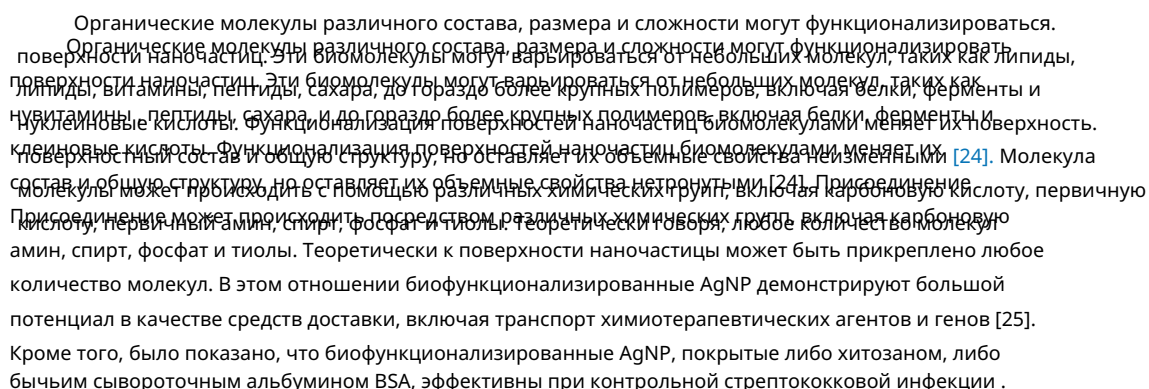
Еще одним интересным открытием стал пик при 658,0 нм для b-AgNP (8М мочевины ×2), который отсутствовал ни в b-AgNP (вода ×2), ни в b-AgNP (8М мочевины ×1). Вообще говоря, поглощение AgNP зависит от размера частиц, формы частиц, диэлектрической среды и химического окружения [16]. Эйбара сообщил о пиках поглощения AgNP между 420 и 480 нм. Было замечено, что эти же пики смещаются в сторону более длинных волн по мере увеличения размера частиц [17]. Барбар и др. сообщили о пиках поглощения при 400 нм для c-AgNP, полученных с использованием различных концентраций AgNO₃ и 0,5 мМ тринатриевых и 0,3 мМ стабилизаторов боргидрида натрия [18]. В текущем исследовании каждый из протестированных AgNP был суспендирован в 2 мМ цитрате натрия, длина волны которого составляет около 210 нм [19]. Эта более низкая длина волны имеет тенденцию устранять любой возможный вклад 2 мМ стабилизатора цитрата натрия в отмеченные пики.

Наличие нескольких полос поглощения, обнаруженных с помощью ИК-Фурье для b-AgNP (8М мочевины ×2) и Alfa Aesar c-AgNP, позволяет предположить, что оба имеют функциональные группы, прикрепленные к их поверхности (рис. 3). Например, широкая полоса поглощения, наблюдаемая при 3446,92 см⁻¹ для b-AgNP (8М мочевины), представляет собой либо один пиковый участок NH, либо участок OH с водородными связями, либо, возможно, и то, и другое. Как отмечено для видимого спектра, высота пиков c-AgNP Alfa Aesar, зарегистрированных с помощью FT-IR, была заметно выше, чем пики b-AgNP (8М мочевины ×2).

Обнаружение C, O, N, P и небольших количеств Cl и S с помощью EDS-анализа предполагает наличие органических веществ (рис. 4). Было обнаружено незначительное количество фосфора, что свидетельствует о том, что нитрат серебра не вступал в реакцию с фосфатным буфером и не выпадал в осадок в виде соли, а вместо этого образовывал b-AgNP. Органическое вещество может представлять собой остаточный материал клеточного лизата, все еще присутствующий после обработки b-AgNP. Более вероятно, что некоторые органические молекулы в клеточном лизате ассоциировались с поверхностями AgNP при контакте друг с другом. Добавление 8М мочевины во время обработки могло дополнительно способствовать покрытию или функциона-

для контроля роста *Aspergillus fumigatus*. Скорее всего, более высокая концентрация МИК была необходим для плесени *Aspergillus fumigatus*, чем *Candida albicans*, из-за наличия спящих грибковые споры. Споры грибов имеют толстую оболочку, что делает их устойчивыми к большинству противомикробные средства [20]. Наличие спор в тестовом инокуляте также может помочь объяснить, почему как b-AgNP (вода ×2), так и b-AgNP (8М мочевины ×1) оказались неэффективными при МИК 10 мкг/мл. Более низкое значение МИК каждого из 3 b-AgNP было достаточным для ингибируют дрожжи *Candida albicans*, поскольку они не способны образовывать споры. Требование к более высокому Концентрация МИК b-AgNP также могла быть связана с тем, что грибы имеют различную клеточные стенки, чем бактерии [21]. В совокупности результаты как бактериальной, так и грибковой МИК служат

доступные растворимые молекулы встречались в группе b-AgNP (8М мочевины $\times 2$), получавшей два ОБЗОРА, отделив обработку 8М мочевиной, тем самым повышая ее антимикробную активность до гораздо большей степени, чем b-AgNP (8М мочевины $\times 1$), получившие только одну обработку 8М мочевиной (рис. 7).



могут быть прикреплены к поверхности наночастиц. В этом отношении биофункционализированные AgNP демонстрируют большой потенциал в качестве средств доставки, включая транспортировку химиотерапевтических препаратов, агенты и гены [25]. Кроме того, биофункционализированные AgNP, покрытые либо хитозаном, либо или бычий сывороточный альбумин (БСА) доказали свою эффективность в борьбе со стрептококком. mutans, бактерия, связанная с биопленками бляшек, вызывающая кариес зубов [26]. AgNP, покрытые хитозаном, также эффективны против грамотрицательных бактерий, обладают низкой цитотоксичностью и может быть полезен при замедленном высвобождении лекарств, таких как противогрибковый препарат итраконазол [27–29].

Предложенные механизмы повышения антимикробной активности b-AgNP (8М мочевины ×2) дополнительно связаны с определяемым размером частиц и дзета-потенциалом. Касательно размера, меньшие металлические наночастицы имеют тенденцию больше взаимодействовать с плазматическими мембранами микробов, что приводит к их разрушению [30]. В связи с этим AgNP диаметром менее 100 нм используются в широкий спектр применения, включая покрытия из антимикробных веществ для биомедицинских устройств, средства доставки лекарств, датчики визуализации, диагностические устройства и оптоэлектронные компоненты. В основном это связано с их хорошо известной антимикробной активностью и исключительными электрическими свойствами. свойства [1]. Кроме того, наночастицы также должны быть достаточно маленькими, чтобы проходить через внешнюю клеточную стенку микроба перед контактом с подлежащей плазматической мембраной. Это очень маловероятно, что внешняя клеточная стенка тестируемых микробов препятствовала попаданию AgNP в подлежащая плазматическая мембрана. Невозможно легко объяснить, почему c-AgNP Alfa Aesar размером ~129 нм не продемонстрировали антимикробной активности, в то время как несколько более крупные b-AgNP (8М мочевины ×2) размером ~156 нм сделали это. Это указывает на два отличительных момента. Первый, что функционализированные b-AgNP размером >100 нм также могут проявлять значительную антимикробную активность. Во-вторых, сам по себе размер AgNP не является основным определяющим фактором противомикробной терапии. активность в текущем исследовании, о чем свидетельствует отсутствие активности c-AgNP Alfa Aesar против тестовые микробы. Измеренный дзета-потенциал -44,4 мВ для b-AgNP (8М мочевины × 2) указывает на хорошую стабильность частиц даже при наличии некоторых мелких агрегатов, в то время как подвешены в воде.

Наконец, повторное тестирование охлажденных AgNP показало, что каждый из трех b-AgNP потерял очень небольшую эффективность после года хранения в янтарных микропробирках, защищенных от свет (табл. 6). Большая потеря активности была отмечена для обоих b-AgNP (вода ×2) и b-AgNP (8М мочевины ×1), где было отмечено снижение их эффективности как минимум в 4 раза. Однако способность b-AgNP (8М мочевины ×2) контролировать рост MSSA была минимальной. затронуты, изменяясь с МИК 0,62 мкг/мл до 1,25 мкг/мл, что фактически приводит к удвоению его концентрация. Это открытие позволяет предположить, что 2 мМ цитрат натрия является хорошим выбором для повышение долгосрочной стабильности хранящихся AgNP.

Таблица 6. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) тестируемых наночастиц против стафилококка aureus (MSSA) год спустя.

Наночастица	МИК (мкг/мл)		
	Золотистый стафилококк (МССА)	Золотистый стафилококк (МССА)	Разница 1-й и 2-й анализ (±Разведения)
	1-й анализ (7,5 × 10 ⁵)	2-й анализ (3,0 × 10 ⁵)	
b-AgNP (вода ×2) b-	2,50	10	+2
AgNP (8М мочевины ×1) b-	1,25	5.0	+2
AgNP (8М мочевины ×2) c-	0,62	1,25	+1
AgNP (Alfa Aesar) c-AgNP	10,0	10	Н/Д
(SkySpring)	без даты	10	Н/Д

() = колониеобразующие единицы на мл-1, НД = Не выполнено.

5. Выводы

Постпроизводственная обработка внеклеточно синтезированных b-AgNP тремя различными обработки привели к различной растворимости, что позволило покрыть их поверхности

лизируют биомолекулы. Функционализация b-AgNP происходила по мере того, как небольшие молекулы, присутствующие в лизатах бактериальных клеток, ассоциировались с их поверхностью. Наибольшая степень функционализации наблюдалась у b-AgNP, дважды обработанных 8М мочевиной, из-за повышенной растворимости, что, в свою очередь, придавало большую степень антимикробной активности. Если это правда, то это означает, что обработка b-AgNP двумя последовательными обработками 8М мочевиной может способствовать большей растворимости и стабильности в водном растворе, что приводит к лучшему контролю роста инфекционных микробов, по крайней мере, в указанных условиях испытаний. Более того, большая степень функционализации b-AgNP (8М мочевины $\times 2$), возможно, также способствовала его большей стабильности с течением времени. Важным наблюдением было то, что все три b-AgNP продемонстрировали большую антибактериальную способность, чем c-AgNP, полученные из двух коммерческих источников. Во всех случаях два протестированных c-AgNP были неспособны ингибировать рост микробов тестируемых бактерий и грибов при самой высокой протестированной концентрации. Таким образом, более низкая эффективная концентрация, широкий спектр антимикробной активности, небольшой размер и длительный срок хранения b-AgNP (8М мочевины $\times 2$) делают их отличными кандидатами для использования в различных приложениях, предназначенных для предотвращения роста микробов вместо протестированных c-AgNP. Дополнительные преимущества AgNP (8М мочевины $\times 2$) включают меньшие количества, необходимые для борьбы с микробами, снижение риска цитотоксичности для человека и сокращение отходов химического синтеза, которые в конечном итоге попадают в окружающую среду.

Дополнительные материалы. Следующую вспомогательную информацию можно загрузить по адресу: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/appnano3040014/s1>, Рисунок S1: Отдельные спектры и подгонка остатков Фойта.

Вклад автора: концептуализация, TR и QY; Методология, TR, QY и MH; Валидация, TR, QY и MH; Формальный анализ, TR и QY; Расследование, TR, QY и MH; Ресурсы, TR и QY; Письмо — TR и QY; Написание — просмотр и редактирование, TR, QY и MH; Визуализация, TR и QY Надзор, TR и QY; Администрация проекта, TR. Приобретение финансирования, TR. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование: Это исследование было поддержано в значительной степени грантом CORS от Колледжа смежных медицинских профессий Пэта Кэппса Кови Университета Южной Алабамы. Это исследование финансировалось Министерством обороны/Армейским исследовательским управлением (DoD/ARO), номер гранта W911NF-18-1-0444.

Заявление о доступности данных: данные доступны по запросу.

Благодарности: Мы благодарим Эдварда Дюранте с химического факультета Университета Южной Алабамы за выполнение спектроскопии видимого света и ИК-Фурье анализа, а также Александру Стенсон с химического факультета Университета Южной Алабамы за использование ее оборудования для лиофилизации. Мы очень благодарны Сайласу Ливсли, факультету химической и биомолекулярной инженерии Университета Южной Алабамы, за предоставление информации о соответствии Фойгта. Наконец, авторы хотели бы поблагодарить Юн Дина из Технологического института Джорджа за помощь в проведении

Конфликты интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Рекомендации

1. Альматруди, А. Наночастицы серебра: синтез, характеристика и биомедицинские применения. *Открытая наука о жизни*. 2020, 15, 819–839. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
2. Ли, С.Х.; Джун, Б.-Х. Наночастицы серебра: синтез и применение в наномедицине. *Межд. Дж. Мол. наук*. 2019, 20, 865. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
3. Стенсберг, МС; Вэй, QS; Макламор, ES; Портерфилд, DM; Вэй, А.; Сепульведа, М.С. Токсикологические исследования наночастиц серебра : проблемы и возможности в оценке, мониторинге и визуализации. *Наномедицина* 2011, 6, 879–898. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
4. Буафия, А.; Лауини, ЮВ; Ахмед, АСА; Солдатов А.В.; Алгарни, Х.; Чонг, К.Ф.; Али, Г.А.М. Недавний прогресс в области наночастиц серебра: синтез и электронные приложения. *Наноматериалы* 2021, 11, 2318. [\[CrossRef\]](#)
5. Размер рынка наночастиц серебра, доля — отраслевой прогноз, 2030 г. 2022 г. Доступно онлайн: <https://www.alliedmarketresearch.com/silver-nanoparticles-market-A06923> (по состоянию на 12 мая 2022 г.).
6. Иравани, С.; Корбеканди, Х.; Мирмохаммади, СВ; Золфагари, Б. Синтез наночастиц серебра: химические, физические и биологические методы. *Рез. Фарм. наук*. 2014, 9, 385–406. [\[ПабМед\]](#)
7. Пуулоз, С.; Панда, Т.; Наир, ПП; Теодор, Т. Биосинтез наночастиц серебра. *Дж. Наноски. Нанотехнологии*. 2014, 14, 2038–2049. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

8. Галло, Г.; Скиллачи, Д. Бактериальные наночастицы металлов для разработки нового оружия против бактериальных биопленок и инфекций. Прил. Микробиол. Биотехнология. 2021, 105, 5357–5366. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
9. Вахаб, Массачусетс; Ли, Л.; Ли, Х.; Абдала, А. Нанокмозиты на основе наночастиц серебра для борьбы с инфекционными возбудителями: новейшие достижения Достижения и перспективы на будущее. Наноматериалы 2021, 11, 581. [\[CrossRef\]](#)
10. Юань, Ц.; Бомма, М.; Хилл, Х.; Сяо, З. Экспрессия фитохелатинсинтазы *Rhizobium tropici* в *Escherichia coli* привела к увеличению синтеза бактериальных наночастиц селена. Дж. Нанопарт. Рез. 2020, 22, 1–13. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
11. Юань, Ц.; Бомма, М.; Сяо, З. Усиление внеклеточного синтеза наночастиц золота с помощью растворимых экстрактов *Escherichia coli* Трансформирован геном фитохелатинсинтазы *Rhizobium tropici*. Металлы 2021, 11, 472. [\[CrossRef\]](#)
12. CLSI M37 – Эталонный метод для определения противогрибковой чувствительности дрожжей при разведении бульона, 4-е изд.; Институт клинических и лабораторных стандартов : Уэйн, Пенсильвания, США, 2017 г. Доступно онлайн: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m27/> (по состоянию на 15 августа 2022 г.).
13. CLSI M38 – Эталонный метод для определения противогрибковой чувствительности мицелиальных грибов при разбавлении бульона, 3-е изд.; Институт клинических и лабораторных стандартов: Уэйн, Пенсильвания, США, 2017 г. Доступно онлайн: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m38/> (по состоянию на 15 августа 2022 г.).
14. Маттеи, А.С.; Алвес, Ш.; Северо, СВ; Гуазелли, СПД; Оливейра, FDM; Северо, Л.К. Использование бульона Мюллера-Хинтона и агара в тест на зародышевую трубку. Преподобный Инст. Мед. Троп. Сан-Паулу , 2014 г., 56, 483–485. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
15. Паспорт безопасности (SDS): наночастицы серебра, 100 нм, 0,02 мг/мл, поставляются в 2 мМ цитрате натрия (кат. номер: J67099). (пересмотренный 27 февраля 2020 г.). 2022 г. Доступно онлайн: <https://assets.thermofisher.com/> . (по состоянию на 22 мая 2022 г.).
16. Тан С.; Чжэн Дж. Антибактериальная активность наночастиц серебра: структурные эффекты. Адв. Здоровьес. Матер. 2018, 7, 1701503. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
17. Эйбара, Р.А. О: Каков спектр поглощения наносеребра? 2022. Доступно онлайн: https://www.researchgate.net/post/What_is_the_absorbion_spectrum_for_nano_silver/60024ec9cf130d4376035af2/citation/download (по состоянию на 25 мая 2022 г.).
18. Бабар Р.; Маццеи, Л.; Тхань, НТК; Гавриилдс, А. Синтез наночастиц серебра в микрофлюидном коаксиальном проточном реакторе. РСК Адв. 2015, 5, 95585–95591. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
19. Круковский С.; Карасевич, М.; Колодзейски, В. Удобное УФ-спектрофотометрическое определение цитратов в водных растворах с применением в фармацевтическом анализе составов электролитов для перорального применения. J. Анал с едой и лекарствами. 2017, 25, 717–722. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
20. Финк С.; Бурмистер, А.; Хиплер, У.; Ноймайстер, К.; Гетц, MR; Виганд, К. Эффективность противогрибковых средств против грибковых спор: исследование in vitro с использованием микропланшетной лазерной нефелометрии и искусственно инфицированной 3D-модели кожи. Микробиол. Открытие 2022, 11, e1257. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
21. Тортора, Г.Дж.; Функе, БР; Кейс, К. Л. (ред.) Микробиология: введение, 13-е изд.; Pearson Education: Бостон, Массачусетс, США, 2019 г.; п. 334.
22. Хуа, Л.; Чжоу, Р.; Тирумалай, Д.; Берн, Б.Дж. Денатурация мочевины за счет более сильных дисперсионных взаимодействий с белками, чем вода предполагает двухэтапное разворачивание. Учеб. Натл. акад. наук. США 2008, 105, 16928–16933. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
23. Райфстек, Ф.; Ви, С.; Уилкинсон, Б.Дж. Гидрофобность-гидрофильность стафилококков. Дж. Мед. Микробиол. 1987, 24, 65–73. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
24. Равиндран А.; Чандрен, П.; Хан, С.С. Биофункционализированные наночастицы серебра: достижения и перспективы. Коллоиды Прибой. Б Биоинтерфейсы 2013, 105, 342–352. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
25. Саркар К.; Банерджи, СЛ; Кунду, ПП; Мадрас, Г.; Чаттерджи, К. Биофункционализированные наночастицы серебра с модифицированной поверхностью для доставки генов. Дж. Матер. хим. Б 2015, 3, 5266–5276. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
26. Мартинес-Роблес, М.; Лойола-Родригес, JR; Завала-Алонсо, Невада; Мартинес-Мартинес, RE; Руис, Ф.; Лара-Кастро, Р.Х.; Доноуэ- Корнехо, А.; Рейес-Лопес, Ю.Ю.; Эспиноза-Кристобаль, Л.Ф. Антимикробные свойства биофункционализированных наночастиц серебра на клинических изолятах *Streptococcus mutans* и его серотипах. Наноматериалы 2016, 6, 136. [\[CrossRef\]](#)
27. Хеландер И.; Нурмиахо-Лассила, Э.-Л.; Ахвенанен, Р.; Роудс, Дж.; Валик, С. Хитозан нарушает барьерные свойства внешней мембрана грамотрицательных бактерий. Межд. J. Пищевая микробиол. 2001, 71, 235–244. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
28. Вонгприча, Дж.; Полпанич, Д.; Сутивонг, Т.; Каевсанеха, К.; Танборибунрат, П. Однореакторный крупномасштабный зеленый синтез наночастиц серебра-хитозана с повышенной антибактериальной активностью и низкой цитотоксичностью. Угледов. Полим. 2018, 199, 641–648. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
29. Саручи; Каур, М.; Кумар, В.; Гфар, А.А.; Панди, С. Зеленый подход к синтезу бионанокмозита хитозана с внедренными наночастицами серебра как потенциального устройства для замедленного высвобождения препарата итраконазол и его антибактериальных характеристик. Полимеры , 2022, 14, 1911. [\[CrossRef\]](#) [\[ПабМед\]](#)
30. Сиддики, Канзас; Хусен, А.; Рао, РАК Обзор биосинтеза наночастиц серебра и их биоцидных свойств. Дж. Нанобиотехнологии. 2018, 16, 14. [\[CrossRef\]](#) [\[ПабМед\]](#)