

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA FYZIKÁLNÍ CHEMIE

**Biologická aktivita nanočástic stříbra vůči
eukaryotním a prokaryotním organismům**

Disertační práce

Mgr. Monika Smékalová

Školitel: doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.
Konzultant: doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Libora Kvítka, CSc. a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu literatury. Tato disertační práce ani její část nebyla použita pro získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci, dne _____

Mgr. Monika Smékalová

Děkuji svému školiteli doc. RNDr. Liboru Kvítkovi, CSc. za veškeré rady a pomoc v průběhu studia. Poděkování patří především doc. RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D. za konzultace, rady, podporu a pomoc při samotné realizaci mé výzkumné činnosti a disertační práce. Děkuji Dr. Virginii Aragon za odborné vedení a vše, co mě naučila v průběhu zahraniční stáže. Také děkuji Mgr. Danielu Jančulovi Ph.D. za spolupráci na výzkumu toxicity nanočástic stříbra. Dále děkuji kolegům z Ústavu mikrobiologie LF UP Olomouc za poskytnutí mikroorganismů a jejich kultivaci při výzkumu rezistence bakterií a synergie nanočástic stříbra a antibiotik.

Děkuji mé rodině a mému příteli Milošovi za trpělivost, důvěru a oporu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Monika Smékalová
Název práce	Biologická aktivita nanočástic stříbra vůči eukaryotním a prokaryotním organismům
Typ práce	Disertační
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.
Rok	2018
Počet stran	113
Jazyk	Český
Klíčová slova	Nanočástice stříbra, synergie, rezistence, toxicita, antibakteriální aktivita

Abstrakt:

Tato disertační práce shrnuje poznatky z oblasti biologické aktivity nanočástic stříbra (AgNP) vůči eukaryotním a prokaryotním organismům. Na jedné straně se zabývá studiem bakteriální citlivosti (antibakteriální aktivita) a odolnosti (rezistence) vůči AgNP a na straně druhé řeší otázku jejich cytotoxicity vůči savčím buňkám a ekotoxicity vůči *Daphnia magna*.

První část práce je zaměřena na studium posílení antibakteriálního působení antibiotik kombinací s AgNP. Míra kombinovaného účinku byla hodnocena pomocí frakční inhibiční koncentrace (FIC) získané mikrodiluční metodou. Získané hodnoty FIC prokázaly silný synergický efekt různých antibiotik v kombinaci s AgNP proti Gram-negativním i Gram-pozitivním bakteriím při velmi nízkých koncentracích řádově desetin až jednotek mg/l, které nevykazovaly cytotoxický efekt vůči savčím buňkám. Nezanedbatelný kombinovaný antibakteriální účinek antibiotik a AgNP byl prokázán i vůči testovaným zvířecím patogenním bakteriím. Z aplikačního pohledu lze za velice úspěšný výsledek považovat obnovení antibakteriálního účinku amoxicilinu pomocí AgNP proti multirezistentní bakterii *Actinobacillus pleuropneumoniae* způsobující závažné infekční onemocnění prasat.

Druhá část disertační práce odpovídá na otázku, zda se u bakterií může vyvinout rezistence k AgNP podobně jako k antibiotikům po dlouhodobé a opakované expozici. *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* byly opakovaně vystavovány subinhibičním koncentracím AgNP a po každé kroku byla určena minimální inhibiční koncentrace (MIC). Na základě zvyšující se MIC byla již po 13 expozičních krocích jasně prokázána zvýšená odolnost bakterií vůči AgNP. Mechanismus takto indukované

rezistence spočívá v produkci proteinu flagelinu, který vyvolává agregaci a nárůst velikosti AgNP, které tak ztrácí své antibakteriální účinky.

Celkový náhled na biologickou aktivitu AgNP uzavírá studium jejich chronické toxicity pro korýše *D. magna*. V této studii byl zkoumán vliv koncentrace kultivačního média a použití povrchového stabilizátoru AgNP na stabilitu a chronickou toxicitu AgNP vůči *D. magna* na základě sledování jejich viability a reprodukce. Získané výsledky prokázaly zásadní vliv kultivačního média na stabilitu a krystalinitu AgNP, které výrazně ovlivňovaly chronickou toxicitu AgNP.

Bibliographic identification

Author	Monika Smékalová
Title	Biological activity of silver nanoparticles against eukaryotic and prokaryotic organisms
Type	Dissertation
Department	Department of Physical Chemistry
Supervisor	doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.
Year	2018
Pages	113
Language	Czech
Keywords	Silver nanoparticles, synergy, resistance, toxicity, antibacterial activity

Abstract:

Dissertation thesis summarizes results related to the biological activity of silver nanoparticles (AgNPs) against eukaryotic and prokaryotic organism. On the one hand, the thesis is focused on the study of bacterial sensitivity (antibacterial activity) and resistance against AgNPs and, on the other hand, AgNPs cytotoxicity towards mammalian cells and ecotoxicity towards *Daphnia magna* is discussed.

First part of the thesis is focused on study of the enhancement of antibiotic antibacterial activity in combination with AgNPs. The effect of combined activity was evaluated by using of fraction inhibition concentration index (FIC) measured by microdilution method. Obtained values of FIC demonstrated strong synergistic effect of various antibiotics with AgNPs against both, Gram-positive and Gram-negative bacteria. The effect was proved even at low concentrations (in the order of tenths to units mg/l), where no cytotoxic effect against mammalian cells was observed. Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with AgNPs was also proved against animal pathogenic bacteria. From the application point of view is one of the most successful results restoration of antibacterial action of amoxicillin against multi-resistant bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae*, which causes serious causing respiratory disease and mortality in pigs.

The second part deals with question of whether bacteria can develop resistance against AgNPs similar to the resistance against antibiotics after long-term and repeated exposition. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were repeatedly exposed to sub-inhibition concentrations of AgNPs. After each step minimal inhibition concentration (MIC) was measured. Increasing tolerance of bacteria towards AgNPs resulting from increasing value of MIC has already been proven after 13th exposition

steps. The mechanism of induced resistance is based on production of protein flagellin, which causes aggregation and increase of AgNP size. This is accompanied by a loss of antibacterial activity.

The overview of the biological activity of AgNPs is completed by study of chronic toxicity against crustacean *Daphnia magna*. There were studied influence of concentration of culture medium and use of surface stabilisation agent to the stability and chronic toxicity of AgNPs against *Daphnia magna*. The study was carried out on the basis of monitoring of viability and reproduction. The obtained results proved essential influence of culture media to the stability and crystallinity of AgNPs, which significantly influenced chronic toxicity of AgNPs.

Obsah

Úvod.....	9
Teoretická část	11
1. Nanočástice stříbra.....	12
2. Antimikrobiální aktivita AgNP	17
2.1 Antibakteriální aktivita AgNP	17
2.2 Antifungální aktivita	20
2.3 Antivirální aktivita	22
3. Použití AgNP	23
3.1 Analytické aplikace a katalýza.....	23
3.2 Využití biologických vlastností.....	24
4. Synergie antibiotik s AgNP.....	26
5. Rezistence k AgNP	30
6. Toxicita Ag	33
6.1 Cytotoxicita.....	33
6.2 <i>In vivo</i> toxicita AgNP u zvířat.....	34
6.3 Vliv AgNP na člověka	35
6.4 Toxicita AgNP pro vodní organismy	36
Experimentální část.....	38
7. Synergický účinek AgNP a antibiotik vůči zvířecím bakteriím.....	39
8. Synergie AgNP a antibiotik vůči bakteriím citlivým k antibiotikům.....	49
9. Synergie AgNP a antibiotik vůči multirezistentním enterobakteriím	58
10. Tvorba rezistence bakterií k AgNP a její překonání	69
11. Vliv média a stabilizačního činidla na toxicitu AgNP vůči <i>Daphnia magna</i>	83
Závěr	95
Summary	97
Seznam použitých zkratk	99
Reference	101
Seznam publikací	113
Přílohy.....	114

Úvod

Nanočástice stříbra (AgNP) získaly v posledních desítkách let velkou pozornost mimo jiné díky jejich výrazné antimikrobiální aktivitě. Jejich fyzikálně-chemické vlastnosti je předurčují k využití na poli optiky, katalýzy a v biologických aplikacích, jako je buněčné značení, zobrazovací metody apod. Spolu se snadnou výrobou a manipulací se staly nejpopulárnějším nanomateriálem a podle seznamu CPI (Nanotechnology Consumer Products Inventory) jsou součástí nejvíce komerčních produktů s antibakteriální úpravou.¹ Očekává se, že v budoucnu se uplatní při léčbě rakoviny, diabetu a jiných chorob.

Nespočet studií dokazuje baktericidní účinky nanočástic stříbra proti mnoha druhům bakterií napadajících člověka a jiné živočichy. Patří mezi ně i multirezistentní kmeny, jako je methicillin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA)², *Salmonella typhus* rezistentní k chloramphenicolu, amoxicilinu a trimethoprimu apod³.

V současnosti je předmětem výzkumu i synergický účinek nanočástic stříbra a antibiotik. Masové a nezodpovědné používání antibiotik vedlo k vývoji a rychlému rozšíření bakteriální rezistence vůči mnoha antibiotikům. Rostoucí rezistence bakterií k antibiotikům v současnosti patří k nejzávažnějším problémům zdravotní péče. Účinek antibiotik nebezpečně klesá a je třeba nalézt nová řešení v boji proti infekčním chorobám. Slibným řešením problematiky vzrůstající bakteriální odolnosti je obnovení účinku antibiotik pomocí kombinace s jinou antibakteriální látkou. Kombinace antibiotik s AgNP přináší několik výhod, mezi něž patří minimalizace požadované dávky antibiotika, potlačení vývoje bakteriální rezistence a zvýšení efektivity podávaného antibiotika. Část disertační práce se proto zabývá studiem zvýšené aktivity antibiotik v kombinaci s AgNP.

Předpokládané využití AgNP samostatně nebo v kombinaci s antibiotiky při léčbě infekcí vedlo k myšlence ověřit, zda si bakterie mohou k AgNP také vytvořit rezistenci stejně jako k antibiotikům. Další podstatné téma disertační práce je tedy zaměřeno na vznik a popis mechanismu rezistence bakterií k AgNP po dlouhodobé a opakované expozici AgNP.

Vzhledem k rozsáhlému využití AgNP lze předpokládat, že se částice budou uvolňovat do životního prostředí. Úniky AgNP do životního prostředí z průmyslu a z domácností byly několikrát popsány, jedná se např. o kosmetické a hygienické produkty a praní oblečení s obsahem stříbra.^{4,5} Toxicita AgNP je proto intenzivně studována a mnoho těchto studií jednoznačně prokázalo vysokou toxicitu k vodním organismům, jako jsou řasy,

sinice, vodní rostliny, mlži, koryši a ryby apod. AgNP mohou mít také nežádoucí vliv na půdní bakterie na polích nebo např. bakterie v čističkách vod.

V disertační práci jsem se zaměřila na studium chronické toxicity AgNP vůči *D. magna* v závislosti na koncentraci růstového média, které výrazně ovlivňuje jejich stabilitu a tím ve výsledku jejich dlouhodobou toxicitu. Složení růstového média, jeho koncentrace a přítomnost stabilizačních látek ovlivňuje stabilitu AgNP a mění tak nejen jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, ale i ty biologické, v tomto případě jejich toxicitu.

Teoretická část

1. Nanočástice stříbra

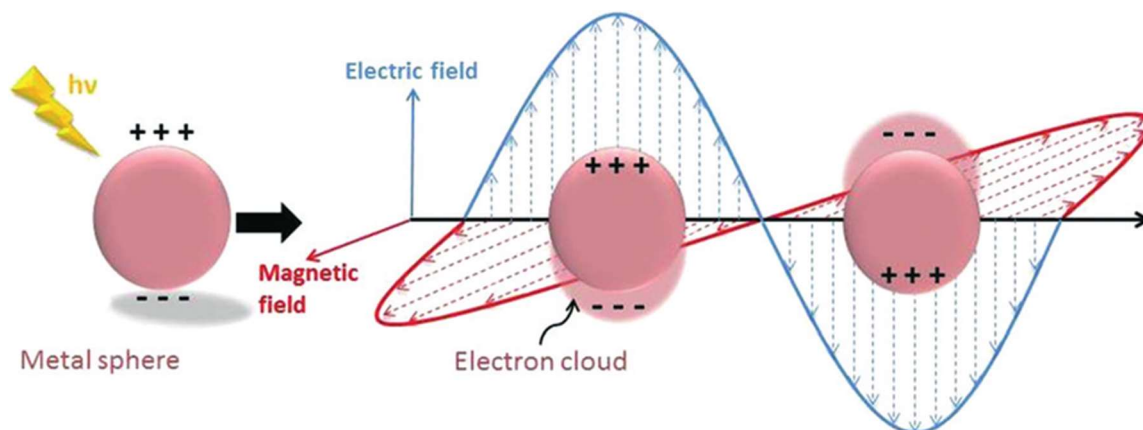
Nanotechnologie jako vědní obor prochází v posledních letech prudkým rozvojem a neustále přichází s novými poznatky, které znamenají významný pokrok např. pro medicínu, vědecké aplikace, ale i pro běžného spotřebitele.

Nanoobjekty (objekty o rozměrech 1 až 100 nm) se vyznačují odlišným fyzikálně-chemickým chováním od makroobjektů (objemových materiálů). Důvodem těchto odlišností je vzrůstající podíl atomů na povrchu částice ku celkovému počtu atomů s klesajícím rozměrem částice a vzrůstající vliv kvantových efektů na magnetické, elektrické a optické vlastnosti. Důležité postavení mají nanočástice kovů, zejména nanočástice stříbra, které jsou snadno a levně připravitelné, stabilní a dají se využít např. v heterogenní katalýze, povrchem zesílené Ramanově spektroskopii nebo v biologických aplikacích. Svě místo si však vydobily také jiné nanočástice kovů, např. ruthenia s jejich protinádorovým působením, palladia s katalytickými vlastnostmi nebo nanočástice mědi, niklu a platiny. Mezi významné vlastnosti nanočástic stříbra pak patří vysoká elektrická a tepelná vodivost, schopnost zesílovat Ramanův rozptyl, katalytická aktivita a nelineární optické chování.⁶

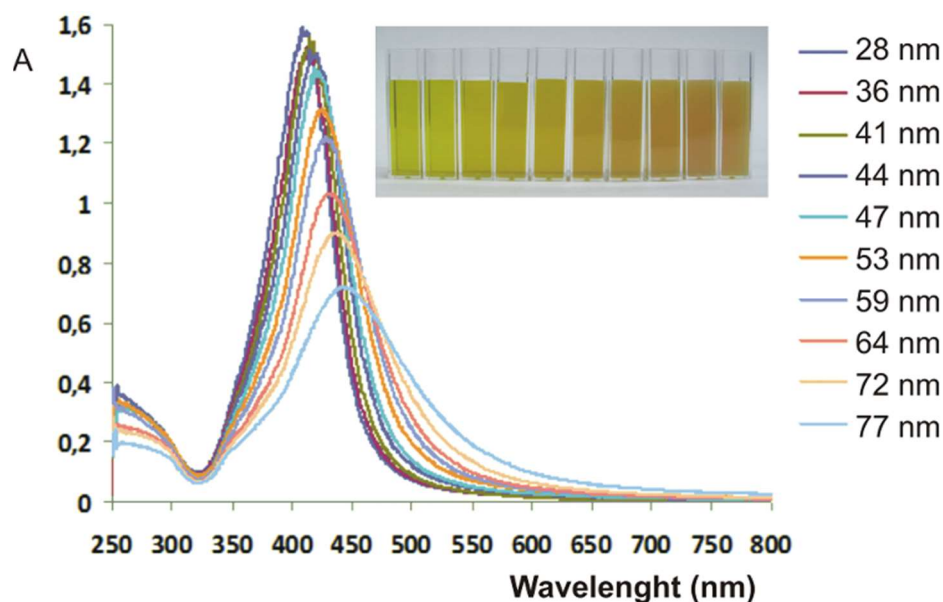
Při interakci elektromagnetického záření s nanočásticemi dochází současně k jeho absorpci a rozptylu do všech směrů beze změny energie. Absorpci a rozptyl světla na malých kovových částicích spojených s existencí povrchového plazmonu teoreticky vysvětlil Mie v roce 1908 řešením Maxwellových rovnic. Intenzivní zbarvení zejména vodných disperzí nanočástic kovů je způsobeno povrchovou plazmonovou rezonancí (SPR).^{7,8} Povrchový plazmon je jev, který se vysvětluje jako koherentní oscilace vodivostních elektronů po interakci s dopadajícím elektromagnetickým zářením (obr. 1). Elektrony se pohybují ve fázi shodné s budící vlnou, a pokud je frekvence tohoto elektromagnetického pole v rezonanci s koherentním pohybem elektronů, dojde k silné absorpci záření. Pro nanočástice stříbra nastává rezonance ve viditelné části spektra a částice ve vodné disperzi se tak jeví barevné.^{7,9} S rostoucí velikostí částic dochází k posunu maxima plazmonové absorpce k vyšším vlnovým délkám (obr. 2). Lokalizovaná povrchová plazmonová rezonance vede ke zvětšení absorpčního a rozptylového průřezu pro elektromagnetické vlny a k nárůstu intenzity pole v blízkosti povrchu částice, což využívá metoda povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS – Surface-enhanced Raman spectroscopy).¹⁰

Rozptylu světla na koloidních částicích lze využít ke stanovení jejich průměrné velikosti. Použijeme-li laser jako zdroj koherentního záření, dochází k interferenci rozptýleného záření, která toto záření zesiluje nebo zeslabuje. Neustálý Brownův pohyb

koloidních částic způsobuje fluktuace intenzity rozptýleného záření v čase kolem průměrné hodnoty, jedná se o dynamický rozptyl světla. Z časového průběhu kolísání intenzity lze zjistit rychlost pohybu částic a následně jejich rozměr. Na tomto principu je založena metoda měření distribuce velikosti částic zvaná Dynamic Light Scattering – DLS.¹¹



Obrázek 1. Schematická ilustrace lokalizovaného povrchového plazmonu (SPR). Převzato z Peiris a kol.⁷



Obrázek 2. Posun maxima SPR k vyšším vlnovým délkám s rostoucí velikostí AgNP. Převzato z Panáček a kol.¹²

Metody přípravy nanočástic lze rozdělit do dvou skupin – top-down (dispergační) a bottom-up (kondenzační) metody. V případě top-down metod jsou z makroskopických částic připravovány částice menší. Jedná se např. o rozprašování v elektrickém oblouku nebo laserovou ablací, při které vznikají čisté částice bez zbytků rozpouštědel.¹³ Bottom-up metody jsou využívány častěji, jelikož při vzniku nové fáze z roztoku lze změnou vnějších parametrů ovlivnit velikost připravených částic, morfologii, stabilitu nebo polydisperzitu. Tyto charakteristiky lze měnit poměrem a koncentrací reakčních složek, pH, teplotou nebo iontovou silou roztoku a volbou redukčního činidla. Polymerní a povrchově aktivní látky pak ovlivňují stabilitu koloidní disperze.

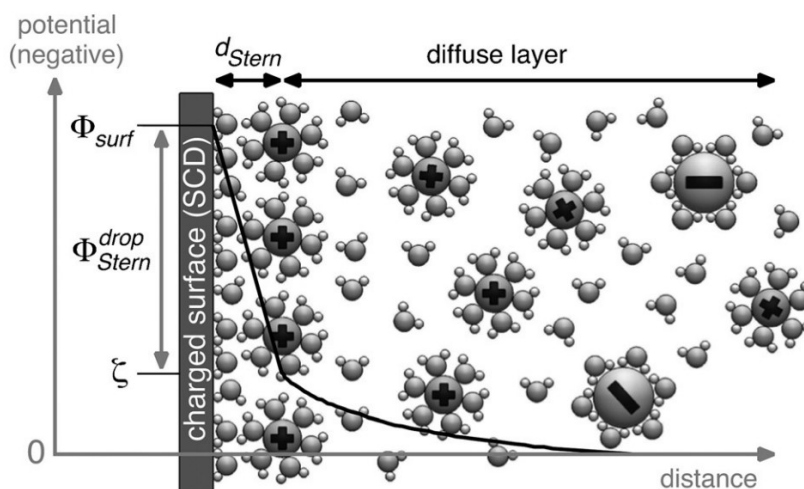
Nanočástice stříbra jsou nejčastěji připravovány ve formě vodných disperzí. Částice lze poté charakterizovat pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM), DLS a UV/Vis spektroskopii. Nejpopulárnějšími metodami jsou chemické redukce za použití různých organických a anorganických redukčních činidel, elektrochemické postupy přípravy a radiolýza. Příkladem metody využívající chemické redukce může být příprava založená na přidavku vodného roztoku AgNO_3 do intenzivně míchaného ledově vychlazeného roztoku NaBH_4 .¹⁴ Vznikají tak disperze stříbra obsahující částice o velikosti 5–20 nm. Jednoduchý a častý způsob přípravy představuje Tollensův postup, který spočívá v redukci amoniakálního komplexního kationtu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ redukujícími sacharidy.¹⁵ Jiným příkladem je metoda podle Leea a Meisela, kde se používá jako redukční činidlo citrátový anion, který zároveň vznikající AgNP stabilizuje.¹⁶ Směs 10 ml 1% roztoku citrátu sodného s 500 ml 1mM AgNO_3 se ponechá hodinu vařit. Vznikají nanočástice o velikostech 30 až 120 nm.

Při fotochemické redukci jsou nejpoužívanějšími donory elektronů aromatické ketony, které pod UV zářením produkují radikály, které jsou vlastním redukčním činidlem.^{17,18} Vlastnosti AgNP vznikajících při fotochemické redukci lze ovlivnit volbou vlnové délky světla¹⁹ nebo magnetickým polem.²⁰

V poslední době vzrůstá zájem o ekonomicky nenáročné a pro životní prostředí přívětivější metody bez užití toxických chemikálií během přípravy. Tzv. green syntézy využívají jednoduché prokaryotické bakteriální buňky, eukaryotické houby nebo rostliny, netoxická rozpouštědla a stabilizační činidla. Příkladem může být redukce AgNO_3 pomocí bakterií, jako je *Klebsiella pneumoniae*, pomocí řas jako je *Spirulina platensis*, houbových mikroorganismů jako *Aspergillus* spp., *Phoma glomerata*, *Trichoderma viride* nebo rostlinných extraktů z *Dioscorea bulbifera*.^{21–25} Tyto metody přípravy jsou založeny na využití redukujících látek, které jsou obsaženy v použitém organismu nebo extraktu, např. sacharidy, enzymy nebo phenolické látky.^{21,26}

Lyofobní koloidy obecně nejsou agregátně stálé a koloidně dispergovaná látka se snadno vylučuje např. při změně pH nebo přidavkem elektrolytu ve formě agregátů primárních částic. Otázku stability disperzí elektricky nabitých nanočástic kovů popisuje teorie DLVO (Derjagin, Landau, Verwey, Overbeek).²⁷ Základní myšlenkou této teorie je vzájemné soupeření přitažlivých a odpudivých sil mezi dvěma koloidními částicemi. Pokud převáží síly odpudivé, vyvolané především elektrostatickou repulzí, nedojde ke styku částic, avšak převáží-li přitažlivé síly vyvolané disperzními přitažlivými interakcemi (van der Waalsovými interakcemi), dojde k jejich spojení.

Povrch koloidních částic nese elektrický náboj, který má význam pro jejich stabilitu a chování v elektrickém poli. Nabitá částice přitahuje protiionty a na jejím povrchu tak vzniká elektrická dvojvrstva. Existuje několik modelů, které elektrickou dvojvrstvu popisují. Nejrozšířenějším modelem je Gouy-Chapman-Sternův model, kterým se dají vysvětlit mnohé rysy chování nanočástic v roztoku elektrolytu (obr. 3).²⁸



Obrázek 3. Schéma elektrické dvojvrstvy podle Gouy-Chapman-Sternova modelu s vyznačením hodnoty zeta (ζ) potenciálu. Převzato z Brown a kol.²⁸

Bliže u povrchu je adsorpčními silami vázána kompaktní Sternova vrstva, na kterou navazuje difúzní část tvořená ionty přitahovanými elektrostatickými silami, která se nepohybuje s částicí. Na rozhraní pohyblivé a nepohyblivé části, tzv. pohybovém rozhraní, se ustavuje elektrokinetický potenciál (zeta potenciál, ζ -potenciál). Čím vyšší je jeho hodnota, tím stabilnější jsou částice díky silnějšímu elektrostatickému odpuzování částic. Zvýšení povrchového náboje částic tedy znamená větší agregační stabilitu. Přidavkem

indiferentního elektrolytu se zvýší koncentrace protiontů, stlačí se elektrická dvojrstva, klesne elektrokinetický potenciál a spolu s ním i stabilita částic. Z hlediska agregační stability je také důležitá hodnota pH, protože povrchový náboj může být ovlivněn disociací funkčních skupin na povrchu a adsorpcí H_3O^+ a OH^- .²⁸ Zvýšení stability naopak může být dosaženo adsorpcí ionických povrchově aktivních látek (PAL), které zvyšují povrchový náboj a tím i elektrostatickou repulzi. Další možností, jak zabránit agregaci, představuje stericke stabilizace, kdy se povrch částic modifikuje adsorpcí neionických PAL nebo polymerů, které nemění povrchový náboj, ale zabraňují těsnému přiblížení částic²⁹.

2. Antimikrobiální aktivita AgNP

2.1 Antibakteriální aktivita AgNP

Obecně jsou kovové nanočástice schopny rychle a efektivně likvidovat celou řadu mikroorganismů, díky čemuž se dostaly do popředí vědeckého zájmu vzhledem k narůstající mikrobiální rezistenci k běžným antibiotikům. Antimikrobiální vlastnosti nesou různé druhy kovových nanočástic, např. nanočástice mědi,³⁰ oxidu zinku³¹ nebo zlata³². Nanočástice stříbra se však jeví nejefektivnější, ať už vůči bakteriím, virům, plísním nebo jiným mikroorganismům.^{2,29,33–36}

Rozsáhlé a často neuvážené a nadbytečné používání antibiotik má za následek rychlý rozvoj a šíření bakteriální rezistence, přičemž některé bakterie se staly dokonce multirezistentními. Nárůst počtu rezistentních kmenů bakterií k antibiotikům se stal ožehavým problémem, lidé by mohli umírat na prosté infekce, a proto se výzkum začal směřovat k nalezení nového druhu baktericidních léčiv, popř. možnosti znovu obnovit účinky antibiotik.

Stříbrné ionty jsou velmi silným baktericidem. Dezinfekce pomocí kovového stříbra a jeho sloučenin je známá už staletí. V ayurvedské medicíně se pro léčbu používaly kovy v kombinaci s bylinkami pro léčbu různých nemocí, proces známý jako Rasa Shastra.³⁷ Ve starověkém Římě se potraviny uchovávaly ve stříbrných nádobách k prodloužení jejich trvanlivosti. Hippokrates (400 př. n. l.) a Avicenna dokonce používali stříbro k léčbě poranění.³⁸ Ve středověku se uchovávání potravin pomocí stříbra velmi rozšířilo. V 15. století si šlechta přidávala stříbro do jídla společně se solí. Mleté stříbro však není biologicky dobře využitelné a masivní užívání stříbra mívalo za následek otravu stříbrem, tzv. argyrii,³⁹ která se projevuje šedo-modrým zbarvením kůže a poškozením jater. Proto se od užívání stříbra začalo upouštět. V průběhu 19. století a především začátkem 20. století se zapomenutému stříbru opět věnuje pozornost a začíná se studovat antimikrobiální aktivita koloidního stříbra. Od konce 19. století se používala metoda tzv. kredeizace,⁴⁰ již zavedl německý porodník Crede, který novorozencům aplikoval 1% roztok AgNO₃ k zabránění hnisavé gonokokové konjunktivitidy způsobující slepotu. Počátkem 20. století byly sloučeniny stříbra nahrazeny koloidním stříbrem, které se stalo rozšířeným a účinným léčivem systémových a lokálních infekcí. Koloidní stříbro bylo aplikováno perorálně a nitrožilně při léčbě systémových infekcí a lokálně pro ošetření popálenin a léčení plísňových nákaz.⁴¹ V letech 1912 až 1917 byla vydána celá řada odborných prací v časopise *British*

Medical Journal či *Lancet* popisujících úspěšné využití koloidního stříbra pro léčbu infekcí kůže, ucha a dutiny ústní, zánětu mandlí⁴²⁻⁴⁴ a o pět let později byly vydány lékopisné normy pro koloidní stříbro a některé stříbrné sloučeniny.⁴⁵ S objevem antibiotik a příchodem antibiotické éry (r. 1940) začalo používání stříbra v medicíně ustupovat, v podstatě jediným léčivem obsahujícím stříbro používaným od 70. let 20. století dodnes je sulfadiazin stříbrný,⁴⁶ který se aplikuje lokálně při léčbě popálenin k eliminaci bakteriálních infekcí. V současné době nachází stříbro uplatnění pouze v lokální terapii a především ve formě zdravotnických prostředků jako je sterilní krytí, endotracheální trubice, katetry či cévní náhrady pro eliminaci lokálních bakteriálních infekcí a tvorby bakteriálního biofilmu⁴⁷⁻⁵⁰.

S prudkým rozvojem výzkumu v oblasti koloidní chemie v druhé polovině 20. století se začala zkoumat v posledních dekadách 20. století i antimikrobiální aktivita koloidního stříbra. Byly publikovány tisíce prací na téma antibakteriální aktivity AgNP, velké množství studií se pak věnuje antivirálním a antimykotickým účinkům AgNP. Je zřejmé, že AgNP vykazují velmi silnou toxicitu pro široké spektrum k antibiotikům rezistentních i citlivých Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií. AgNP jsou toxické i pro multirezistentní bakterie jako *S. typhus*,³ MRSA,² *P. aeruginosa*,⁵¹ multirezistentní enterobakterie⁵² a mnoho dalších. Mechanismy antibakteriální aktivity AgNP byly rozsáhle studovány. Má se za to, že za antibakteriální aktivitu jsou zodpovědné ionty stříbra uvolněné z povrchu nanočástic, avšak některé studie prokázaly, že antimikrobiální aktivita je spojena i s malým rozměrem částic.^{53,54} Zdá se, že AgNP působí na bakterie nespecificky. Vstupují dovnitř buněk a z jejich povrchu se uvolňují ionty stříbra. Způsobují morfologické změny, rozpad buněčné stěny a membrány, uvolnění buněčného obsahu do okolí a tím buněčnou smrt.⁵⁵ Interagují s thiolovými skupinami proteinů účastnících se metabolických procesů, které tímto inaktivují, a buňka odumírá.⁵⁶ Jedním z mechanismů je také kondenzace DNA a ztráta replikační schopnosti.⁵⁷ Dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS) jako je hydroxylový radikál nebo superoxid, které způsobují oxidativní stres. AgNP dále deaktivují enzymy respiračního řetězce, což vede ke smrti bakterií.^{58,59} Dochází také k denaturaci ribozomů a tím potlačení exprese enzymů a proteinů důležitých pro produkci ATP.⁶⁰ Akumulací AgNP v membráně se mění její permeabilita, je ovlivněna správná funkce membránových proteinů a dochází k morfologickým změnám. AgNP dále způsobují změny redoxního cyklu v cytosolu, akumulaci radikálů uvnitř buňky a disipaci gradientu pH skrz cytoplazmatickou membránu, čímž se redukuje tzv. proton motive force, hnací síla syntézy ATP.^{61,62}

Antibakteriální aktivitu lze testovat několika způsoby. Nejčastější jsou to difúzní a diluční metody, mezi méně používané patří např. „time kill assay“, kdy se sleduje růst bakterií v čase. Principem diskové nebo jamkové difúzní metody je měření velikosti inhibiční zóny kolem disku s antibakteriální látkou umístěného na pevné půdě nebo kolem jamky v pevné půdě, do které je aplikován vzorek. Porovnáním velikosti inhibiční zóny s tabulkovými hodnotami se poté rozhoduje o citlivosti nebo rezistenci bakterie. Pomocí dilučních metod se určuje minimální inhibiční koncentrace – MIC, tedy nejnižší koncentrace antibakteriální látky z geometrické koncentrační řady, při které se zastaví růst bakterií. Porovnáním s tabulkovými hodnotami opět určíme citlivost bakterie. Výsledky jednotlivých metod se těžko porovnávají mezi sebou, ale v případě AgNP záleží také na jejich velikosti, tvaru a složení a koncentraci živného média nebo agarové půdy.

Antibakteriální aktivita AgNP závisí na jejich velikosti.^{2,63–66} Menší AgNP mají větší plochu povrchu vzhledem k objemu a do kontaktu s bakterií přijde velká část oblasti povrchu, proto s bakteriemi více interagují. Nejúčinnější se zdají být AgNP o průměrných velikostech nižších než 10 nm. Morones a kol. pomocí TEM prokázali, že s Gram-negativními bakteriemi interagovaly pouze nanočástice s velikostmi 1–10 nm z rozsahu 1–100 nm. Vysoká antibakteriální aktivita AgNP pod 10 nm byla také zaznamenána u *E. coli* a *S. aureus* nejen měřením MIC, které se významně snížily oproti MIC větších AgNP (15–100 nm), ale i z monitorování kinetiky růstu také vyplynulo, že u AgNP o velikosti 5 nm byla baktericidní aktivita rychlejší než u částic větších.⁶⁵ V další práci byly připraveny částice stříbra s průměrnou velikostí 15 nm a 75 nm. K testování byly použity bakterie *E. coli* tentokrát kultivované na agarové půdě. MIC po 24 hodinách v případě větších AgNP (75 nm) byla 31,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, v případě menších AgNP (15 nm) byla MIC rovna 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.⁶⁷

Morfologie částic je také určujícím parametrem antibakteriální aktivity. Např. podle práce autorů Pal a kol. trojhranné zkosené nanočástice inhibují bakteriální růst při 50–100krát menších koncentracích než sférické nanočástice.⁶⁸ Při přípravě AgNP pomocí mikrovlnného záření se volbou doby ozařování, koncentrace prekurzoru a stabilizačního činidla dají získat částice různých velikostí a tvarů. Singh a kol. publikovali, že takto připravené anizotropní AgNP mají lepší baktericidní účinky než sférické nanočástice.⁶⁹

Kromě planktonní formy mohou bakterie tvořit tzv. biofilm, společenství bakterií přichycené k povrchu obalené v extracelulární polymerní matici (EPM).⁷⁰ Ta je vedle vody tvořena makromolekulami (proteiny, polysacharidy nukleové kyseliny), lipidy, peptidoglykany, fosfolipidy, absorbovanými živinami, metabolity buněk a dalšími látkami. EPM nejen fixuje buňky, ale ovlivňuje pohyb plynů a rozpuštěných látek mezi

mikrokoloniemi. Také buňky chrání před vnějšími vlivy okolí jako je UV záření, toxické látky a mechanické poškození. Tvorba biofilmů byla prokázána u většiny patogenních bakterií, např. u zástupců rodů *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* apod.⁷⁰⁻⁷² Běžně se vyskytuje biofilm na kamenech v řekách, ve sprchách, trupech lodí, kohoutcích apod.

Biofilm je nežádoucím jevem, pokrývá implantáty, katetry a kanyly, způsobuje chronické infekce a poškození tkání.^{71,73} Bakterie mezi sebou díky biofilmu lépe komunikují, předávají si genetické informace a mohou si tak vypěstovat velmi silnou rezistenci k antibiotikům, což představuje značný problém, protože tato společenstva jsou zodpovědná až za 80 % chorob.^{74,75} Navíc biofilm slouží jako bariéra pro průchod antibiotik, chrání před UV zářením, vysoušením, extrémním pH. Bakterie také lépe odolávají imunitnímu systému než planktonní forma.⁷⁶⁻⁷⁸

Malé AgNP však EPM nezachytí a mohou pronikat skrz tlustou vrstvu biofilmu a zničit až 98 % biofilmu.⁷⁹ Destrukce biofilmu a inhibice jeho tvorby byla prokázána u mnoha druhů bakterií.⁸⁰ Expozice AgNP vede k redukci mikrobiální biomasy a přežití buněk a také inhibuje produkci proteinů a exopolysacharidů.^{81,82} AgNP jsou např. schopny výrazně ničit biofilm tvořený bakteriemi rodu *Acinetobacter* a inhibovat jeho tvorbu, což je významný nozokomiální patogen způsobující kožní infekce, infekce močové a dýchací soustavy, krevního oběhu atd.⁸³

Kontaktní čočky bývají infikovány bakteriemi, které na povrchu čočky tvoří biofilm, a jejich častější užívání pak může způsobit zánět rohovky. *P. aeruginosa* a *Staphylococcus epidermidis* jsou známými původci této choroby. Biofilm prodlužuje dobu kontaktu bakterie s okem a bakterie v biofilmu jsou odolnější vůči dezinfekci. Před příchodem antibiotik se na infekce očí používal roztok AgNO₃, který je však náchylný ke komplexaci, a tak se snadno inaktivuje. Stříbro ve formě nanočástic by tento problém mohlo vyřešit, pokud bude dávkováno v množstvích, která nejsou toxická pro člověka. Studie ukázala, že AgNP jsou schopny zničit až 95 % biofilmu tvořeného těmito dvěma bakteriemi.^{41,81}

2.2 Antifungální aktivita

Houby jsou původci závažných onemocnění (např. aspergilóza, kandidóza, kryptokokóza nebo histoplazmóza) a mají za následek miliony úmrtí ročně.⁸⁴ Rozmáhají se onemocnění kůže způsobené kvasinkami rodu *Candida* a dermatofyty, které se živí keratinem a napadají nehty, oči, vlasy a kůži, např. rod *Trichophyton*.⁸⁵ Jsou zodpovědné za

řadu vážných nemocí, zejména u osob s poruchami imunitního systému, prodlužují dobu pobytu v nemocnici a zvyšují riziko úmrtí pacientů.

V domech s nedostatečným odvětráváním, topením a slabým světlem se daří plísním. Přítomnost alergenů, antigenů a mykotoxinů může způsobit astma, alergické reakce, kožní a dýchací obtíže apod. Dlouhodobá expozice plísním může také ovlivnit nervovou a oběhovou soustavu nebo způsobit rakovinu. Příkladem může být často se vyskytující houba *Aspergillus fumigatus* kolonizující dolní dýchací cesty a způsobující alergickou bronchopulmonální aspergilózu, která vede k destrukci plicní tkáně nebo *Penicillium brevicompactum* produkující alergeny, které mohou způsobit hypersenzitivní pneumonitidu. AgNP se proto začínají používat i ve stavebních materiálech. Ze zvířecích patogenů, proti kterým jsou účinné AgNP, stojí za zmínku např. *Mortierella* spp. způsobující potrat u krav, zápal plic a systémovou mykózu, podráždění kůže, alergie atd.^{86,87}

Na antifungální přípravky si houby snadno vytváří rezistenci, např. u některých druhů rodu *Candida* začala vzrůstat rezistence k flukonazolu, jednomu z nejčastěji používaných antimykotik nebo k nejnovější skupině antimykotik – echynokandinům.^{88,89}

Jak dokazuje mnoho publikací, AgNP jsou velmi účinným antimykotikem proti řadě druhů hub napadajících živočichy i rostliny.⁹⁰⁻⁹³ V práci Panáčka a kol. AgNP projevily vysokou antimykotickou aktivitu vůči *Candida* spp. v koncentracích srovnatelných s běžnými fungicidy a na rozdíl od iontového stříbra nevykazovaly žádnou cytotoxicitu k lidským fibroplastům. Po stabilizaci AgNP se jejich MIC ještě snížily. AgNP stabilizované SDS (dodecyl sulfát sodný) dokonce inhibovaly *C. albicans* již v koncentracích 0,05 mg/l.³⁴ Gajbhiye et al. publikovali zvýšený účinek flukonazolu po kombinaci s AgNP proti *P. glomerata*, *Phoma herbarum*, *Fusarium semitectum*, *Trichoderma* sp. a *Candida albicans* pomocí diskové difuzní metody.⁹⁴ Kim a kol. nabízí jako možný mechanismus antifungální aktivity destrukci integrity membrány a inhibici dělení *C. albicans*.^{95,96}

Na rostlinách parazituje celá řada hub způsobujících jejich poškození a ekonomické ztráty a některé z nich produkují mykotoxiny, nebezpečné pro zdraví zvířat a lidí. Jedna z potenciálních aplikací AgNP je ošetření houbových nemocí zemědělských a jiných rostlin jako náhrada nebezpečných fungicidů.^{96,97}

2.3 Antivirální aktivita

I přes bohaté možnosti léčby virálních onemocnění, mají viry stále na svědomí nejvíce onemocnění a úmrtí na světě. Neustále se objevují nová virální onemocnění nebo viry mění hostitele, např. SARS (syndrom náhlého selhání dýchání) nebo ptačí chřipka.⁹⁸

Ideální antivirotikum by mělo být širokospektrální, aby mohlo být použito jako první pomoc při nepředvídatelných epidemiích. AgNP jsou jednou z možností léčby virálních nemocí díky jejich antivirální aktivitě a předpokládané nižší pravděpodobnosti vývoje rezistence. Účinek AgNP byl prokázán proti mnoha virům bez ohledu na druh. Výrazná antivirální aktivita byla potvrzena *in vitro* proti takovým virům jako je virus HIV, hepatitidy B, HSV (herpes simplex virus) a chřipkový virus H1N1 a také proti virům napadajícím rostliny, viru horečky dengue apod.^{36,99–103} AgNP jsou navíc toxické vůči primárnímu vektoru horečky dengue komáru *Aedes aegypti*.³⁶ Na komáry a moskyty se běžně používají organofosfáty a regulátory růstu hmyzu, tyto chemikálie však mají nepříznivý dopad na zdraví a životní prostředí a komáři si na tyto chemikálie budují rezistenci.

Účinek AgNP vůči virům, podobně jako účinek antibakteriální, závisí na jejich velikosti, zeta potenciálu a povrchové modifikaci.^{104,105} Menší AgNP jsou aktivnější než větší částice a při správně zvolené koncentraci a velikosti jsou AgNP schopny likvidovat virus bez zjevné toxicity vůči infikovaným buňkám.^{106,107} Stabilizační činidla mají také vliv na antivirotický účinek AgNP. V práci Speshock a kol. polysacharidy použité jako stabilizační činidlo chránily buňky proti toxickým účinkům AgNP, ale zároveň se snížila aktivita proti TCRV (virus Tacaribe).¹⁰⁷

Mechanismus antivirální aktivity není zcela znám. Nejpozorovanějším mechanismem, kterým mohou AgNP inhibovat viry, je navázání viru na AgNP a zablokování interakce viru s buňkou.¹⁰⁴ U viru HIV bylo pozorováno, že se transmembránový glykoprotein 120 váže na AgNP a tím je zabráněno navázání na receptor hostitelské buňky CD4.¹⁰¹ Podobně u chřipkového viru bylo pozorováno, že AgNP interagují s disulfidovými vazbami glykoproteinů na povrchu viru a inhibují tak adsorpci viru na buňky.¹⁰⁰ V další studii se AgNP modifikované merkaptoethan sulfonátem kompetovaly s virem HSV o navázání na heparansulfát na povrchu buňky.¹⁰⁸ Uvnitř buňky jsou pak AgNP schopny inhibovat reverzní transkripci přímým navázáním na molekuly RNA nebo DNA, jak se ukázalo u viru HIV nebo HBV nebo interferovat s RNA polymerázou.^{101,102,107}

3. Použití AgNP

3.1 Analytické aplikace a katalýza

Nanočástice ušlechtilých kovů vykazují specifickou absorpci v UV/Vis oblasti záření, která se v makroskopické formě nevyskytuje. Pokud je frekvence dopadajícího záření v rezonanci s kolektivní oscilací vodivostních elektronů (povrchového plazmonu), dojde k rezonančnímu předání energie záření plazmonu, což se projeví absorpčním píkem ve spektru.⁷ Trojhranné nanočástice stříbra se díky těmto zajímavým optickým vlastnostem a citlivostí vůči okolí např. dají využít jako optické biosenzory.¹⁰⁹ Vlnová délka píku plazmonové rezonance závisí na velikost nanočástic, jejich tvaru a vlastnostech okolního prostředí. Analyt v blízkosti stříbrných nanočástic způsobí malou změnu indexu lomu, což se projeví posunem absorpčního maxima – SPR senzory.¹¹⁰

Významné postavení zaujímá koloidní stříbro ve spektroskopických metodách – SERS a SERRS (povrchem zesílený rezonanční Ramanův rozptyl). Tyto techniky umožňují detekovat v některých případech až femtomolární koncentrace analytu v roztoku s vysokou citlivostí a specifitou.¹¹¹ Nanočástice ušlechtilých kovů, především stříbra, zesilují neelasticky rozptýlené záření (Ramanův rozptyl). Když dopadne viditelné záření na povrch nanočástice, dojde k rezonanci lokalizovaných povrchových plazmonů a ke vzniku silného elektromagnetického pole. Analyt adsorbovaný na koloidní částici zvýší svůj indukovaný dipól a tím i intenzitu emitovaného záření. V současnosti lze detekovat i jedinou molekulu.¹¹²

Nanočástice stříbra se dají dobře uplatnit v oblasti heterogenní katalýzy. Díky svému obrovskému povrchu vůči objemu jsou efektivnějšími katalyzátory než stejné množství makroskopického materiálu. Katalytickou aktivitu AgNP ovlivňuje jejich tvar, struktura povrchu a velikost.^{12,113} Také platí, že rostoucí částice jsou lepšími katalyzátory než stabilní koloidní částice.¹¹⁴ AgNP se většinou používají jako redukční činidla, ale uplatňují se i v katalýze oxidací.^{113,115} Katalýza za účasti AgNP se často studuje na několika modelových reakcích, např. redukce rhodaminu 6G,¹¹⁶ redukce metylenové modři¹² nebo redukce p-nitrofenolu tetrahydridoboritanem sodným na p-aminofenol.¹¹⁷ Reakce se dá studovat UV/Vis spektrofotometrií, protože p-nitrofenol v alkalickém prostředí absorbuje při 400 nm a vznikající p-aminofenol při 300 nm. Typickým příkladem katalytické oxidace katalyzované AgNP je oxidace etylenu na etylenoxid.¹¹⁸

3.2 Využití biologických vlastností

Biologických vlastností stříbra se využívá v mnoha aplikacích, kde je potřeba zajistit sterilní prostředí. Současné výkumy podporují myšlenku využití AgNP v medicíně při léčbě popálenin a k povrchové úpravě nástrojů nebo kontaktních čoček.^{119–121} Dosud používané nástroje pokryté iontovým stříbrem nemají tak vysokou antibakteriální aktivitu, která se navíc s časem snižuje. V jednom případě byl dokonce zaznamenán výrazně vyšší výskyt stafylokokální infekce na katetru pokrytém oxidem stříbra než v kontrolní skupině. Důvodem mohla být inaktivace stříbra po kontaktu s krevní plazmou.¹²² Při použití nanočástic stříbra se však antibakteriální aktivita zvedá, neboť iontové stříbro uvolňuje postupně.¹¹⁹ AgNP se také osvědčily jako součást chirurgických roušek, aniž by došlo k iritaci kůže dobrovolníků.¹²³ Také zabraňují koagulaci krve, což je předurčuje pro další klinické aplikace.¹²⁴ AgNP byly také studovány pro cílenou distribuci léčiv.¹²⁵

V současnosti se rozmáhá vývoj textilních materiálů s antibakteriální složkou, přičemž se dají využít různé materiály např. bavlna, polyester, nylon nebo hedvábí.^{126,127} Tyto textilie pak mohou být využity pro výrobu funkčního oblečení, jako sterilní krytí při léčbě popálenin nebo různých nfekcí, na elektromagnetické stínění nebo jako membrány do filtrů na čištění vody.^{128,129} AgNP se dají snadno na textilie deponovat sonochemicky, redukcí iontů stříbra ethanolem nebo isopropanolem nebo depozicí vrstev s asistencí iontového svazku.^{126,130} AgNP se staly velmi populárními v různých spotřebitelských produktech, ať už v tekuté formě nebo suspendované v pevné fázi (mýdla, zubní pasty, pračky, opalovací krémy, oblečení, nádoby na potraviny).^{1,131} Myšlenkou je, že AgNP slouží jako zásobník iontů stříbra, které se sa časem postupně uvolňují. Potenciálně by se daly AgNP využít jako levný akaracid a insekticid.^{36,132} Byly také studovány pro jejich použití v čističkách odpadních vod a úspěšně byly inkorporovány do keramických filtrů jako bariéra pro patogeny ve vodě, což by mohlo najít využití v rozvojových zemích.^{133,134}

AgNP jsou také studovány pro jejich využití v léčbě rakoviny. Přes pokrok moderních metod léčby zůstává rakovina jedním z největších problémů současné medicíny. Preklinické studie ukazují, že AgNP jsou cytotoxické pro řadu nádorových buněčných linií – rakoviny prsu, děložního čípku, jater, plic, krve, tlustého střeva apod.^{135–138} AgNP mají schopnost poškozovat DNA a způsobovat oxidativní stres v buňkách.^{57,59} Byla také pozorována schopnost AgNP zvyšovat účinek radioterapie. Jedinečné optické vlastnosti AgNP nabízí také možnost uplatnění v zobrazovacích metodách a diagnostice rakoviny.¹³⁹

Překážkou v použití AgNP pro terapeutické účely by mohla být jejich cytotoxicita vůči zdravým buňkám. Ukazuje se však, že rakovinné buňky mají k nim větší citlivost než buňky zdravé. AgNP zvyšují hladinu ROS a mají silnou afinitu k thiolovým skupinám. Navázáním AgNP na thiolové antioxidanty tak dále mohou zvyšovat oxidativní stres.¹⁴⁰ Rakovinné buňky mají pozměněný metabolismus a produkují více ROS, ale zároveň jsou chráněny před ROS zvýšeným glukózovým metabolismem, kdy vzniká NADPH, reduktant enzymů zapojených v detoxifikaci ROS. Inhibicí tohoto detoxifikačního mechanismu AgNP rakovinné buňky umírají na oxidativní stres.¹⁴¹

Některé rakovinné buňky nedisponují možnostmi opravy DNA, čehož se dá využít vzhledem k tomu, že AgNP DNA poškozuje. Např. buňky TNBC (triple negativní karcinom prsu) jsou zranitelnější než buňky jiných forem rakoviny prsu, což se týká poškození DNA, protože mají vadné opravné mechanismy. Swanner a kol. publikovali, že buňky TNBC jsou mnohem citlivější k cytotoxickému působení AgNP než buňky zdravé. AgNP v rakovinných buňkách způsobily větší poškození DNA a oxidativní stres a zároveň nebyla prokázána toxicita pro játra a ledviny. V přítomnosti AgNP se také zvýšil efekt radioterapie proti TNBC.¹⁴² Prabhu a kol. pozorovali, že AgNP potlačily proliferaci buněčné linie rakoviny tlustého střeva potlačením jejich růstu, uvězněním buněk ve fázi G0/G1, redukcí syntézy DNA a indukci apoptózy.¹⁴³ AgNP byly testovány i *in vivo* a výrazně zmenšily nádor a prodloužily délku života u myši.^{137,144} AgNP by také mohly sloužit jako prevence vzniku rakoviny kůže působením UVB záření, které způsobuje rakovinu kůže poškozením DNA.¹⁴⁵ Tato antirakovinová aktivita nanočástic také závisí na jejich velikosti, účinné byly pouze částice menší (10–40 nm), částice o velikosti 60 a 100 nm tuto aktivitu nevykazovaly.¹⁴⁶

4. Synergie antibiotik s AgNP

Rezistence bakterií k účinkům antibiotik je vážným problémem současné medicíny vzhledem k množství nemocí bakteriálního původu. Zmenšuje se rozsah možností léčby bakteriálních infekcí a vzrůstá hrozba epidemií způsobených multirezistentními a panrezistentními bakteriemi. Mohutná produkce antibiotik má také za následek jejich vysokou koncentraci v povrchových a podzemních vodách, v půdě a sedimentech.^{147,148} Snížení efektivity antibiotik se objevuje jak v humánní, tak ve veterinární medicíně, kde se antibiotika používají plošně k prevenci nemocí a v některých zemích také jako regulátory růstu.

Rezistence bakterií, co se týká zvířat, byla zaznamenána u komenzálních bakterií (např. *E. coli*), zoonotických enteropatogenů (např. *Salmonella* spp.) i čistě zvířecích patogenů (např. *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus* spp.).^{149–151} Jednou z možností, jak bojovat proti infekcím způsobenými rezistentními bakteriemi je kombinovaná terapie, kdy je antibiotikum posíleno jinou antimikrobiální nebo neantimikrobiální látkou. Tyto tzv. adjuvanty mohou být jiná antibiotika, neantibiotické látky (kardiovaskulární léčiva) nebo inhibitory rezistence (inhibitory beta-laktamázy, inhibice tvorby biofilmu).¹⁵² Jednou z možností, jak posílit účinek antibiotik a snížit tak jejich dávku, je jejich kombinace s AgNP.

AgNP mají antibakteriální účinky proti velkému množství humánních i zvířecích bakterií, a to dokonce proti vysoce rezistentním bakteriím jako je MRSA.^{2,3,153} Důležité je, že efektivní koncentrace AgNP jsou nízké ($\mu\text{g/l}$ – mg/l) a cytotoxicita se naopak projevuje až při vyšších koncentracích. Na lidech prozatím nebyly prokázány výrazné toxické účinky AgNP (viz kapitulu 6.3).

AgNP mohou usnadňovat antibiotiku interakci s bakterií několika způsoby. Např. mohou usnadnit vstup antibiotika do buňky tím, že mění permeabilitu membrány nebo mohou kooperovat při destrukci membrány. V případě beta-laktamových antibiotik by mohly AgNP inhibovat beta-laktamázy produkované rezistentními bakteriemi, které hydrolyticky štěpí beta-laktamový kruh antibiotik. Spolupráce na ničení buňky pak vede k její smrti. Hwang a kol. navrhli, že tato synergie je spojena s tvorbou hydroxylových radikálů, změnou ochranných funkcí buňky a antibiofilmovou aktivitou.¹⁵⁴ Proto se zdá být kombinace antibiotik s AgNP efektivnější pro zvyšování účinku antibiotik než kombinace s jinými adjuvanty používanými v klinické praxi. Díky kombinaci se zvyšuje efektivita podávaného antibiotika, snižuje se potřebná dávka antibiotika i AgNP a tím se snižuje jejich

toxicita vůči buňkám hostitelského organismu. Obnovuje se také schopnost antibiotika zabít bakterie, které k němu byly rezistentní.

Při studiu kombinovaného antibakteriálního účinku se často využívá disková difuzní metoda nebo tzv. checkerboard metoda, kdy se na mikrotitrační destičku dává antibakteriální látka o různých koncentracích v jednom směru a druhá antibakteriální látka o různých koncentracích v druhém směru. Vznikne tak „šachovnice“ s kombinacemi různých koncentrací. Jamky se dále naočkují bakterií a po inkubaci se vyhodnocuje růst a inhibice bakterií v jamkách. Podle hodnoty frakčního inhibičního koncentračního indexu (FIC) se konečný společný účinek hodnotí jako synergický ($FIC \leq 0,5$), indiferentní ($0,5 < FIC \leq 2$) nebo antagonistický ($FIC > 2$). Toto dělení není jednotné a někdy se z indiferentního účinku vyděluje ještě aditivní účinek ($0,5 < FIC \leq 1$) nebo se za antagonistický účinek považuje až $FIC > 4$.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ FIC se určuje podle vzorce (1)

$$FIC = \frac{\text{MIC A v kombinaci s B}}{\text{MIC A}} + \frac{\text{MIC B v kombinaci s A}}{\text{MIC B}}, \quad (1)$$

kde A a B jsou antibakteriální látky.

Antibiotika jsou v kombinaci s AgNP jednoznačně efektivnější bez ohledu na mechanismus účinku a chemickou strukturu antibiotika.^{26,154,158-160} Synergický účinek se projevuje u Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií. Mechanismus společného účinku není známý a pro různé skupiny antibiotik a různé bakterie bude rozdílný. Vliv na odezvu bakterie na kombinovaný účinek AgNP a antibiotika bude mít rovněž i charakteristika AgNP. V roce 2005 Li a kol. pozorovali zvýšenou aktivitu amoxicillinu vůči *E. coli* po aplikaci společně s AgNP a navrhli mechanismus tohoto společného působení.¹⁵⁸ Amoxicillin obsahuje funkční skupiny, např. aminoskupiny a může snadno tvořit vazby s AgNP. Molekuly amoxicillinu by se mohly navázat na povrch nanočástice, která tvoří jádro. Zvýšila by se tak lokální koncentrace antibiotika v jednom bodě na povrchu buňky. AgNP také mohou usnadňovat transport amoxicillinu k povrchu bakterie. Amoxicillin je hydrofilní, avšak membrána buňky je tvořena hydrofobními fosfolipidy a glykoproteiny. Naopak AgNP se díky vysoké povrchové energii mohou k membráně přiblížit. Hwang a kol. v roce 2012 pozorovali synergický účinek chloramphenicolu, kanamycinu a ampicillinu a AgNP vůči několika Gram-pozitivním a Gram-negativním lidským bakteriím. Kombinace AgNP s antibiotiky také inhibovala tvorbu biofilmu. Zaznamenali, že zvýšená permeabilita membrány není pro synergický účinek důležitá, naopak metabolismus spojený s ATP ano. Na ATP jsou závislé pumpy v periplazmatické membráně, které vylučují toxické látky

z buňky a jsou jedním z hlavních mechanismů bakteriální rezistence. Jako mechanismus společného účinku pak navrhli tvorbu ROS.¹⁵⁴ Deng a kol. v roce 2016 testovali synergii AgNP s antibiotiky ze 4 různých tříd (beta-laktamová antibiotika, chinolon, aminoglykosidy, tetracyklin) proti multirezistentní *Salmonella typhimurium*. Pouze beta-laktamová antibiotika projevila jen aditivní účinek, ostatní antibiotika projevila účinek synergický a spektroskopicky se prokázalo, že tato antibiotika tvoří s AgNP komplexy. U tetracyklinu, který jako jediný nezpůsobil ve vyšších koncentracích agregaci AgNP, a byl tedy použit ke studiu navázání AgNP k buňce, se ukázalo, že komplex tetracyklin-AgNP interaguje s buňkami silněji a ve větší míře se uvolňují ionty stříbra. Dočasně se tak vytvoří vysoká lokální koncentrace iontů stříbra a inhibuje se tak růst bakterie.¹⁶¹

Spolupráce může být i opačná, kdy antibiotikum usnadňuje uplatnění toxicity AgNP. Genatimicin dramaticky podporuje rozpouštění PVP-AgNP (PVP – polyvinylpyrrolidon), což zvyšuje lokální koncentraci iontů stříbra a usnadňuje přichycení PVP-AgNP k povrchu bakterie testované *E. coli* a *S. aureus* posunem náboje k méně záporným hodnotám.¹⁶²

Zesílený účinek 15 komerčních antibiotik v kombinaci s AgNP byl také pozorován proti houbám. AgNP syntetizované pomocí redukce stříbrných iontů extraktem z aksamitníku (*Tagetes erecta*) o velikosti 10 až 90 nm inhibovaly kvasinky (*Candida glabrata*, *C. albicans*) a Gram-negativní bakterie (*Cryptococcae neoformans*), zatímco proti Gram-pozitivním bakteriím (*S. aureus* and *Bacillus cereus*) byl efekt minimální.¹⁶³ AgNP biosyntetizované pomocí houby *Alternaria alternata* zvýšily účinek flukonazolu proti *P. glomerata*, *P. herbarum*, *F. semitectum*, *Trichoderma* sp. a *C. albicans*.⁹⁴

Bylo publikováno několik prací, které ukazují, že AgNP lze použít v kombinaci s jinými adjuvanty a výrazně tak posílit jejich antibakteriální účinek. Například kombinací AgNP s N-acetyl cysteinem bylo dosaženo výrazné redukce MIC u všech testovaných mikroorganismů (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* a *C. albicans*) s hodnotami FIC < 0,5. Snímky z TEM odhalily poškozenou buněčnou stěnu bakterií a kvasinky. AgNP také inhibovaly aktivitu dehydrogenázy dýchacího řetězce. Testování vlivu AgNP na lidské buňky HepG2 neodhalilo žádnou cytotoxicitu v koncentraci rovné MIC a jen slabou cytotoxicitu v koncentracích vyšších. V kombinaci s NAC dokonce cytotoxicita klesla.¹⁶⁴ Potara a kol. zkoumali antimikrobiální aktivitu AgNP s povrchovou vrstvou chitosanu. Tato kombinace působila proti dvěma kmenům *S. aureus* synergicky a MIC byly přibližně desetkrát nižší než při použití AgNP a chitosanu zvlášť.¹⁶⁵ V jiné publikaci myramistin použitý jako povrchový modifikátor AgNP až dvacetkrát zvýšil jejich aktivitu proti *E. coli*.¹⁶⁶ Kombinace hydrogelu obsahujícího laktoferin a xylitol s komerčně dostupným

krytím na rány s obsahem stříbra působila synergicky proti biofilmům bakterií MRSA a *P. aeruginosa*.¹⁶⁷ Antimikrobiální peptidopolymyxin B a gramicidin S, které permeabilizují membránu bakterií, také projevily synergické působení s AgNP proti různým Gram-negativním bakteriím.¹⁶⁸

Je známo, že antibakteriální aktivita AgNP je závislá na jejich velikosti, tvaru a povrchové modifikaci (viz kapitolu 2.1). Pokud tyto tři parametry ovlivňují antibakteriální aktivitu, budou taky ovlivňovat synergický efekt AgNP s antibiotiky. Role velikosti na synergní účinek AgNP kombinovaného s antibiotiky byla popsána v publikacích Habash a kol. a Kareem a kol. Habash a kol. testovali synergii a vyhodnocovali FIC pro 10nm a 20nm AgNP s aztreonamem u *P. aeruginosa*. Větší částice 40nm, 60nm a 100nm žádnou interakci po kombinaci s antibiotikem neprojevily.¹⁶⁹ Kareem a kol. také zaznamenali lepší synergický účinek 10nm AgNP než 20nm v kombinaci s různými druhy antibiotik proti *S. aureus*.¹⁷⁰ Vliv stabilizačních činidel jako je citrát, SDS a PVP na synergii AgNP a antibiotik přinesla studie Kora a kol.¹⁷¹ Synergický účinek se projevil u všech stabilizovaných AgNP v kombinaci se streptomycinem, ampicilinem a tetracyklinem proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím. Kombinovaný účinek byl významější u AgNP stabilizovaných PVP než u AgNP stabilizovaných SDS nebo citrátem. Studie hodnotící vliv tvaru AgNP na synergii ještě nebyla publikována, avšak dá se předpokládat, že na základě rozdílných antibakteriálních vlastností různě tvarovaných AgNP bude i synergický účinek jinak výrazný.

5. Rezistence k AgNP

Aplikace AgNP v medicíně a zdravotnictví je v popředí zájmu kvůli stále se rozšiřující rezistenci bakterií k běžným antibiotikům, což stěžuje léčbu bakteriálních infekcí. AgNP se svými silnými antibakteriálními účinky, nízkou cytotoxicitou a schopností zvyšovat účinek konvenčních antibiotik (viz kapitolu 4 a 6) se zdají být ideální náhradou za antibiotika nebo jejich doplňkem. Zatím se nedá říci, zda by AgNP mohly být používány v medicíně k posilování efektivity antibiotik nebo je dokonce zcela nahradit. Nicméně logickou otázkou však je, zda a jak snadno se u bakterií může vyvinout rezistence k AgNP a jak takové rezistenci předcházet.

Mikroorganismy rezistentní k antibiotikům i k těžkým kovům se běžně ve vodách v přírodě vyskytují. Vysoký výskyt bakterií rezistentních k antibiotikům v přírodních vodách je spojen s hojným používáním antibiotik. Přítomnost velkého množství rezistentních bakterií v přírodě je rizikem pro veřejné zdraví. Příkladem může být bakterie *P. aereginosa*, častý původce nosokomiálních infekcí. Tato bakterie rezistentní k antibiotikům i těžkým kovům byla detekována v přírodních vodách znečištěných splaškovými vodami.¹⁷²

Bakteriální rezistence může být přirozená nebo získaná. Bakterie získávají rezistenci mutacemi nebo osvojením různých typů genetického materiálu od jiných bakterií např. ve formě plazmidů nebo transpozonů. Přirozená rezistence je fenotyp bakterie před použitím antimikrobiálního agens, tedy je to přirozená vlastnost mikroorganismu. Rezistenci lze získat mnoha mechanismy, např. změnou kompozice a permeability buněčné stěny, která funguje jako bariéra pro příjem různých látek, nebo syntézou enzymů, které dané látky degradují. Biocidy jako např. stříbro mají za cíl řadu míst na povrchu bakteriální buňky nebo uvnitř a jsou tedy širokospektrální. Naopak antibiotika cílí na specifickou vlastnost buňky a mají spektrum užší. Rezistence k biocidům může být získána mutacemi normálních buněčných genů, plazmidů nebo transpozonů.

Obecně bakterie využívají mnoho způsobů, jak se zbavit těžkých kovů, ať už pasivních nebo aktivních. Využívají EPS (extracelulární polymerní látky), které komplexují kovy a chrání je tak před nadměrným stresem způsobeným kovy.^{173,174} Vnější membrána se zapojuje do obrany produkcí enzymů, které oxidují kovy, a produkcí vnějších membránových vezikulů, které kovy vylučují.^{175,176} U Gram-negativních bakterií byly popsány periplazmatické redoxní enzymy a proteiny vázající kovy.^{177,178} Peptidoglykan v buněčné stěně je schopen kovy komplexovat.¹⁷⁹ Kovy by mohly také být přímo oxidovány

nebo redukovány enzymy elektronového transportního řetězce, což by mohlo vést ke tvorbě minerálů v cytoplazmě jako např. u rozpustných sloučenin telluru.¹⁸⁰ Modifikací transportních systémů v cytoplazmatické membráně mohou bakterie předcházet průniku částic kovů do buňky.¹⁸¹ ATPázové transportéry zajišťují přenos kovů přes membrány.¹⁸² Qin a kol. popisují rezistenci bakterie k As^{3+} pomocí metylace S-adenosylmethionin methyltransferázou za vzniku těkavého trimethylarsinu.¹⁸³ Některé bakterie jsou schopny akumulovat kovy v cytoplazmě ve formě minerálů jako je magnetit, sulfid železnatý apod.^{184,185} Existují také nepřímé mechanismy, které napravují škody způsobené kovy – bakteriální kmeny exponované toxickým dávkám kovů up-regulují geny související s eliminací ROS, reparace DNA a hydrolýze abnormálně složených proteinů.^{186–188}

V přírodě jsou mikroorganismy vystaveny zvyšující se koncentrací stříbra. Významnými zdroji stříbra jsou vody znečišťované lidmi např. z čistíček odpadních vod nemocnic, továren a důlní vody. Rozsáhlé využívání AgNP ve spotřebitelské sféře také vede ke zvyšování množství stříbra v životním prostředí. Sedimenty se mohou stát sekundárním zdrojem stříbra v moři.¹⁸⁹ Používání kalů jako hnojiv může také vést k rozšíření stříbra do životního prostředí.¹⁹⁰ Determinanty rezistence ke stříbru jsou velmi rozšířené a díky jejich lokalizaci na mobilních genetických elementech se usnadňuje horizontální přenos uvnitř ekosystému, což může dále vést k rozšíření nových fenotypů mezi bakteriální populací.^{191,192} Tato fakta zdůrazňují nutnost eliminovat uvolňování stříbra do životního prostředí a zabránit tak rozšiřování rezistence ke stříbru mezi klinicky významné mikroorganismy.

Na téma rezistence ke stříbru v nanočásticové formě bylo publikováno velmi málo prací. Bakteriální rezistence byla zkoumána především u iontového stříbra. Mechanismem takovéto rezistence může být eliminace iontů stříbra na méně toxické nižší oxidační stavy, nicméně více se uplatňuje aktivní eflux iontů stříbra z buňky.^{193–197} Společně s aktivním efluxem hraje výraznou roli v rezistenci k iontům stříbra snížená permeabilita membrány.¹⁹⁸

Bakterie rezistentní ke stříbru byla poprvé izolována v roce 1960 z popáleniny, která byla ošetřována dusičnanem stříbrným.¹⁹⁹ Mechanismus rezistence ke stříbru byl poprvé popsán u Gram-negativní bakterie *Salmonella enterica* sérovar Typhymurim u pacienta s popáleninami v roce 1975. Doměným modelem této rezistence kódované na plazmidu pMG101 je transport přes ATPázu SilP, efluxní systém SilCFBA a periplazmatický chaperon pro přenos stříbra SilE.^{200,201} Asiani a kol. popisují, že SilE mění svoji konformaci v přítomnosti stříbra, funguje jako molekulární houba a jako první obrana proti stříbru, které začíná pronikat do periplazmy.²⁰² Od té doby byly bakterie rezistentní na stříbro izolovány z klinického prostředí opakovaně. Příklady bakterií rezistentních ke stříbru zahrnují *E. coli*,

Enterobacter cloacae, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *S. typhimurium* a *Pseudomonas stutzeri* atd.^{194,196,203} V přírodě se také běžně nachází přirozeně mikroorganismy rezistentní ke stříbru, např. *P. stutzeri* nalezená ve stříbrných dolech v Utahu a *K. pneumoniae* izolovaná z krevet na pobřeží Indie.^{204,205}

Ohledně rezistence, popř. tolerance ke stříbru v nanočásticové formě bylo dosud publikováno nepatrné množství prací.

Gunawan a kol. studovali odezvu *Bacillus* sp. na dlouhodobou a opakovanou expozici nanočástic oxidu stříbra v matrici TiO₂. Pozorovali vznik rezistence u bakterie *Bacillus subtilis*, která po dlouhodobé expozici stříbru začala dominovat v populaci mikrobiot. Ukázali, že *B. subtilis* má přirozenou schopnost adaptovat se na oxidativní stres způsobený iontovým stříbrem uvolněným z kompozitu.²⁰⁶

Khan a kol. objevili, že *Bacillus pumilus* izolovaný z odpadních vod měl stejnou růstovou křivku v přítomnosti i nepřítomnosti AgNP. Ukázalo se, že mechanismus tolerance této bakterie k AgNP je nadměrná produkce exopolysacharidů, které obalí nanočástici a znemožní tak její interakci s buněčnou stěnou bakterie.²⁰⁷

U bakterie *E. coli* K-12 MG1655 byla rezistence vyvolána opakovanou expozicí AgNP. Po 225 opakováních projevila exponovaná populace větší viabilitu než kontrolní skupina v přítomnosti různých koncentrací AgNO₃ a 10nm AgNP modifikovaných citrátem. Genomickou analýzou autoři odhalili, že změny spojené s rezistencí se započaly již ve stém kroku.²⁰⁸

V přítomnosti iontového stříbra, ale i AgNP došlo u bakterie *Salmonella Senftenberg* k expresi determinantu plazmidové rezistence založené na energeticky dependentním efluxu z buňky membránovými proteiny.²⁰⁹

6. Toxicita Ag

6.1 Cytotoxicita

Hlavními faktory, které způsobují cytotoxicitu AgNP, jsou vznik ROS a uvolňování iontů stříbra, které právě vznik ROS katalyzují v přítomnosti různých forem kyslíku. AgNP jsou nejprve rozpoznány membránovými receptory, následně jsou internalizovány, translokovány a nakonec buď degradují, jsou akumulovány nebo je buňka eliminuje. AgNP a uvolněné stříbrné ionty interagují především s thiolovými skupinami molekul v cytoplazmě, buněčné membráně a membráně mitochondrií a dostávají se do jádra, kde poškozují DNA. Internalizované AgNP produkují ROS a způsobují oxidativní stres a dochází tak k silnému poškození buněčných membrán a organel, což má za následek apoptózu nebo nekrózu. Oxidativní stres spouští zánětlivé odpovědi, jako je aktivace vrozené imunity a zvýšená permeabilita endoteliálních buněk. Dochází k poškození DNA a aberaci chromozomů. Na reakci exponovaných buněk má vliv mnoho faktorů jako velikost, tvar, povrchová úprava AgNP.^{210,211}

Stříbro není klasifikováno jako karcinogen. Nebylo publikováno, že by stříbro způsobovalo rakovinu u zvířat nebo lidí. Kawata a kol. však pozorovali up-regulaci exprese genů opravy DNA rakovinných buněk v buněčné linii lidského hepatomu HepG2 při chronické expozice AgNP v nízkých netoxických dávkách.²¹²

Cytotoxicita závisí na čase, dávce, teplotě, velikosti a tvaru částic a jejich povrchové úpravě a typu exponovaných buněk.^{210,213} Malé AgNP mají větší plochu povrchu, jsou aktivnější, snáze se rozpouští a katalyzují vznik ROS. Navíc lépe pronikají do buňky a skrze biologické bariéry. Na mnoha druzích lidských tkání byla pozorována závislost buněčných aktivit a toxikologických parametrů na velikosti částic, např. membránová integrita, úroveň ROS, průnik částic do buněk, EC₅₀ (koncentrace látky, která způsobí určitý efekt u 50 % testovaných organismů) apod. Stejně tak povrchová modifikace částic ovlivňuje jejich interakci s buňkami, protože výrazně částice stabilizuje proti agregaci. Také tvar částic ovlivňuje interakci s buňkami, např. nanočástice tyčkového tvaru spíše interagují přímo s povrchem, ale špatně se internalizují. Na typu buněk také závisí odezva. Např. expozice fibroplastů (NIH3T3) AgNP měla za následek expresi ROS a c-Jun N-terminálních kináz, které aktivují apoptózu mitochondrií. Zatímco buňky tlustého střeva (HCT116) nebyly tak náchylné na vliv AgNP, protože mohou aktivovat expresi antiapoptózního proteinu bcl-2.²¹⁴ V další studii byla pozorovaná genotoxicita AgNP modifikovaných škrobem u fibroplastů a

glioblastomů. U obou typů buněk indukovaly AgNP disfunkci mitochondrií a zvýšily úroveň ROS, způsobily poškození DNA a aberaci chromozomů a pozastavení buněčného cyklu. Nicméně fibroplasty snáze odolávají vlivu AgNP, protože se mohou dostat z arestu buněčného cyklu.²¹⁵ Luther a kol. ukázali, že ačkoliv se AgNP více akumulují v astrocytech než v buňkách rakoviny plic, jsou méně toxické, neboť uvolňují méně iontů stříbra.²¹⁶

Za účelem porovnání cytotoxicity AgNP a iontového stříbra se testoval jejich vliv na životaschopnost lidských kožních fibroblastů a lidských epidermálních keratinocytů. Kromě toho se zkoumaly zánětlivé odpovědi a poškození DNA. Výsledky ukázaly, že iontové stříbro bylo výrazně toxičtější než AgNP. AgNP a iontové stříbro v necytotoxické koncentraci nepoškozovaly DNA a neovlivnily hladinu zánětlivých markerů kromě zvýšení hladiny interleukinu 6 u fibroblastů s iontovým stříbrem. AgNP jsou jednoznačně vhodnější pro lokální ošetření ran až do koncentrace 25 mg/l.^a

6.2 *In vivo* toxicita AgNP u zvířat

Rahman a kol. zkoumali vliv AgNP (25 nm) podaných intraperitoneálně na genovou expresi v různých místech mozku myši. Autoři došli k závěru, že neurotoxicita AgNP je způsobena oxidačním stresem a změnami v genové expresi vedoucí k apoptóze.²¹⁷ Intravenózní podání AgNP také působí na orgány toxicky tvorbou ROS, které působí ztrátu spojení endotelových buněk. Průnik AgNP z cév přes poškozenou endotelovou bariéru, jim umožňuje hromadit se v orgánech a pak způsobovat jejich záněty – záněty jater, plic a ledvin.²¹⁸

Při orálním podání AgNP dochází v závislosti na dávce ke smrti, ztrátě váhy, hypoaktivitě, změnám hladiny neurotransmiterů, změnám jaterních enzymů a krevních hodnot, zvětšení srdce a imunologickým efektům.²¹⁹ Při zkoumání vlivu AgNP na reprodukci a vývoj bylo zjištěno, že AgNP se při orálním podání akumulovaly ve varlatech a jsou toxické pro spermie a u samic pro vajíčka a také plod. Orální podání AgNP samici myši v raném stádiu těhotenství způsobilo zpožděný fyzický vývoj potomků a zhoršené kognitivní chování. AgNP po injekci byly detekovány v placentě, mateřském mléce a potomcích.²²⁰ Inhalované AgNP byly detekovány až v placentě a způsobily zvýšenou resorpci zárodků spojenou se sníženou hladinou estrogenu matky.²²¹ Při vystavení poškozené kůže krysy nebylo nalezeno poškození jater a AgNP neměly vliv na biochemii

^a Výsledky publikovány v: Galandáková, A., Franková, J., Ambrožová, N., Habartová, K., Pivodová, V., Zálešák, B., Šafářová, K., Smékalová, M. a Ulrichová, J. Effects of silver nanoparticles on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Human and Experimental Toxicology* 35(9), 946–957 (2016).

krve. Zjistilo se, že uvolněné iontové stříbro z AgNP může pronikat skrz kůži pouze, když je poškozená epidermální bariéra, ale nezpůsobuje žádnou akutní toxicitu.²²²

Park a kol. určili LOAEL (nejnižší dávka nebo expoziční koncentrace látky, při které je ještě pozorován statisticky významný nepříznivý účinek na organismus v porovnání s kontrolní skupinou) vztažený ke zvýšené úrovni koncentrace cytokininů na 0,5 mg/kg hmotnosti za den u myši po 28denní orální expozici AgNP.²²³ Při akutním testu toxicity Kim a kol. pozorovali pouze slabé poškození jater u krys vystavených vysoké koncentraci AgNP více než 300 mg/kg.²²⁴ Testy dermální toxicity ukázaly, že expozice více než 0,1 mg/kg AgNP měla za následek mírné poškození sleziny, jater a kůže u morčete.²²⁵ Tang a kol. zkoumali distribuci a toxicitu AgNP u krys podávaných podkožní injekcí v koncentraci 62,8 mg/kg.²²⁶ AgNP se krví dostaly do ledvin, jater, sleziny, mozku a plic. Navíc způsobily poškození hematoencefalické bariéry a neuronální degeneraci.²²⁷

6.3 Vliv AgNP na člověka

Do lidského těla se AgNP mohou dostat několika způsoby, např. kůží, orálně, inhalací, krví. Primární cestou expozice člověka stříbrem je jeho příjem s potravou. Vzhledem k obrovskému množství výrobků obsahujících AgNP je expozice stříbru mnohem větší, než bylo dříve běžné. Munger et al. provedl studii na lidech, kteří byli exponováni orálně AgNP o koncentraci 10 ppm po dobu 3, 7 a 14 dní a AgNP o koncentraci 32 ppm po dobu 14 dní. Nebyly zjištěny žádné významné metabolické, hematologické, urinální nálezy, žádné morfologické změny srdce, plic nebo abdominálních orgánů.²²⁸

Sledování pracovníků v továrně, kteří pracují s AgNP a jsou vystaveni nízkým dávkám stříbrného prachu a rozpuštěného stříbra v mezních hraničních hodnotách, neukázalo žádný negativní dopad na jejich zdraví.²²⁹

Nízká toxicita u lidí může být zapříčiněna tím, že tělní tekutiny obsahují velké množství chloridových a sulfidových iontů, které se stříbrnými ionty tvoří nerozpustné soli.²³⁰

Při testování dermální toxicity výrobku Acticoat obsahem AgNP určeného ke sterilnímu krytí ran nebyly u 30 pacientů prokázány žádné biochemické nebo hematologické indikátory toxicity.²³¹

6.4 Toxicita AgNP pro vodní organismy

Díky rostoucímu množství aplikací AgNP existuje reálné riziko znečištění životního prostředí a toxického vlivu na vodní organismy. Velké množství stříbra se do životního prostředí dostává s průmyslovými odpady. Životní prostředí může být exponováno několika cestami. Byly již zaznamenány úniky AgNP z domácností (kosmetika, hygienické produkty, oblečení) a průmyslu do odpadních vod.^{4,5} Předpokládaná koncentrace AgNP v povrchových vodách v Evropě se odhaduje řádově na jednotky ng/l.²³²

Mnoho studií ukázalo, že AgNP jsou toxické pro organismy na různých trofických úrovních – řasy, sinice, vodní rostliny, mušle, korýši, ryby apod. Většina studií vede k závěru, že toxicita je způsobena uvolněnými ionty stříbra z povrchu AgNP, zatímco jiní autoři se přiklání k teorii, že toxicita je spojena s charakterem částic nebo kombinací obojího. Nicméně mechanismus toxicity není stále jednoznačně objasněn. Navarro a kol. pozorovali snížení kvantového výtěžku fotosystému II u sladkovodní řasy *Chlamydomonas reinhardtii* a došli k závěru, že toxicita je zprostředkována právě ionty stříbra uvolněnými v přítomnosti řas.²³³ Podobně byl kombinovaný vliv nanočástic stříbra a uvolněných iontů stříbra popsán jako příčina toxicity u mořské řasy *Thalassiosira pseudonana* a sinice *Synechococcus* sp.²³⁴ Je známo, že AgNP způsobují oxidativní stres a mění aktivitu antioxidantních enzymů ve vodních rostlinách i zvířatech.^{235–238} Např. u sladkovodní řasy a mořské řasy *Dunaliella tertiolecta* se toxicita AgNP projevila sníženým obsahem chlorofylu, zvýšenou tvorbou ROS a lipidovou peroxidací.²³⁶ Vodní rostliny *Spirodela polyrhiza* a *Spirodela punctata* byly také vystaveny oxidačnímu stresu, přičemž toxický efekt zde nebyl připisán iontovému stříbru.²³⁷ Oukarroum et al. navrhli, že AgNP vstupují do buněk vodní rostliny *Lemna gibba* a uvnitř jsou uvolňovány ionty stříbra, které zde spouští oxidativní stres.²³⁸ Chronická expozice AgNP způsobuje také zpoždění růstu a vývoje larev bentických bezobratlých živočichů (*Balanus amphitrite*, *Crepidula onyx* a *Hydroides elegans*).²³⁹ U ryb bylo zjištěno, že se AgNP bioakumulují v žábrech, játrech a svalch.^{240,241} Histologické studie odhalily poškození tkání a vakuolizaci jater a svalů.²⁴¹ AgNP také způsobují retardaci a malformace u rybích embryí, zpomalení srdečního rytmu embryí, redukci rychlosti líhnutí a délky larev.^{242,243}

Mnoho akutních ale i chronických toxicitních studií provedených s korýši *Daphnia* spp. prokázalo toxický vliv v různých koncentracích AgNP v rozsahu od několika mikrogarmů po miligramy na litr v závislosti na metodě přípravy částic, jejich velikosti, povrchové modifikaci, náboji apod.²⁴⁴ Více než 70 % AgNP vstupuje do organismu korýše

příjmem řas jako potravy.^{244,245} Následně se stříbro akumuluje v těle kolem žaber a střev.²⁴⁶ U novorozených jedinců, kteří byli exponováni 0,1 mg/l AgNP byla zaznamenána menší velikost těla, změny stravování, menší zásoby hnědé tukové tkáně a léze.²⁴⁷ Jiná studie ukázala, že 0,002 mg/l AgNP a více ovlivňuje schopnost pohybu ve vodě.²⁴⁸ Z toxikogenomických testů navíc vyplynulo, že AgNP způsobuje u dafnií poškození DNA.^{249,250}

Ve vodním prostředí je stabilita AgNP ovlivněna působením různých faktorů a mění se tak fyzikálně-chemické vlastnosti a potažmo toxicita. Agregace a rozpouštění závisí na pH, iontové síle a přítomnosti oxidačních činidel a jiných sloučenin.^{251–253} Důležitost složení média byla zdůrazněna v mnoha současných studiích. Např. Yue a kol. publikovali, že cytotoxicita AgNP stabilizovaných citrátem vůči linii rybích buněk se liší v závislosti na iontové síle a obsahu chloridů v médiu.²⁵⁴ Podobně obsah organického uhlíku, pH a obsah chloridů ovlivnil míru toxicity u ryby *Pimephales promelas*.²⁵⁵

V současnosti bylo publikováno několik málo studií, které se zabývaly vlivem dlouhodobého působení zředěných médií na stabilitu AgNP s různými stabilizačními činidly.^{256,257} Ukázalo se, že použité médium musí být zředěno desetkrát, aby se předešlo agregaci částic, zatímco životaschopnost organismů při těchto podmínkách nebyla ovlivněna. Römer et al. objevili, že akutní toxicita AgNP stabilizovaných citrátem vůči *D. magna* vzrůstá s ředěním média.²⁵⁸ Chronická toxicita AgNP vůči dafniím ve zředěném médiu však nebyla toho času publikována.

Experimentální část

7. Synergický účinek AgNP a antibiotik vůči zvířecím bakteriím^b

Testování zvýšeného účinku antibiotik v kombinaci s AgNP se provádělo v centru pro výzkum nemocí zvířat (CReSA) v průběhu mé zahraniční stáže. Použité patogeny byly zvířecí bakterie, přičemž některé z nich byly k určitým antibiotikům rezistentní. Kombinovaný účinek byl hodnocen pomocí FIC indexu za použití mikrodiluční „šachovnicové“ metody. Aby se zjistilo, zda na kombinovaný účinek má vliv velikost AgNP, syntetizovaly se AgNP o dvou průměrných velikostech částic 28 nm a 8 nm. AgNP byly kombinovány s běžně používanými antibiotiky amoxicilinem, penicilinem G, gentamicinem a kolistinem.

Pro syntézu AgNP byly použity následující chemikálie: AgNO₃ (Fagron), NH₃ (28–30% [w/w], Sigma-Aldrich), NaOH (Lach-ner), D(+)-maltóza monohydrát (Sigma-Aldrich), NaBH₄ (Sigma-Aldrich), želatina (Penta) a sodná sůl kyseliny polyakrylové (PAA) s molekulovou hmotností 1200 (Sigma-Aldrich). Velikost nanočástic byla měřena pomocí přístroje Zeta Plus analyzer (Brookhaven) využívajícího dynamického rozptylu světla (DLS). Velikost částic a jejich morfologie pak byla ověřena TEM pomocí mikroskopu JEM-2010 (Jeol) a UV/Vis spektroskopií na přístroji Specord S 600 (Analytic Jena). Snímky z TEM byly analyzovány pomocí softwaru Gwyddion¹ pro určení distribuce velikosti částic.

Sférické AgNP o průměrné velikosti částic 28 nm (AgNP-28nm) byly syntetizovány pomocí známé modifikované Tollensovy metody,² jejímž principem je redukce diaminstříbrného komplexu sacharidy. Modifikace této metody, která se běžně používá pro nanášení stříbrného zrcátka na různé povrchy, spočívá především ve snížení koncentrace reakčních komponent. Syntéza probíhala následujícím způsobem. Smícháním roztoku AgNO₃ s NH₃ vznikl komplex [Ag(NH₃)₂]⁺. Poté bylo pH upraveno roztokem NaOH a jako redukční činidlo byla použita D-maltóza. Konečné koncentrace reagentů byly: AgNO₃ 1·10⁻³ mol/l, NH₃ 5·10⁻³ mol/l, NaOH 9,6·10⁻³ mol/l a D-maltóza 1·10⁻² mol/l. Směs po několika

^b Výsledky publikovány v: Smékalová, M., Aragon, V., Panáček, A., Pucek, R., Zbořil, R. a Kvítek, L. Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. *The Veterinary Journal* 209, 174–179 (2016).

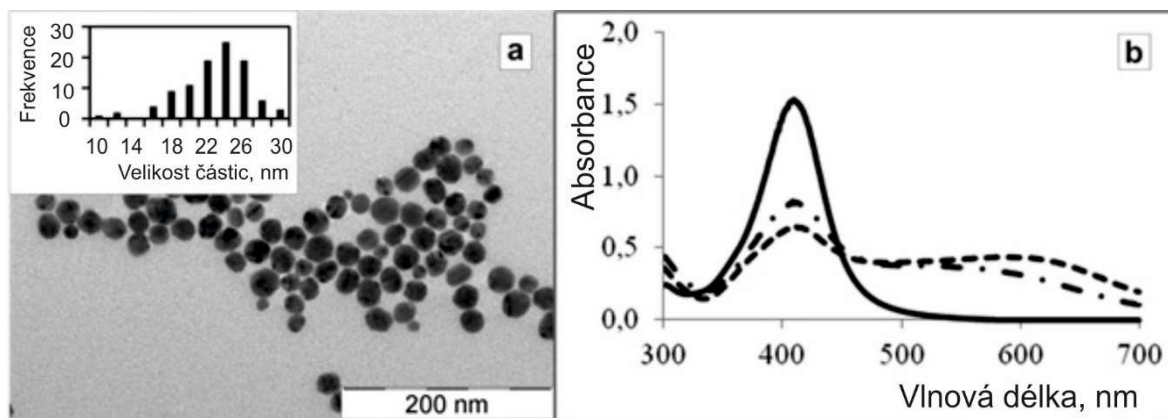
sekundách změnila svoji barvu na hnědožlutou, což značí přítomnost nanočástic. Takto připravená disperze AgNP měla koncentraci stříbra 108 mg/l.

Pro stabilizaci AgNP byla do připravené disperze přidána želatina o výsledné koncentraci 0,5 % pro testy probíhající v živném médiu Müller-Hinton (M.-H.) a 0,1 % pro testy probíhající v médiu BHI (brain-heart infusion broth, bujón z mozkosrdcové infuze).

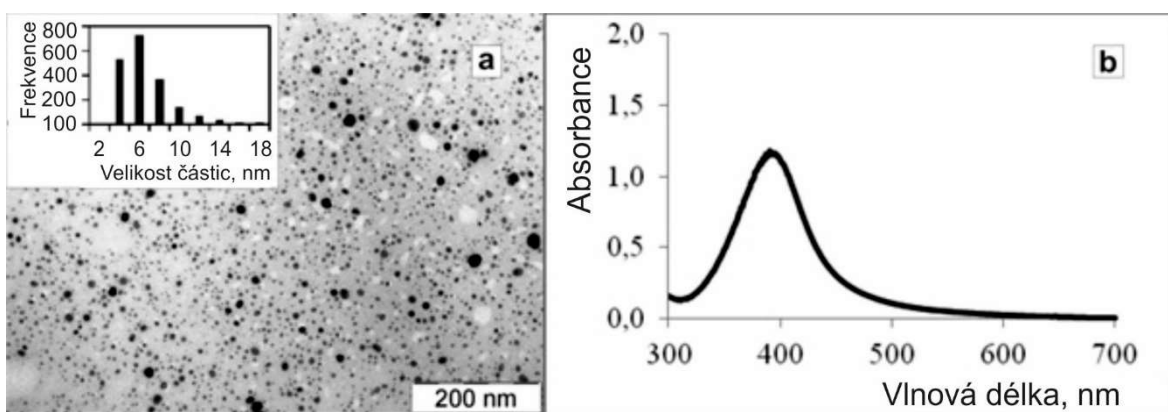
AgNP o průměrné velikosti 8 nm (AgNP-8nm) se připravovaly obdobně. Jako redukční činidlo byl použit tetrahydridoboritan sodný. Konečné koncentrace reagentů byly: AgNO_3 $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l, NH_3 $5 \cdot 10^{-2}$ mol/l, $\text{Na}[\text{BH}_4]$ $2 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Pro stabilizaci takto připravených AgNP se před redukcí přidala do reakčního systému PAA o výsledné koncentraci 0,18 %. Disperze měla po přípravě tmavě hnědou barvu. Výsledná koncentrace stříbra v disperzi AgNP byla 1080 mg/l.

AgNP o průměrných velikostech 28 nm a 8 nm (měření DLS metodou) byly syntetizovány na základě různé redukční síly redukčních činidel. Průměrná velikost AgNP určená pomocí metody DLS byla následně ověřena TEM. Snímky TEM prokázaly přítomnost sférických AgNP o velikostech 20,6 (10 až 30 nm) pro AgNP připravené redukcí maltózou (obr. 4a) a 4,7 nm (2 až 18 nm) pro AgNP připravené redukcí borohydridem (obr. 5a). Průměrná velikost částic určená metodou DLS byla nižší než velikost určená ze snímků TEM. Důvodem je fakt, že metoda DLS nadhodnocuje frakce částic s větší velikostí, protože intenzita rozptýleného světla závisí na šesté mocnině velikosti částic. V UV/Vis spektrech připravených AgNP byly zaznamenány absorpční pásy s maximy při 409 nm (AgNP-28nm) a 392 nm (AgNP-8nm), což je charakteristické pro částice nanometrových rozměrů (obr. 4b a 5b).² Menší částice absorbují v oblastech nižších vlnových délek, zatímco s rostoucí velikostí částic dochází k červenému posunu.¹² Z úzké šířky píků lze usuzovat na nízkou distribuci velikostí AgNP.

Po smíchání nestabilizovaných AgNP-28nm s kultivačními médii došlo k částečné agregaci, jak bylo zřejmé i z UV/Vis spekter, kde se objevily sekundární píky v oblasti vyšších vlnových délek (obr. 4b). Bylo publikováno, že sekundární absorpční píky v oblasti 550 nm až 650 nm se objevují, když částice podléhají agregaci.²⁹ Ke stabilizaci AgNP-28nm byla použita želatina jako velmi účinný, levný a netoxický stabilizátor. Ke stabilizaci AgNP-28nm v médiu BHI bylo potřeba použít větší množství želatiny než pro médium M.-H., jelikož BHI obsahuje vyšší koncentraci elektrolytů a proteinů než médium M.-H. Stabilita AgNP je velmi ovlivněna iontovou silou okolního prostředí. AgNP-8nm, které se připravovaly za přítomnosti PAA byly v médiích stabilní.



Obrázek 4. Snímek z TEM (a) a UV/Vis absorpční spektra AgNP-28 nm připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ D-maltózou (plná čára) a absorpční spektra AgNP po smíchání s médiem MH (čerkovaná čára) a médiem BHI (čárkovaná čára) (b). Vložený histogram vyhodnocený z korespondujícího snímku TEM zobrazuje distribuci velikosti AgNP.



Obrázek 5. Snímek z TEM (a) a UV/Vis absorpční spektrum (b) AgNP-8nm připravených redukcí AgNO_3 borohydridem. Vložený histogram vyhodnocený z korespondujícího snímku TEM zobrazuje distribuci velikosti AgNP.

Bakteriální kmeny izolované ze zvířecích tkání *S. enterica* LT2, *S. aureus* GP0004, *E. coli* eae+ GN2514, *Actinobacillus pleuropneumoniae* 17/06L, *P. multocida* P-813 a *Streptococcus uberis* GP1037 byly získány ze sbírky centra CReSA (Španělsko). K testování synergického efektu byla použita antibiotika amoxicilin (Sigma), draselná sůl penicilinu G (Fluka), gentamicin sulfát (Sigma-Aldrich), kolistin methansulfonát sodný (Sigma). Média BHI (Oxoid, pH 7,4) a M-H (Oxoid, pH 7,3) byla připravena podle instrukcí výrobce a sterilizována. Pro kultivaci *A. pleuropneumoniae* bylo médium BHI suplementováno 1% IsoVitaleXem (BBL). Všechny reagenty byly použity bez předchozí úpravy. Na přípravu

roztoků byla použita deionizovaná voda. Bakteriální kmeny *S. enterica*, *S. aureus*, *E. coli* a *S. uberis* GP1037 byly kultivovány v kultivačním médiu M.-H. a kmeny *A. pleuropneumoniae* a *P. multocida* v médiu BHI.

Minimální inhibiční koncentrace antibiotik, AgNP a jejich kombinací byly určeny pomocí mikrodiluční „šachovnicové“ metody za použití jednorázové plastové mikrotitrační destičky s 96 jamkami. Antibiotika byla postupně ředěna médiem dvakrát ve vodorovném směru a ve vertikálním směru byly přidány AgNP taktéž sériově ředěné médiem dvakrát. Bakteriální citlivost byla hodnocena podle dokumentu VET01-A3 Institutu pro klinické a laboratorní standardy (CLSI).²⁵⁹

Dříve než se provedla inokulace, bylo nutné bakterie přes noc kultivovat na agarové půdě. Nakultivované bakterie pak byly suspendovány ve sterilním 0,85% roztoku NaCl na hustotu 0,5 McFarlandovy stupnice a poté byla suspenze zředěna 1 : 50 kultivačním médiem. Nakonec bylo ke 180 μ l antimikrobiální směsi antibiotika a AgNP naočkováno 20 μ l bakteriálního inokula. Mikrotitrační destička byla následně inkubována při 37 °C po 24 hodin. Bakteriální růst byl poté hodnocen měřením optické hustoty při 600 nm pomocí spektrofotometru PowerWave XS (BioTek). Z určených MIC byl následně vypočítán FIC index podle vzorce (1), kdy byl kombinovaný antibakteriální účinek hodnocen podle následujících kritérií: synergie ($FIC \leq 0,5$), aditivita ($0,5 < FIC \leq 1$), indiference ($1 < FIC \leq 2$) a antagonismus ($FIC > 2$).

Dosažené výsledky antibakteriální aktivity samotných AgNP jsou prezentovány v tabulce 1. MIC AgNP se pohybovaly v rozmezí 6,3 až 100,0 μ g/ml v závislosti na testovaném kmenu bakterie a velikosti AgNP. Antibakteriální účinek se projevil především u Gram-negativních bakterií. Růst Gram-pozitivních bakterií byl inhibován méně, avšak přesné určení hodnoty MIC AgNP-28nm bylo omezeno danou koncentrací disperze při přípravě (108 μ g/ml) a testovaná koncentrace mohla být maximálně poloviční. Disperze AgNP byla nejprve naředěna na 100 μ g/ml a poté se médiem na destičce naředila na polovinu, tedy 50 μ g/ml. Antibakteriální aktivita menších nanočástic stříbra byla silnější než aktivita těch větších. AgNP obou velikostí nejvíce potlačily růst Gram-negativní bakterie *P. multocida*, naopak Gram-pozitivní bakterie *S. uberis* byla k AgNP nejméně citlivá.

Tabulka 1. MIC [$\mu\text{g/ml}$] nanočástic stříbra o průměrných velikostech 28 nm a 8 nm.

Bakterie	AgNP-28nm	AgNP-8nm
<i>S. enterica</i> (G-) ^a	25	12,5
<i>S. aureus</i> (G+)	> 50	25
<i>E. coli</i> (G-)	25	6,3
<i>A. pleuropneumoniae</i> (G-)	50	25
<i>S. uberis</i> (G+)	> 50	100
<i>P. multocida</i> (G-)	6,3	6,3

a – G+, Gram-pozitivní bakterie; G-, Gram-negativní

Výsledky společného antibakteriálního efektu testovaných antibiotik a AgNP jsou uvedeny v tabulkách 2 až 5. V případě ampicilinu se MIC samotného antibiotika proti testovaným bakteriím pohybovaly v rozmezí 0,25 až > 32 $\mu\text{g/ml}$ (tab. 2). MIC amoxicilinu vůči *E. coli* a *A. pleuropneumoniae* byla > 32 $\mu\text{g/ml}$, přičemž breakpoint (hraniční koncentrace antibiotika, která definuje mikroorganismus jako citlivý nebo rezistentní dle jeho MIC) je ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ a tyto kmeny byly tedy k amoxicilinu rezistentní. Nejlepšího kombinovaného účinku amoxicilinu a AgNP bylo dosaženo při kombinaci 12,5 $\mu\text{g/ml}$ AgNP obou velikostí s 8 $\mu\text{g/ml}$ amoxicilinu. Při této kombinaci došlo k obnovení citlivosti původně k ampicilinu rezistentní bakterie *A. pleuropneumoniae*. Antibakteriální aktivita amoxicilinu kombinovaného s AgNP-28nm byla synergní s FIC indexem 0,4; při kombinaci s AgNP-8nm byl však účinek pouze aditivní s FIC indexem 0,6. Aditivní účinek amoxicilinu kombinovaného s AgNP obou velikostí byl také pozorován proti Gram-pozitivní bakterii *S. aureus* s FIC indexem 0,8. Aditivní účinek také vykazovala kombinace amoxicilinu a AgNP-8nm proti *S. uberis*. Ostatní kombinace měly indifferenční efekt.

V případě testování antibakteriálního účinku Penicilinu G v kombinaci s AgNP byly dosaženy podobné výsledky jako v případě amoxicilinu (tab. 3). MIC samotného penicilinu se pohybovaly v rozmezí 0,03 až > 32 $\mu\text{g/ml}$. *S. aureus* (MIC 1 $\mu\text{g/ml}$, breakpoint $\geq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$), *E. coli* (MIC > 32 $\mu\text{g/ml}$, breakpoint ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$) a *A. pleuropneumoniae* (MIC > 32 $\mu\text{g/ml}$, breakpoint ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$) byly k penicilinu rezistentní. Nejlepší výsledky byly dosaženy při kombinaci 6,3 $\mu\text{g/ml}$ AgNP-8nm se 2 $\mu\text{g/ml}$ penicilinu proti *A. pleuropneumoniae*, kdy se FIC index rovnal 0,3.

Tabulka 2. MIC [$\mu\text{g}/\text{mL}$] amoxicilinu (Amx) a výsledky kombinace amoxicilinu s AgNP

Bakterie	MIC v kombinaci					MIC v kombinaci				
	MIC Amx	AgNP-28nm	Amx	FIC	účinek ^b	AgNP-8nm	Amx	FIC	účinek	
<i>S. enterica</i> (G-) ^a	1	25	1	2,0	I	12,5	1	2,0	I	
<i>S. aureus</i> (G+)	2	25	1	0,8	A	12,5	0,5	0,8	A	
<i>E. coli</i> (R) ^c	> 32	25	> 32	2,0	I	6,3	> 32	2,0	I	
<i>App</i> ^d (R, G-)	> 32	12,5	8	0,4	S	12,5	8	0,6	A	
<i>P. multocida</i> (G-)	0,25	6,3	0,25	2,0	I	6,3	0,25	2,0	I	
<i>S. uberis</i> (G+)	0,25	> 50	0,25	2,0	I	50	0,125	1,0	A	

a – G+, Gram-pozitivní bakterie; G-, Gram-negativní bakterie

b – S, synergie; A, aditivita; I, indiference

c – R, rezistentní k amoxicilinu

d – *App*, *A. pleuropneumoniae*

Tento synergní účinek byl nejsilnější ze všech provedených experimentů. Větší AgNP-28nm v kombinaci s penicilinem proti *A. pleuropneumoniae* vykazovaly pouze aditivní efekt. Aditivní účinek byl také pozorován v případě kombinace AgNP obou velikostí s penicilinem vůči *S. aureus*. Ostatní kombinace měly indiferentní efekt.

Tabulka 3. MIC [$\mu\text{g}/\text{mL}$] penicilinu G (Pen) a výsledky kombinace penicilinu s AgNP

Bakterie	MIC Pen	MIC v kombinaci				MIC v kombinaci				
		AgNP-28nm	Pen	FIC	účinek ^b	AgNP-8nm	Pen	FIC	účinek	
<i>S. enterica</i> (G-) ^a	2	25	1	1,5	I	12,5	1	1,5	I	
<i>S. aureus</i> (R, G+)	1	12,5	0,5	0,6	A	12,5	0,125	0,6	A	
<i>E. coli</i> (R) ^c	> 32	25	> 32	2,0	I	6,3	> 32	2,0	I	
<i>App</i> ^d (R, G-)	> 32	25	8	0,6	A	6,3	2	0,3	S	
<i>P. multocida</i> (G-)	0,03	6,3	0,03	2,0	I	6,3	0,03	2,0	I	

a – G+, Gram-pozitivní bakterie; G-, Gram-negativní bakterie

b – S, synergie; A, aditivita; I, indiference

c – R, rezistentní k penicilinu

d – *App*, *A. pleuropneumoniae*

Nejefektivnějším antibiotikem v kombinaci s AgNP byl gentamicin (tab. 4). Kombinace gentamicinu s AgNP-28nm vedla k aditivnímu účinku u bakterií *S. enterica* a *P. multocida* a synergnímu účinku u bakterií *S. aureus*, *E. coli* a *A. pleuropneumoniae*. S AgNP-8nm byl efekt aditivní u *E. coli* a *P. multocida* a synergní u *S. aureus*. Kombinace

3,1 µg/ml AgNP-28nm i AgNP-8nm se 2 µg/ml gentamicinu vedla k obnově citlivosti rezistentní *P. multocida* k danému antibiotiku (MIC 8 µg/ml, breakpoint ≥ 8 µg/ml). Také rezistentní *A. pleuropneumoniae* (MIC 8 µg/ml, breakpoint ≥ 8 µg/ml) byla opět citlivá ke gentamicinu kombinovaném s AgNP. Kombinací gentamicinu s AgNP-28nm umožnilo snížit koncentraci antibiotika na 0,25 µg/ml.

Tabulka 4. MIC [µg/mL] gentamicinu (Gen) a výsledky kombinace gentamicinu s AgNP

Bakterie	MIC Gen	MIC v kombinaci			účinek ^b	MIC v kombinaci			účinek
		AgNP-28nm	Gen	FIC		AgNP-8nm	Gen	FIC	
<i>S. enterica</i> (G-) ^a	1	12,5	0,25	0,8	A	12,5	0,25	1,3	I
<i>S. aureus</i> (G+)	2	25	0,25	0,4	S	6,3	0,5	0,5	S
<i>E. coli</i> (R) ^c	> 32	6,3	8	0,4	S	3,1	16	0,8	A
<i>App</i> ^d (R, G-)	8	25	0,25	0,5	S	25	8	2,0	I
<i>P. multocida</i> (R, G-)	8	3,1	2	0,8	A	3,1	2	0,8	A

a – G+, Gram-pozitivní bakterie; G-, Gram-negativní bakterie

b – S, synergie; A, aditivita; I, indiference

c – R, rezistentní ke gentamicinu

d – *App*, *A. pleuropneumoniae*

MIC samotného kolistinu se pohybovaly mezi 4 až 8 µg/ml (tab. 5) a tedy všechny testované bakterie byly k tomuto antibiotiku rezistentní (breakpoint ≥ 2 µg/ml). V kombinaci kolistinu s AgNP-28nm byl společný účinek pouze aditivní a to u všech bakteriálních kmenů.

Tabulka 5. MIC [µg/mL] kolistinu (Col) a výsledky kombinace kolistinu s AgNP

Bakterie	MIC Col	MIC v kombinaci			účinek ^b	MIC v kombinaci			účinek
		AgNP-28nm	Col	FIC		AgNP-8nm	Col	FIC	
<i>S. enterica</i> (R, G-) ^{a, c}	4	12,5	2	1,0	A	6,3	2	1,0	A
<i>E. coli</i> (R, G-)	8	12,5	2	0,8	A	1,6	2	0,5	S
<i>App</i> ^b (R, G-)	8	25	2	0,8	A	25	8	2,0	I
<i>P. multocida</i> (R, G-)	8	3,1	1	0,6	A	3,1	1	0,6	A

a – G-, Gram-negativní bakterie

b – S, synergie; A, aditivita; I, indiference

c – R, rezistentní ke kolistinu

Aditivní účinek byl také pozorován pro kombinaci kolistinu s AgNP-8nm proti *S. enterica* a *P. multocida*. Při kombinaci 3,1 µg/ml AgNP-28nm nebo AgNP-8nm s kolistinem se rezistentní *P. multocida* stala ke kolistinu citlivou, protože MIC kolistinu klesla na 1 µg/ml. Kombinace 2 µg/ml kolistinu s 1,6 µg/ml AgNP-8nm měla synergní antibakteriální účinek proti *E. coli*.

AgNP jsou dobře známy svojí výjimečnou antimikrobiální aktivitou proti lidským patogenům a mají schopnost zvyšovat účinek jiných antimikrobiálních látek (viz kapitoly 2 a 4). Bohužel není příliš studií, které by se zabývaly vlivem AgNP proti bakteriím způsobujícím nemoci u zvířat. Přitom rezistence zvířecích bakterií představuje stejně velký problém jako rezistence humánních bakterií. Rezistentní kmeny, které způsobují závažné nemoci tzv. hospodářských zvířat např. mastitida (*S. uberis*) nebo respirační choroby (*A. pleuropneumoniae*) se rychle rozšiřují.²⁶⁰

Většina produktů se stříbrem určených pro veterinární sektor se vyskytuje ve formě dezinfekcí pro povrchy. Existují také různé kapky, masti, gely nebo spreje pro potlačení infekcí (TraumaPet Ag, Auxivet). AgNP se také používají jako prebiotika v krmení.²⁶¹

V této studii se testovala čtyři různá antibiotika v kombinaci s AgNP proti bakteriím způsobujícím nemoci zvířat, přičemž některé byly k danému antibiotiku rezistentní. Antibakteriální aktivita AgNP silně závisí na jejich velikosti,^{2,64-66} proto byly syntetizovány AgNP o dvou velikostech, aby bylo možné určit, zda i zvýšený účinek antibiotik je ovlivněn rozměry AgNP.

Menší AgNP měly opravdu silnější antibakteriální účinky. Mohou totiž snadněji pronikat póry v buněčné membráně, uvolnit větší množství iontů stříbra a generovat více ROS.²⁶² Větší plocha povrchu ku objemu činí navíc AgNP více reaktivní.²⁶³ Růst Gram-pozitivních bakterií byl inhibován méně než Gram-negativních bakterií, což odpovídá dříve publikovaným studiím.^{55,57,264} Tento fakt může být připsán tenčí peptidoglykanové vrstvě Gram-negativních bakterií ve srovnání s pevnou peptidoglykanovou buněčnou stěnou Gram-pozitivních bakterií.

Amoxicilin je beta-laktamové antibiotikum, které inhibuje syntézu bakteriální buněčné stěny, a používá se pro léčbu řady infekcí u zvířat. Amoxicilin například léčí nemoci způsobené infekcí *A. pleuropneumoniae*, která způsobuje závažná respirační onemocnění prasat.²⁶⁵ Bohužel se vyskytují případy rezistence bakterií k amoxicilinu.²⁶⁶ V rámci testování antibakteriální aktivity amoxicilinu v kombinaci s AgNP bylo prokázáno, že AgNP zvyšují účinek antibiotika proti *A. pleuropneumoniae* a dokonce MIC amoxicilinu byla

snížena pod hranici breakpointu, což znamená, že takovou bakterii lze v tomto případě hodnotit jako citlivou k amoxicilinu. Kombinovaný účinek AgNP a amoxicilinu proti *A. pleuropneumoniae* byl synergní v případě AgNP-28nm a pouze aditivní v případě AgNP-8nm. Zvýšený účinek amoxicilinu v kombinaci s AgNP také publikoval Shahverdi a kol. proti *S. aureus* na základě hodnocení velikosti inhibiční zóny za použití diskové metody.²¹ Použití diskové difuzní metody se však nezdá vhodné, jelikož neexistuje parametr, podle kterého by se dalo určit, zda je interakce synergní nebo pouze aditivní. Otázkou také zůstává do jaké míry AgNP difundují skrz pevný agar.

Podobné výsledky jako s amoxicilinem byly pozorovány u penicilinu G, který také náleží do skupiny beta-laktamových antibiotik. Nejsilnější pozorovaný synergní účinek se projevil při kombinaci AgNP-8nm s penicilinem proti Gram-negativní *A. pleuropneumoniae*.

Nejvíce pozitivních výsledků bylo dosaženo kombinací AgNP s gentamicinem. Stejně jako jiné aminoglykosidy je mechanismem účinku gentamicinu ireverzibilní navázání na ribozomální podjednotku 30S bakterie a interference s proteinovou syntézou. Celkově byly pozorovány čtyři aditivní a čtyři synergní účinky gentamicinu a AgNP. Podobně Birla a kol. pozorovali zvýšený účinek gentamicinu v přítomnosti AgNP proti *E. coli* a *S. aureus*.²² Naopak v některých studiích kombinace gentamicinu a AgNP neměla žádný zvýšený antibakteriální účinek.^{21,26} Důležitým výsledkem této studie bylo obnovení citlivosti původně rezistentních bakterií *A. pleuropneumoniae* a *P. multocida* ke gentamicinu po kombinaci s AgNP. *A. pleuropneumoniae* je Gram-negativní bakterie, která způsobuje pleuropneumonii prasat, vysoce nakažlivé závažné respirační onemocnění. Mezi prasaty se přenáší aerosolem nebo přímým kontaktem a vyskytuje se jako chronická nebo akutní infekce, kterou provází těžké klinické příznaky v nejhorsích případech následované rychlou smrtí. *P. multocida* je Gram-negativní bakterie, která infikuje domestikovaná zvířata a způsobuje onemocnění jako je např. cholera drůbeže. Stříbro by tedy mohlo být řešením při léčbě těchto závažných onemocnění v situacích, kdy nebudou antibiotika účinná.

Kolistin je polypeptidové antibiotikum s baktericidním účinkem proti Gram-negativním bakteriím. Jeho účinek spočívá v destabilizaci buněčné membrány. Používá se při léčbě infekcí u lidí i zvířat. V humánní medicíně však přichází na řadu až poté, co jiná antibiotika v léčbě infekce selžou. U hospodářských zvířat je kolistin používán k léčbě infekcí způsobených bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae*. Především v důsledku vzniku rezistence k jiným skupinám antibiotik se spotřeba kolistinu u zvířat v posledních letech zvyšuje. Kolistin by se však také měl ponechávat jako druholiniová léčba zvířat, aby se

předešlo vzniku rezistence. V poslední době se bohužel případy rezistence začaly objevovat i u kolistinu.²⁶⁷ Ze čtyř kmenů bakterií, které byly zvoleny k testování, byly všechny kmeny ke kolistinu rezistentní. Při kombinaci AgNP s kolistinem byl zaznamenán ve většině případů pouze aditivní antibakteriální efekt, avšak u enterobakterie *E. coli* se projevila synergie. Důležité je také, že 3,1 µg/ml AgNP snížilo potřebnou dávku kolistinu pod hranici breakpointu u bakterie *P. multocida*, která se tak stala ke kolistinu citlivou.

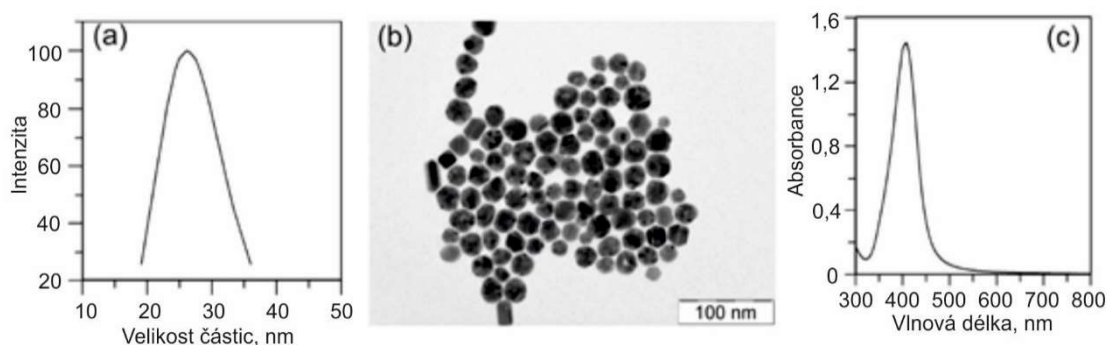
8. Synergie AgNP a antibiotik vůči bakteriím citlivým k antibiotikům^c

AgNP byly opět syntetizovány podle výše popsané modifikované Tollensovy metody, která spočívá v redukci diaminstříbrného komplexu sacharidy, kterým zde byla D-maltóza. AgNP byly během syntézy stabilizovány přidávkem želatiny s výslednou koncentrací 0,05 %. Charakterizace AgNP probíhala pomocí metod DLS, TEM a UV/Vis spektroskopie. AgNP připravené Tollensovým procesem dosahovaly průměrné velikosti 28 nm s velmi úzkou distribucí velikosti, jak lze vidět z křivky lognormální distribuce velikosti částic pořízené metodou DLS (obr. 6a) a jak je patrné ze snímků pořízených TEM (obr. 6b). V UV/Vis absorpčním spektru AgNP byl zaznamenán úzký pík povrchového plazmonu u vlnové délky 410 nm, což také odpovídá částicím těchto rozměrů (obr. 6c). Změřená hodnota zeta potenciálu -28 mV znamená vysokou agregační stabilitu připravených AgNP.

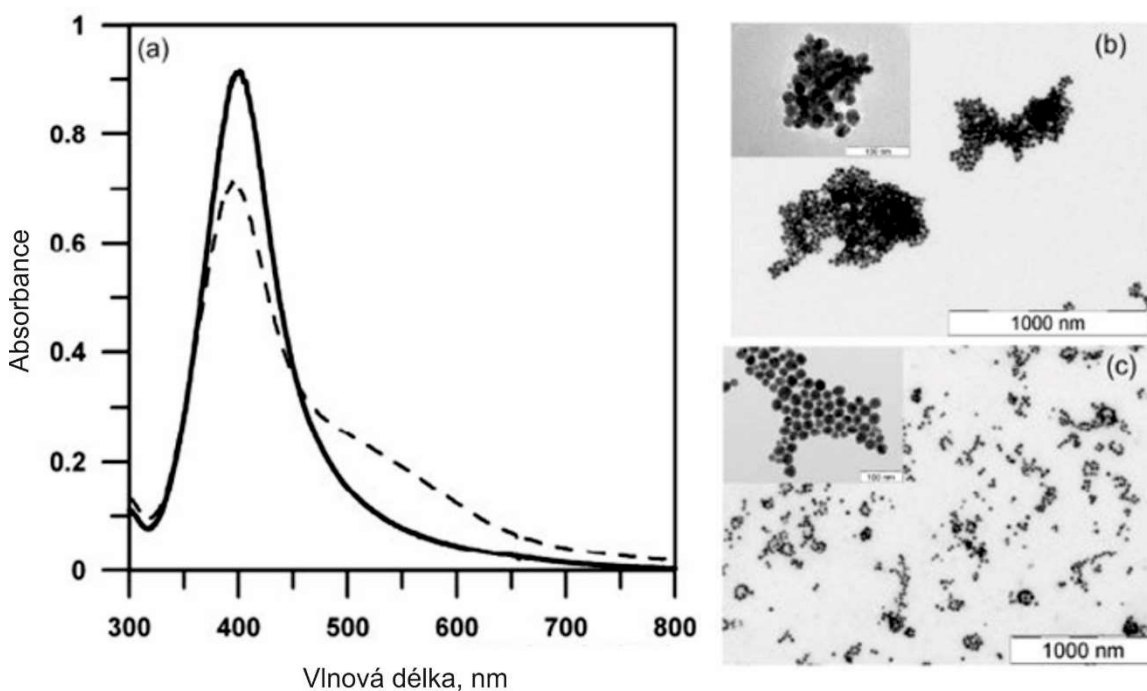
AgNP musely být před testováním synergie stabilizovány želatinou, která je pro tento účel vhodná, protože je netoxickou přírodní látkou. Po smíchání s kultivačním médiem v poměru 1 : 1 byla pozorována částečná agregace částic stříbra, která se projevila změnou barvy koloidu, nárůstem v průměrné velikosti částic, sekundárním píkem v UV/Vis spektru a také snížením zeta potenciálu. Průměrná velikost částic se zvýšila na 85 nm, absorpční pík u 410 nm se snížil a objevil se sekundární pík u 550 nm (obr. 7a). Zeta potenciál poklesl na hodnotu -13 mV. Obrázek 7 ukazuje snímky z TEM AgNP po přípravě (obr. 7b) a po stabilizaci želatinou (obr. 7c). Nestabilizované AgNP tvořily agregáty velikosti stovek nm (obr. 7b) na rozdíl od stabilizovaných AgNP, které zůstaly dobře separovány (obr. 7c). Pokles zeta potenciálu a agregace AgNP byl způsoben kationty přítomnými v kultivačním médiu. Obecně AgNP snadno v prostředí s vysokou iontovou silou snadno agregují, obzvláště jsou-li kationty multivalentní. Opačně nabitě kationty jsou přitahovány k negativně nabitému povrchu AgNP a snižují jejich negativní zeta potenciál. AgNP se pak nemohou dostatečně odpuzovat, přibližují se, spojují se a následně agregují a sedimentují. Želatina byla přidána až po syntéze a neovlivnila tak jejich charakterizaci, např. měření

^c Výsledky publikovány v: Panáček, A., Smékalová, M., Kilianová, M., Prucek, R., Bogdanová, K., Večeřová, R., Kolář, M., Havrdová, M., Pláza, G. A., Chojniak, J., Zbořil, R. a Kvítek, L. Strong and Nonspecific Synergistic Antibacterial Efficiency of Antibiotics Combined with Silver Nanoparticles at Very Low Concentrations Showing No Cytotoxic Effect. *Molecules* 21(1), 26 (2016).

velikosti. Takto nízká koncentrace želatiny však na velikost neměla vliv a byla dostatečná pro stabilizaci AgNP v kultivačním médiu, jak potvrdily snímky z TEM a měření DLS.



Obrázek 6. Lognormální rozložení velikosti získané z měření DLS (a), snímky z TEM (b) a UV/Vis absorpční spektra AgNP s průměrnou velikostí 26 nm a úzkou distribucí velikosti částic (c).



Obrázek 7. UV/Vis absorpční spektra (a) želatinou stabilizované (plná čára) a nestabilizované (čárkovaná čára) disperze AgNP v kultivačním médiu v poměru 1 : 1, TEM snímky nestabilizovaných (b) a želatinou stabilizovaných AgNP (c).

Pro stanovení MIC AgNP, antibiotik a jejich kombinace byla využita šachovnicová diluční metoda. Antibiotika byla ředěna geometrickou řadou a kombinována s AgNP o koncentraci nižší než jejich MIC. Podle bakteriálního kmene byly použity koncentrace

AgNP 0,6; 1,25; 2,5 a 5 mg/l. 100 µl média M.-H. (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) o definované koncentraci antibiotik a AgNP bylo inokulováno bakteriemi o koncentraci 10^5 – 10^6 CFU/ml (CFU – colony-forming units). MIC byla určena jako nejnižší koncentrace testovaných látek, která viditelně inhibuje růst bakterií po 24 hodinách (37 °C).

K testování byly použity tyto bakteriální kmeny (značení dle České sbírky mikroorganismů, Masarykova univerzita, Brno): *E. coli* CCM 4225, *P. aeruginosa* CCM 3955 a *S. aureus* CCM 4223. Aplikovaná antibiotika jsou shrnuta v tabulce 6.

Tabulka 6. Použitá antibiotika rozdělená podle mechanismu účinku a jejich zkratky.

Inhibice syntézy buněčné stěny	Inhibice proteosyntézy	Inhibice syntézy nukleových kyselin	Narušení funkce cytoplazmatické membrány
Ampicilin (AMP) ^a Ampicilin/sulbaktam (AMS) ^a Piperacilin (PIP) ^a Piperacilin/tazobaktam (PPT) ^a Penicilin (PEN) ^a Oxacilin (OXA) ^a Cefazolin (CZL) ^b Cefuroxim (CRX) ^b Cefoxitin (CXT) ^b Cefepim (CPM) ^b Cefoperazon (CPR) ^b Ceftazidim (CTZ) ^b Meropenem (MER) ^c Teikoplanin (TEI) ^d Vankomycin (VAN) ^d Aztreonam (AZT) ^c	Gentamicin (GEN) ^f Tetracyklin (TET) ^g Amikacin (AMI) ^f Chloramfenikol (CMP) ^h Erytromycin (ERY) ⁱ Klindamycin (CLI) ^j	Oxolinová kyselina (OXO) ^k Ofloxacin (OFL) ^k Ciprofloxacín (CIP) ^k Kotrimoxazol (COT) ^l	Kolistin (COL) ^m

Kategorie antibiotik podle jejich chemické struktury: (a) peniciliny; (b) cefalosporiny; (c) karbapenemy; (d) glykopeptidy; (e) monobaktamy; (f) aminoglykosidy; (g) tetracykliny; (h) amfenikoly; (i) makrolidy; (j) linkosamidy; (k) chinolony; (l) sulfonamidy; (m) polypeptidy.

Výsledky testování antibakteriální aktivity antibiotik v kombinaci s AgNP jsou shrnuty v tabulkách 7–9. Z hodnot MIC antibiotik a antibiotik v kombinaci AgNP je patrné, že synergický účinek byl pozorován u všech použitých antibiotik a u všech bakteriálních kmenů.

V případě *E. coli* se projevil výrazný synergický účinek v koncentracích AgNP 2,5 mg/l a 5 mg/l (MIC AgNP = 7,5 mg/l). Při kombinaci antibiotik s AgNP o těchto koncentracích se MIC antibiotik snížily o dva až tři řády oproti antibiotikům aplikovaným

bez AgNP. Při nižších koncentracích AgNP byl synergický efekt pozorován u GEN, COL a OFL s MIC více jak dvakrát nižšími, než byly MIC antibiotik samotných. *E. coli* byla vůči samotnému AMP rezistentní, antibiotikum nevykazovalo žádnou antibakteriální aktivitu ani v nejvyšší použité koncentraci 32 mg/l (breakpoint = 8 mg/l). V kombinaci s AgNP proti *E. coli* se aktivita AMP znovu obnovila a *E. coli* byla vůči AMP znovu senzitivní. Při koncentraci AgNP 2,5 mg/l se snížila MIC AMP na 0,03 mg/l.

V případě *P. aeruginosa* byly MIC antibiotik v kombinaci s AgNP (2,5 mg/l a 5 mg/l) také o dva až tři řády nižší než při aplikaci antibiotika samotného. V případě nižších koncentrací AgNP byla pozorována synergie s MER, GEN a COL (MIC více než dvakrát nižší).

Bakterie *S. aureus* byla citlivější k AgNP více než další testované bakterie s MIC rovné 5 mg/l, což se také promítlo do silnějšího synergického efektu. Nejvyšší použitá koncentrace 2,5 mg/l vedla k nejvyššímu poklesu MIC antibiotik, o dva až tři řády. Při koncentraci 1,25 mg/l AgNP byl také pozorován synergický efekt téměř pro všechna antibiotika s poklesem MIC antibiotik o jeden řád. Také u nejnižší koncentrace 0,6 mg/l AgNP byl u *S. aureus* pozorován téměř ve všech případech (PEN, AMS, TET, COT, ERY, CLI, CIP, TEI a VAN) synergický účinek s více jak dvojnásobným poklesem MIC. Naopak u *E. coli* a *P. aeruginosa* bylo snížení MIC antibiotik výjimečné.

Tabulka 7. MIC antibiotik (mg/l) v kombinaci s AgNP v koncentracích nižších než MIC (7,5 mg/l) pro *E. coli* CCM 4225.

	AMP	AMS	CZL	CRX	CXT	GEN	COT	COL	OXO	OFL	TET	AZT
ATB + 0 mg/l AgNP	-	8	2	1	1	0,5	4	0,5	0,5	0,03	4	0,03
ATB + 0,6 mg/l AgNP	-	8	2	1	1	0,03	2	0,125	0,5	0,015	4	0,03
ATB + 1,25 mg/l AgNP	-	8	2	1	1	0,06	2	0,125	0,5	0,015	2	0,03
ATB + 2,5 mg/l AgNP	0,03	0,03	0,0019	0,00097	0,00097	0,00048	2	0,00097	0,5	0,00024	1	0,0078
ATB + 5 mg/l AgNP	0,00097	0,00097	0,00097	0,00097	0,00097	0,00048	0,0019	0,00048	0,00097	0,00024	0,00048	0,0019

Tabulka 8. MIC antibiotik (mg/l) v kombinaci s AgNP v koncentracích nižších než MIC (7,5 mg/l) pro *P. aeruginosa* CCM 3955.

	PIP	PPT	AZT	MER	CTZ	CPR	CPM	GEN	AMI	COL	OFL	CIP
ATB + 0 mg/l AgNP	4	4	4	1	1	4	2	0,25	1	0,5	1	0,125
ATB + 0,6 mg/l AgNP	4	4	4	1	1	4	1	0,03	0,25	0,125	1	0,03
ATB + 1,25 mg/l AgNP	2	4	4	0,5	1	4	1	0,015	0,25	0,06	1	0,03
ATB + 2,5 mg/l AgNP	0,015	0,0039	0,00097	0,0019	0,00024	0,00048	0,00024	0,00048	0,00048	0,00048	0,00024	0,00024
ATB + 5 mg/l AgNP	0,0078	0,0039	0,00097	0,0019	0,00024	0,00048	0,00024	0,00048	0,00048	0,00048	0,00024	0,00024

Tabulka 9. MIC antibiotik (mg/l) v kombinaci s AgNP v koncentracích nižších než MIC (5 mg/l) pro *S. aureus* CCM 4223.

	PEN	OXA	AMS	CMP	TET	COT	ERY	CLI	CIP	GEN	TEI	VAN
ATB + 0 mg/l AgNP	0,125	0,25	0,5	4	0,25	1	0,125	0,125	0,25	0,25	0,25	1
ATB + 0,6 mg/l AgNP	0,015	0,25	0,125	4	0,015	0,03	0,06	0,015	0,03	0,25	0,03	0,03
ATB + 1,25 mg/l AgNP	0,015	0,03	0,06	2	0,015	0,0078	0,06	0,015	0,015	0,06	0,015	0,00097
ATB + 2,5 mg/l AgNP	0,00006	0,00048	0,00048	0,00048	0,00012	0,0019	0,00012	0,00012	0,00012	0,00048	0,00097	0,00048

Dosažené výsledky této studie prokázaly silný synergický účinek většiny antibiotik v kombinaci s AgNP za použití mikrodiluční metody. AgNP byly použity ve velmi nízkých koncentracích, nižších než jejich MIC, na rozdíl od některých studií, kde byly AgNP nebo antibiotika použity v koncentracích rovných nebo dokonce vyšších než jejich MIC. V některých studiích dokonce nebyl vždy prokázán synergický kombinovaný účinek.^{21,24,268–270} V této studii byla použita pro testování synergie mikrodiluční metoda, která neomezuje difuzní schopnost AgNP. AgNP s přidavkem želatiny byly v kapalném médiu stabilní a mikrodiluční metoda tedy byla pro testování synergie vhodnější než disková.

Práce využívající mikrodiluční metodu a zároveň AgNP o koncentracích nižší než jejich MIC byly publikovány autory Li, Markowska a Singh (42-44 v čl).^{158,271,272} Li a kol. testovali synergický efekt amoxicilinu a AgNP vůči *E. coli*. Ačkoliv amoxicilin není zahrnut v této studii, můžeme výsledky porovnat s ampicilinem na základě jeho podobné chemické struktury, mechanismu účinku a využití k léčbě infekcí. Li a kol. zaznamenali synergický účinek 0,15 g/l amoxicilinu a 5 mg/l AgNP.¹⁵⁸ V porovnání s těmito výsledky jsme dosáhli

lepšího efektu kombinací 0,03 mg/l ampicilinu a 2,5 mg/l AgNP. Singh a kol. pozorovali zvýšený účinek různých antibiotik v kombinaci s AgNP, nejlepších výsledků však také dosáhly při použití beta-laktamových antibiotik.²⁷² Autoři Markowska a kol. prokázali synergní účinek u ampicilinu, streptomycinu, rifampicinu a tetracyklinu.²⁷¹ Kombinace AgNP s oxacilinem, ciprofloxacinem, meropenemem a ceftazidimem žádný synergický účinek neprojevila na rozdíl od této práce, kde se osvědčilo široké spektrum antibiotik s různými mechanismy účinku a chemickou strukturou proti různým bakteriálním kmenům za použití mikrodiluční metody. Dalším významným zjištěním bylo obnovení citlivosti bakterií *E. coli* rezistentních k ampicilinu antibiotikům (MIC antibiotika klesla pod hodnotu breakpointu) v kombinaci s AgNP. Tento efekt byl dříve popsán v práci Brown a kol., kteří prokázali, že AgNP funkcionalizované ampicilinem byly účinné proti *E. coli* rezistentní k ampicilinu.¹⁶⁰ Tento mechanismus vedoucí ke zvýšení citlivosti bakterií k antibiotiku po aplikaci s AgNP nebo dokonce k obnovení citlivosti bakterie by mohl být vysvětlen nespecifickým antibakteriálním působením AgNP. AgNP a antibiotika inhibující syntézu buněčné stěny mohou kooperovat v narušování buněčné stěny. AgNP může usnadňovat přenos hydrofilních antibiotik k povrchu buňky, zvyšovat permeabilitu membrány a tím umožnit lepší vstup antibiotik do buňky. Inhibice aktivity bakteriálních enzymů, díky kterým jsou bakterie rezistentní, může být dalším mechanismem, jak AgNP obnovují účinek antibiotika a citlivost bakterií.

Zajímavým faktem bylo, že synergický efekt všech použitých antibiotik v kombinaci s AgNP proti všem Gram-negativním a Gram-pozitivním bakteriím byl podobný bez výraznějších rozdílů v závislosti na typu antibiotika, jejich mechanismu účinku nebo chemické struktury, z čehož lze usuzovat, že synergický efekt antibiotika a AgNP je nespecifický. AgNP nepůsobí toxicky vůči bakteriím pouze jediným způsobem, např. poškozením buněčné stěny nebo inhibicí proteosyntézy či syntézy nukleových kyselin jako antibiotika. Je známo, že AgNP působí na více buněčných úrovních, mění permeabilitu membrány,²⁷³ membránový potenciál²⁷⁴ a akumulují se v membráně, což vede k tvorbě tzv. „pits“ v buněčné stěně.²⁷⁵ Také ovlivňují metabolismus purinů a inhibují enzymy jako je tryptofanáza nebo enzymy respiračního řetězce a narušují tak důležité metabolické procesy v bakteriích.²⁷³ Při aerobních podmínkách se uvolňují ionty stříbra z povrchu nanočástic, které vstupují do buněk a následně se tvoří ROS, které poškozují DNA, RNA, proteiny a lipidy.²⁷⁶ Negativní působení AgNP na buňku různými způsoby vede k celkovému oslabení mechanismu rezistence bakterie, která pak ztrácí svoji schopnost odolávat působení antibiotik.

Absence nežádoucí cytotoxicity je důležitá pro potenciální využití AgNP v medicíně, kde by preparáty, pomůcky nebo např. implantáty obsahovaly AgNP v kombinaci s antibiotiky pro zamezení rozvoje infekce. Společně s antibakteriální aktivitou byla tedy rovněž posuzována cytotoxicita samotných AgNP a některých vybraných antibiotik a také jejich kombinace v koncentracích, které vykazovaly antibakteriální účinnost (tab. 10). Také byl hodnocen index toxicity LD₅₀ vybraných antibiotik, AgNP a jejich kombinace. Metodika testování cytotoxicity byla mírně pozměněna, aby se zamezilo potenciálnímu aditivnímu vlivu antibiotik, která jsou při kultivaci buněk standardně přítomna. Buňky NIH/3T3 byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium, Life Technologies) bez suplementace antibiotiky během třech pasáží, aby byly získány buňky bez antibiotik. Poté byly buňky nasazeny do 96jamkové destičky (TPP, Biotech) o hustotě 2×10^4 buněk na jamku. Po 4 hodinách byly k buňkám přidány toxikanty a destičky byly inkubovány v inkubátoru s vlhčenou atmosférou s obsahem 5 % CO₂ při 37 °C po dobu 24 hodin. Následně bylo do každé jamky přidáno 20 µl roztoku thiazolylové modře (MTT, 5 mg/ml). Po 4 hodinách byl roztok MTT odstraněn a k vytvořeným formazanovým krystalům bylo přidáno 100 µl dimethylsulfoxidu. Absorbance byla měřena při 570 nm na čtečce destiček Infinite PRO M200 (Tecan, Rakousko). Počet přeživších buněk byl vypočítán jako podíl absorbance vzorku a absorbance kontroly násobený 100krát a vyjádřen v procentech životaschopnosti. Každá koncentrace byla testována v tripletu a celý experiment byl opakován dvakrát.

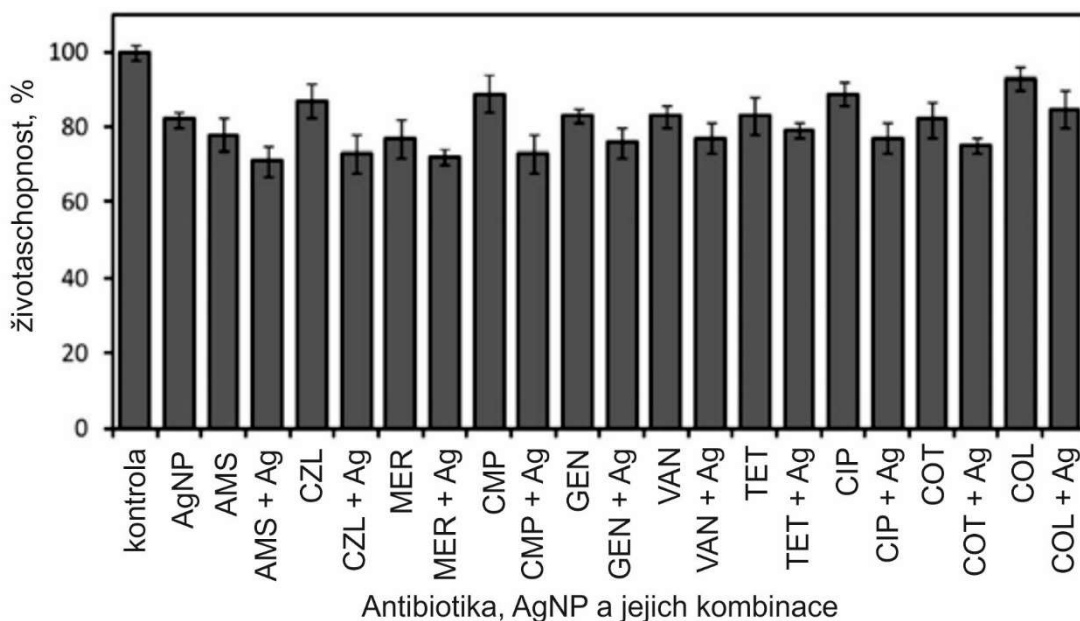
Tabulka 10. Koncentrace AgNP a antibiotik použité při určování cytotoxicity.

AgNP/ATB	MIC [mg/l]	koncentrace nižší než MIC [mg/l]
Ag NP	7,5	2,5
AMS	8	0,003
CZL	2	0,0019
MER	1	0,0019
CMP	4	0,00048
GEN	0,5	-
VAN	1	-
TET	4	-
CIP	0,25	-
COT	4	-
COL	0,5	-

Hodnoty parametru LD₅₀ antibiotik se pohybovaly od 120 mg/l do 250 mg/l v závislosti na použitém antibiotiku (tab. 11). Po kombinaci s AgNP index LD₅₀ klesl na hodnoty 90 mg/l až 180 mg/l (7,5 mg/l AgNP) a 80 mg/l až 150 mg/l (15 mg/l AgNP). V případě hodnocení cytotoxicity v koncentracích antibiotik rovných MIC inhibovala antibiotika samotná životaschopnost buněk pouze slabě na 80 % až 90 % oproti kontrole (obr. 8). V případě AMS odpovídala životaschopnost buněk 78 % a v případě MER 77 %, což se dá také považovat za slabý pokles. AgNP samotné v koncentraci odpovídající jejich MIC také slabě ovlivnily životaschopnost buněk, která oproti kontrole klesla na 82 %. Hodnota LD₅₀ AgNP byla stanovena na 30 mg/l. Po kombinaci antibiotik s AgNP klesla jejich životaschopnost na hodnoty v rozsahu 71 % až 80 % ve srovnání s kontrolou.

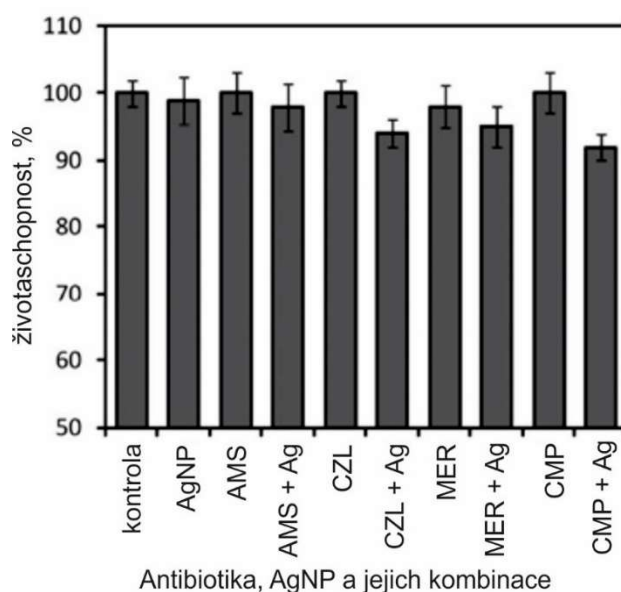
Tabulka 11. Index toxicity LD₅₀ [mg/l] antibiotik bez AgNP a v kombinaci s AgNP o koncentraci 7,5 mg/l a 15 mg/l.

	AMS	CZL	MER	CMP	GEN	VAN	TET	CIP	COT	COL
Atb + 0 mg/l AgNP	160	200	250	200	250	200	200	120	120	120
Atb + 7,5 mg/l AgNP	100	130	180	150	180	150	180	100	100	100
Atb + 15 mg/l AgNP	80	90	130	100	150	100	150	90	90	80



Obrázek 8. Životaschopnost buněk po aplikaci antibiotik, AgNP a jejich kombinace v koncentracích rovných MIC.

Největší cytotoxický vliv byl zaznamenán u antibiotik AMS, CZL, MER a CMP v kombinaci s AgNP, životaschopnost buněk klesla na 71 %, 73 %, 72 % a 73 %. Kombinace antibiotik a AgNP v koncentracích rovných MIC, které inhibovaly savčí buňky nejvíce, byly dále použity v testech cytotoxicity, tentokrát v koncentracích pod jejich MIC. Za použití antibiotik a AgNP v takto nízkých koncentracích samostatně, nebyla pozorována žádná inhibice životaschopnosti buněk oproti kontrole. Byla-li antibiotika kombinována s AgNP, poklesla životaschopnost buněk na 90 % až 95 % ve srovnání s kontrolou (obr. 9)

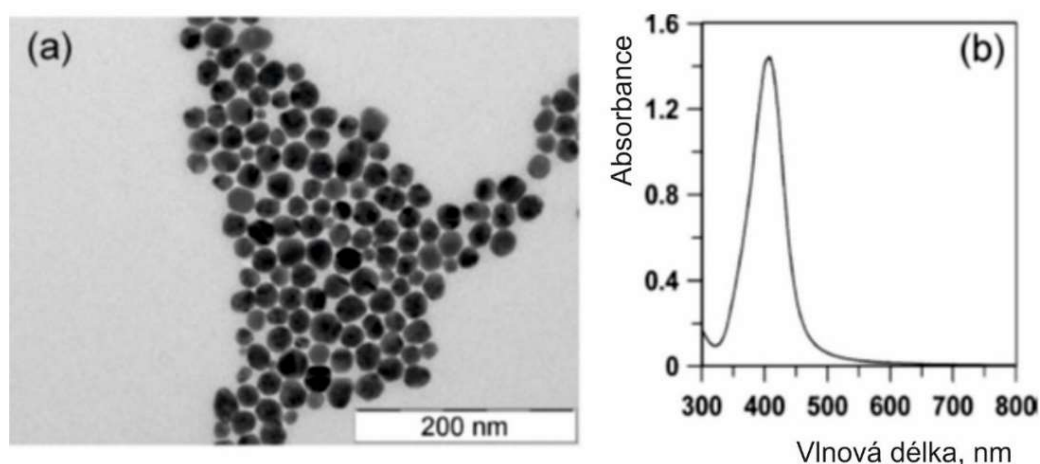


Obrázek 9. Životaschopnost buněk po aplikaci antibiotik, AgNP a jejich kombinace v koncentracích nižších než MIC.

Kombinace antibiotik s AgNP vykazovala synergické antibakteriální účinky při tak nízkých koncentracích AgNP, které nebyly cytotoxické pro buňky NIH/3T3. Žádné z antibiotik ani AgNP v koncentracích rovných MIC neprojevily výraznou toxicitu a při jejich kombinaci v koncentracích pod jejich MIC bylo zaznamenáno pouze mírné snížení životaschopnosti buněk. Jak bylo dříve publikováno AgNP samy o sobě v koncentraci nižší než 30 mg/l nejsou cytotoxické pro lidské buňky, nevykazují toxické účinky vůči krvi a vůči environmentálně významným organismům.^{34,35,277,278} Dosud nebyla pozorována žádná toxicita komerčně dostupných AgNP na člověka v nízkých koncentracích (viz kapitolu 6.3).

9. Synergie AgNP a antibiotik vůči multirezistentním enterobakteriím^d

Podobně jako v předchozím případě i v této studii byly použity AgNP o velikosti 28 nm připravené pomocí modifikované Tollensovy metody a stabilizovány 0,05% želatinou. AgNP dosahovaly průměrné velikosti 28 nm s velmi úzkou distribucí velikostí, jak potvrdily snímky z TEM (obr. 10a). Pík povrchové plazmonové rezonance byl zaznamenán u 405 nm (obr. 10b), což odpovídá částicím těchto velikostí.



Obrázek 10. Snímky z TEM (a) a UV/Vis absorpční spektra (b) AgNP vyjadřující úzkou distribuci velikosti částic.

Pro testování antibakteriální aktivity byly použity tyto bakterie: ESBL-pozitivní *E. coli* (ESBL – širokospektré beta-laktamázy), ESBL-pozitivní *K. pneumoniae*, AmpC-pozitivní *E. coli* (AmpC – cefalosporinázy) a KPC-pozitivní *K. pneumoniae* (KPC – karbapenemázy). Jako kultivační médium bylo použito médium M.-H. (Becton, Dickinson and Company). Každý kmen byl identifikován standardními mikrobiologickými metodami pomocí automatického systému Phoenix (Becton Dickinson) a MALDI-TOF (matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s hmotnostním analyzátozem) doby letu Biotyper (Bruker Daltonics). Všechny kmeny byly testovány na přítomnost genů kódujících produkci

^d Výsledky publikovány v: Panáček, A., Smékalová, M., Večeřová, R., Bogdanová, K., Röderová, M., Kolář, M., Kilianová, M., Hradilová, Š., Froning, J. P., Havrdová, M., Pucek, R., Zbořil R. a Kvítek, L. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant Enterobacteriaceae. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 142, 392–399 (2016).

enzymů ESBL a AmpC použitím specifického setu primerů.²⁷⁹ Karbapenemázové geny byly amplifikovány pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce) podle metody uvedené v publikaci Monteiro a kol.²⁸⁰ Vybrané vzorky byly sekvenovány.

Při testování kombinovaného účinku s AgNP byla použita tato antibiotika: cefotaxim (COX), ceftazidim (CZD), meropenem, ciprofloxacín a gentamicin.

Pro stanovení MIC AgNP, antibiotik a jejich kombinace byla využita šachovnicová diluční metoda. Antibiotika a AgNP byly odděleně ředěny médiem M.-H. geometrickou řadou. Koncentrace AgNP po přípravě byla 108 mg/l a konečné koncentrace po ředění byly následující: 54, 27, 13,5, 6,8, 3,4, 1,7, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1 a 0,05 mg/l. Při určování synergie byly sledovány MIC každého antibiotika v kombinaci se 4 různými koncentracemi AgNP vždy pod hodnotou MIC AgNP, tedy $MIC_{Ag}/2$, $MIC_{Ag}/4$, $MIC_{Ag}/8$ and $MIC_{Ag}/16$. Pro každé testování antibakteriálního účinku byla použita čerstvá suspenze bakterií. Bakterie byly kultivovány po 24 hodin při 35 °C na krevním agaru a poté bylo připraveno inokulum, jehož optická hustota byla měřena denzitometrem (Densi-La-Meter, LACHEMA, Česká republika). Kolonie bakterií byla suspendována v roztoku NaCl, tak aby konečná optická hustota dosáhla hodnoty 0,5 McFarlandovy stupnice zákalu, což odpovídá přibližně $1-2 \times 10^8$ CFU/ml *E. coli*. Poté se inokulum ředilo M.-H. médiem na koncentraci 10^6 CFU/ml. Hodnocení antibakteriální aktivity bylo provedeno podle testovacích protokolů CLSI (Ústav pro klinické a laboratorní standardy) a EUCAST (Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti) a MIC byla určena jako nejnižší koncentrace testovaných látek, která viditelně inhibuje růst bakterií po 24 hodinách (35 °C) a následně byla inhibice potvrzena přeočkováním na M.-H. agar (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Nakonec byl vypočítán FIC index. Účinek byl hodnocen podle kritérií: synergie ($FIC \leq 0,5$), aditivita ($0,5 < FIC \leq 1$), indiference ($1 < FIC \leq 2$) a antagonismus ($FIC > 2$). (viz kapitola 3).

Připravené AgNP stabilizované želatinou projevily vysokou antibakteriální aktivitu vyjádřenou velmi nízkými MIC (tab. 12). Růst multirezistentních bakterií byl inhibován při aplikaci AgNP v koncentracích řádově jednotek mg/l. Největší aktivita AgNP se projevila u ESBL-pozitivní *E. coli* (MIC = 0,8 mg/l), naopak nejvyšší koncentrace AgNP musela být použita pro inhibici růstu ESBL-pozitivní *K. pneumoniae* (MIC = 6,75 mg/l). V tabulce 12 jsou také uvedeny MIC antibiotik a jejich breakpointy (EUCAST)²⁸¹ pro rozlišení senzitivních a rezistentních kmenů.

Tabulka 12. Experimentálně určené MIC AgNP a antibiotik a klinické breakpointy dle databáze EUCAST pro testované multirezistentní kmeny bakterií

bakterie	MIC AgNP [mg/l]	MIC/breakpoint antibiotik [mg/l]				
		COX	CZD	MER	CIP	GEN
ESBL-pozitivní <i>E. coli</i>	0,8	4/1 (R) ^a	16/1 (R)	0,06/2 (S)	> 32/0,5 (R)	0,5/2 (S)
AmpC-pozitivní <i>E. coli</i>	3,4	8/1 (R)	32/1 (R)	0,06/2 (S)	32/0,5 (R)	0,5/2 (S)
KPC-pozitivní <i>K. pneumoniae</i>	3,4	> 16/1 (R)	> 64/1 (R)	> 32/2 (R)	> 32/0,5 (R)	1/2 (S)
ESBL-pozitivní <i>K. pneumoniae</i>	6,75	> 32/1 (R)	32/1 (R)	0,06/2 (S)	0,2/0,5 (S)	> 32/2 (R)

^aR – rezistentní kmen; S – citlivý kmen

Tabulky 13–16 shrnují MIC AgNP a vypočítané FIC indexy kombinace AgNP s různými antibiotiky. AgNP významně zvyšovaly aktivitu antibiotik vůči testovaným multirezistentním kmenům. U všech kombinací byla pozorována synergie. Výjimku tvořila pouze KPC-pozitivní *K. pneumoniae*, kdy byl kombinovaný účinek AgNP a COX pouze aditivní.

Na rozdíl od bakterií rezistentních k antibiotikům se u citlivých bakterií neprojevil kombinovaný účinek tak markantně. Pouze dvě ze sedmi kombinací AgNP s antibiotiky působily synergicky (AgNP-GEN proti ESBL-pozitivní *E. coli* a AmpC-pozitivní *E. coli*), dvě kombinace byly aditivní (AgNP-CIP proti ESBL-pozitivní *K. pneumoniae* a AgNP-GEN proti KPC-pozitivní *K. pneumoniae*) a tři indiferentní (AgNP-MER proti ESBL-pozitivní *E. coli*, AmpC-pozitivní *E. coli* a ESBL-pozitivní *K. pneumoniae*). Meropenem má silné antibakteriální účinky sám o sobě, a proto kombinovaný účinek s AgNP byl v případě MER-citlivých bakterií pouze aditivní nebo indiferentní. Navíc se u meropenemu nikdy nesnížila MIC meropenemu v kombinaci s AgNP pod hodnotu 0,06 mg/l, tedy MIC meropenemu samotného.

AgNP úspěšně posilovaly účinek antibiotik ve všech koncentracích, dokonce i při koncentraci MIC_{Ag}/16. Nejlepších výsledků však bylo dosaženo při aplikaci AgNP v koncentracích MIC_{Ag}/2 a MIC_{Ag}/4, kdy MIC antibiotik dosahovaly řádově 100násobně nižších hodnot, což jsou hodnoty nižší, než jsou hodnoty jejich breakpointů. Všechny testované multirezistentní bakterie se tak při kombinaci antibiotika s AgNP v subinhibičních koncentracích staly k antibiotikům opět citlivé. V koncentraci AgNP rovné MIC_{Ag}/8 byly MIC antibiotika rovny hodnotě breakpointu nebo nižší v těchto případech: ESBL-pozitivní *E. coli* exponovaná COX nebo CIP, AmpC-pozitivní *E. coli* exponovaná COX a ESBL-

pozitivní *K. pneumoniae* exponovaná COX, CZD a GEN. Snížení hodnot MIC antibiotik na nebo pod úroveň breakpointu nebylo pozorováno v případě KPC-pozitivní *K. pneumoniae*. V nejnižší koncentraci AgNP, tedy MIC_{Ag}/16, MIC antibiotik, které byly rovny nebo nižší než hodnota breakpointu, byly zaznamenány pouze v případě COX proti všem testovaným multirezistentním bakteriím kromě KPC-pozitivní *K. pneumoniae*. V případě ostatních antibiotik se jejich MIC nesnížila pod hranici breakpointu nebo se nesnížila vůbec. Koncentrace AgNP rovna MIC_{Ag}/8 a především MIC_{Ag}/16 byly hraniční, protože se začal vytrácet zvýšený antibakteriální účinek kombinace AgNP a antibiotik.

Tabulka 13. MIC [$\mu\text{g/mL}$] antibiotik (atb) a výsledky kombinace atb s AgNP o koncentracích nižších než MIC (0,8 mg/l) pro ESBL-pozitivní *E. coli*

atb/AgNP	COX		CZD		MER		CIP		GEN	
	MIC	FIC ^a	MIC	FIC	MIC	FIC	MIC	FIC	MIC	FIC
atb + 0 mg/l AgNP	4	0,40 (0,1)	16	0,36 (0,13)	0,06	1,23 (0,19)	> 32	0,22 (0,16)	0,5	0,50 (0,17)
atb + 0,4 mg/l AgNP	0,03	S	0,125	S	0,06	I	0,125	S	0,125	S
atb + 0,2 mg/l AgNP	0,125		0,125		0,06		0,125		0,125	
atb + 0,1 mg/l AgNP	1		2		0,06		0,5		0,125	
atb + 0,05 mg/l AgNP	1		16		0,06		2		0,125	

a – průměrná hodnota FIC a směrodatná odchylka, n = 3; S, synergie, I, indiference

Tabulka 14. MIC [$\mu\text{g/mL}$] antibiotik (atb) a výsledky kombinace atb s AgNP o koncentracích nižších než MIC (3,4 mg/l) pro AmpC-pozitivní *E. coli*.

atb/AgNP	COX		CZD		MER		CIP		GEN	
	MIC	FIC ^a	MIC	FIC	MIC	FIC	MIC	FIC	MIC	FIC
atb + 0 mg/l AgNP	8	0,28 (0,1)	32	0,28 (0,1)	0,06	1,23 (0,2)	32	0,34 (0,11)	0,5	0,48 (0,2)
atb + 1,7 mg/l AgNP	0,03	S	0,125	S	0,06	I	0,125	S	0,125	S
atb + 0,8 mg/l AgNP	0,03		0,125		0,06		0,125		0,125	
atb + 0,4 mg/l AgNP	1		2		0,06		8		0,125	
atb + 0,2 mg/l AgNP	1		8		0,06		16		0,125	

a – průměrná hodnota FIC a směrodatná odchylka, n = 3; S, synergie, I, indiference

Tabulka 15. MIC [$\mu\text{g/mL}$] antibiotik (atb) a výsledky kombinace atb s AgNP o koncentracích nižších než MIC (3,4 mg/l) pro KPC-pozitivní *K. pneumoniae*.

atb/AgNP	COX		CZD		MER		CIP		GEN	
	MIC	FIC ^a	MIC	FIC	MIC	FIC	MIC	FIC	MIC	FIC
atb + 0 mg/l AgNP	> 16	0,59 (0,26)	> 64	0,38 (0,26)	> 32	0,37 (0,25)	> 32	0,33 (0,11)	1	0,55 (0,3)
atb + 1,7 mg/l AgNP	0,03	A	0,125	S	0,06	S	0,125	S	0,125	A
atb + 0,8 mg/l AgNP	2		0,125		0,06		0,5		0,125	
atb + 0,4 mg/l AgNP	> 16		2		4		8		0,125	
atb + 0,2 mg/l AgNP	> 16		> 64		> 32		16		1	

a – průměrná hodnota FIC a směrodatná odchylka, n = 3; S, synergie, A, aditivita, I, indiference

Tabulka 16. MIC [$\mu\text{g/mL}$] antibiotik (atb) a výsledky kombinace atb s AgNP o koncentracích nižších než MIC (6,8 mg/l) pro ESBL-pozitivní *K. pneumoniae*.

atb/AgNP	COX		CZD		MER		CIP		GEN	
	MIC	FIC ^a	MIC	FIC	MIC	FIC	MIC	FIC	MIC	FIC
atb + 0 mg/l AgNP	> 32	0,18 (0,14)	32	0,20 (0,14)	0,06	1,23 (0,2)	0,2	0,98 (0,16)	> 32	0,33 (0,16)
atb + 3,4 mg/l AgNP	0,03	S	0,125	S	0,06	A	0,125	A	0,125	S
atb + 1,7 mg/l AgNP	0,03		0,125		0,06		0,125		1	
atb + 0,8 mg/l AgNP	0,03		0,125		0,06		0,2		2	
atb + 0,4 mg/l AgNP	1		2		0,06		0,2		16	

a – průměrná hodnota FIC a směrodatná odchylka, n = 3; S, synergie, A, aditivita

Enterobakterie jsou Gram-negativní bakterie, které se přirozeně vyskytují ve střevech. Jsou indikátorem fekálního znečištění. Představují nejčastější patogen člověka, i když většina kmenů je pro člověka neškodná. Mohou způsobovat vážná onemocnění (např. *Shigella*, *Salmonella*, některé kmeny *E. coli*). Mezi infekce patří například bakterémie, pneumonie, vedlejší infekce při operacích a infekce močového traktu, průjmy. Jsou častým původcem nosokomiálních infekcí. Nejvíce jsou riziku vystaveni pacienti na jednotkách intenzivní péče, děti a lidé s poruchou imunity. Navíc se zvyšující se odolností enterobakterií vůči cefalosporinům třetí a čtvrté generace a fluorochinolům a karbapenemům se zužuje možnost volby léčby. Řešením by mohla být kombinace antibiotik s AgNP, které zvyšují jejich účinek a v některých případech znovuobnovují citlivost bakterií, které jsou k danému antibiotiku rezistentní. Posílený účinek antibiotik pomocí AgNP byl prokázán v mnoha

studiích (viz kapitolu 4). Avšak ne vždy byl výsledný účinek synergní, ale pouze aditivní a použité bakterie byly k antibiotikům samotným vesměs citlivé.

V této studii bylo prokázáno, že AgNP značně zvyšují účinek antibiotik vůči multirezistentním bakteriím ve velmi nízkých koncentracích. Posílený antibakteriální účinek se projevil u všech testovaných antibiotik, obzvláště u těch, ke kterým byly bakterie rezistentní. U citlivých bakterií se kombinovaný efekt neprojevil tak výrazně. Účinek byl pouze ve dvou případech ze sedmi synergický, ve třech aditivní a ve zbytku indiferentní. Antibakteriální účinek byl totiž u citlivých bakterií silný již v případě použití samotných AgNP. Např. u meropenemu se synergie projevila pouze u rezistentní bakterie. I přes synergní účinek však neklesla hodnota MIC kombinace AgNP a meropenemu pod hodnotu MIC meropenemu vůči citlivým bakteriím.

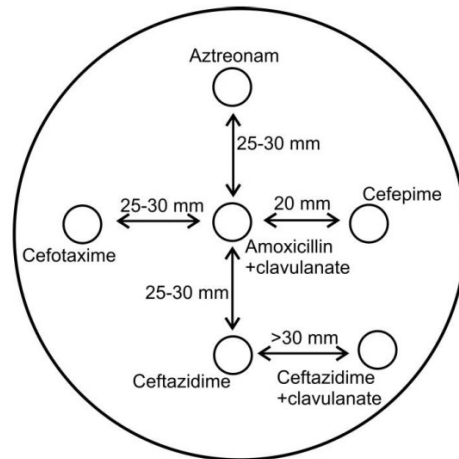
AgNP velmi výrazně posilovaly účinek antibiotik ve všech testovaných koncentracích. Nejvíce byl zesílen účinek antibiotik při $MIC_{Ag}/2$ a $MIC_{Ag}/4$, kdy MIC antibiotik dosahovaly až 100násobně nižších hodnot a v případě rezistentních bakterií se hodnoty MIC dostaly pod breakpointy a staly se tak z tohoto pohledu opět citlivými k antibiotikům. Při $MIC_{Ag}/8$ a $MIC/Ag16$ kombinovaný účinek také nebyl zanedbatelný, avšak tato zředění byla hraniční, protože MIC antibiotik se pohybovaly mírně pod breakpointy nebo jim byly rovny, a posílený účinek antibiotik se začal postupně vytrácet.

Existují různé publikace, které se zabývají synergii AgNP a antibiotik vůči citlivým ale i rezistentním bakteriím. Markowska a kol. zkoumali synergii streptomycinu a rifampicinu s AgNP vůči *P. aeruginosa*. Avšak synergii pozorovali pouze u citlivého kmene k antibiotiku, rezistentní *P. aeruginosa* k streptomycinu a rifampicinu si svoji rezistenci zachovala i přes kombinaci antibiotik s AgNP.²⁷¹ Také Singh a kol. testovali možný synergní účinek AgNP a antibiotik vůči citlivým i rezistentním bakteriím, zde však použitím diskové difuzní metody.²⁷² Kombinovaný účinek byl většinou slabý. Při experimentech použili AgNP o koncentraci 30 μg na disk, což byla koncentrace, při které AgNP samy vykazovala antibakteriální účinek. Za použití diluční metody však poté potvrdili synergii AgNP a antibiotik u citlivých i rezistentních bakterií. Koncentrace AgNP byla 75 mg/l, což je sice koncentrace menší než MIC, ale je již cytotoxická pro lidské buňky, což tedy vylučuje aplikaci v praxi.^{56,171} V této studii bylo potřeba k vyvolání synergie řádově 100krát nižších koncentrací AgNP. Brown a kol. pozorovali synergii zlatých a stříbrných nanočástic funkcionalizovaných ampicilinem. Synergický účinek se objevil dokonce i u multirezistentních kmenů bakterií *P. aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* a MRSA.¹⁶⁰ AgNP však byly použity v relativně vysokých koncentracích v porovnání se zde

prezentovanými výsledky. Sen a kol. studovali synergický efekt 15 mg/l AgNP v kombinaci s 50 mg/l ampicilinu, 10 mg/l azitromycinu, 10 mg/l cefepimu a 20 mg/l tetracyklinu u rezistentních bakterií. Samotné AgNP o této koncentraci však inhibovaly růst 50 % testovaných bakterií při použití samotných AgNP v této koncentraci.²⁸²

Synergní efekt a posílení účinku antibiotik pomocí AgNP může být vysvětlen již zmíněným více úrovnovým působením stříbra na buněčné struktury a metabolické procesy. Díky tomuto mnohaúrovňovému mechanismu účinku mohou AgNP zabíjet patogenní mikroorganismy nebo inhibovat jejich růst, a to včetně vysoce rezistentních bakteriálních kmenů řádově v koncentracích jednotek g/l až desítek mg/l.^{2,29,34,63,274} Při koncentracích AgNP pod hodnoty MIC svoji aktivitu ztrácí, ale do jisté míry mohou ještě poškozovat buněčnou stěnu a zvyšovat permeabilitu membrány a ovlivňovat bakteriální metabolické procesy. Stříbro také může inhibovat produkci enzymů, které způsobují rezistenci nebo dokonce přímo inhibovat proces hydrolýzy antibiotik. Inhibice degradace antibiotik enzymy ESBL, AmpC a KPC může nastat buď přímou inaktivací enzymu nebo změnami ve struktuře antibiotika chemickou nebo fyzikální interakcí molekuly antibiotika a povrchem AgNP, které se mohou na antibiotikum adsorbovat.

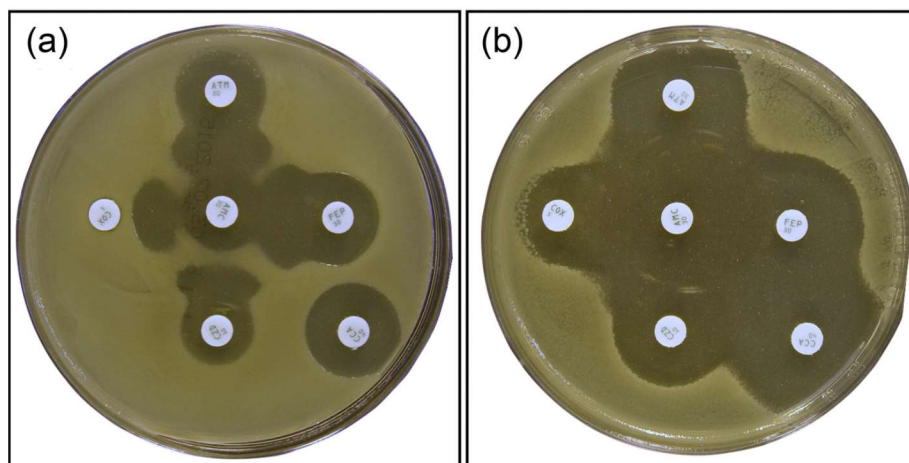
Pro detekci produkce beta-laktamáz bakteriemi, které byly exponovány antibiotikům a kombinaci antibiotika a AgNP, byl použit test DDST (double-disk synergy test, diskový difuzní test s inhibitorem betalaktamáz) ve shodě s metodologií EUCAST.²⁸³ Antibiotické disky cefotaximu, aztreonamu (ATM), cefepimu (FEP), ceftazidimu, ceftazidimu + klavulanátu (CCA) a amoxilinu + klavulanátu (AMC) pro double disk synergy test byly zakoupeny od firmy Bio Rad (Francie). DDST spočívá v inhibici beta-laktamáz inhibitorem kyselinou klavulanovou. V případě pozitivního výsledku se zvětší inhibiční zóna a rozšíří se směrem k disku, který obsahuje inhibitor. Tvoří se tak charakteristický tvar zóny mezi disky s inhibitorem a bez něj (obr. 11).¹⁶⁹ Při DDST byly na agarové půdy umístěny disky s COX, ATM, FEP a CZD v požadované vzdálenosti od disku, který obsahoval AMC. Zároveň byl na agar umístěn disk obsahující CCA v požadované vzdálenosti od disku s CZD (obr. 11).



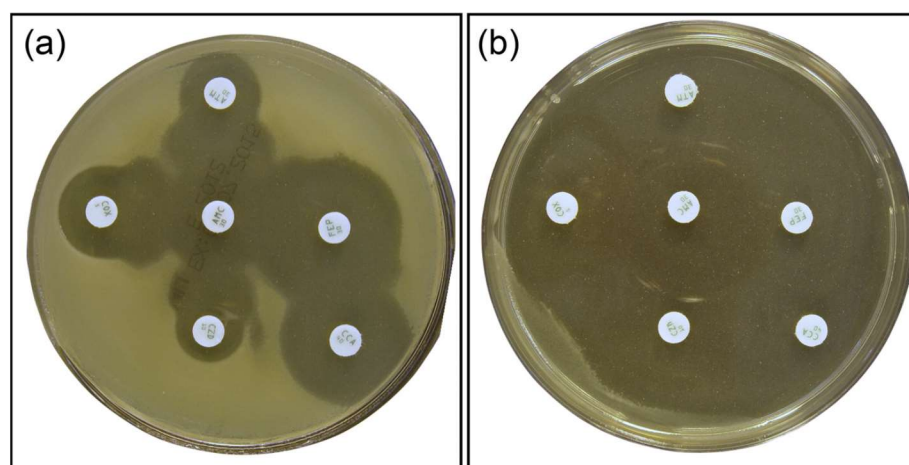
Obr. 11. DDST pro detekci ESBL.

Test byl považován za pozitivní na přítomnost ESBL, pokud se rozšířila inhibiční zóna cefalosporinu nebo aztreonamu směrem k disku s amoxicilin-klavulanátem a pokud byla inhibiční zóna kolem disku s ceftazidimem-klavulanátem větší než kolem disku se samotným ceftazidimem. Všechny testy byly vyhodnocovány po 24 hodinové inkubaci při 37 °C. Kombinovaný účinek antibiotik a AgNP byl poté testován tak, že disperze AgNP byla přidána do ještě tekutého agarů v takové koncentraci, která dosahovala poloviční hodnoty MIC, což je dostačující pro zřetelný synergický efekt. Pro ESBL-pozitivní *K. pneumoniae* činila polovina MIC 3 mg/l a pro ESBL-pozitivní *E. coli* 0,4 mg/l.

U obou kmenů byly testy pozitivní na produkci beta-laktamázu. Po kultivaci na agaru bez AgNP se objevily typické inhibiční zóny aztreonamu a cefalosporinů protáhlé směrem k amoxicilin/klavulanátu (obr. 12a a 13a). Také inhibiční zóna ceftazidimu/klavulanátu byla zvětšená ve srovnání s inhibiční zónou ceftazidimu. Naopak produkce ESBL nebyla detekovaná, pokud byly bakterie kultivovány na agaru s 0,4 mg/l (ESBL-pozitivní *E. coli*) a 3 mg/l (ESBL-pozitivní *K. pneumoniae*) AgNP. Nebyly pozorovány protáhlé zóny směrem k amoxicilin/klavulanátu a zvětšené zóny ceftazidimu/klavulanátu (obr. 12b a 13b) a jasně byl zřetelný synergický efekt AgNP a antibiotik, jak je zřejmé z velkých inhibičních zón kolem každého antibiotika.



Obrázek 12. Pozitivní (a) a negativní (b) detekce produkce ESBL ESBL-pozitivní *E. coli* exponované antibiotikům (a) a antibiotikům v kombinaci s AgNP (b).



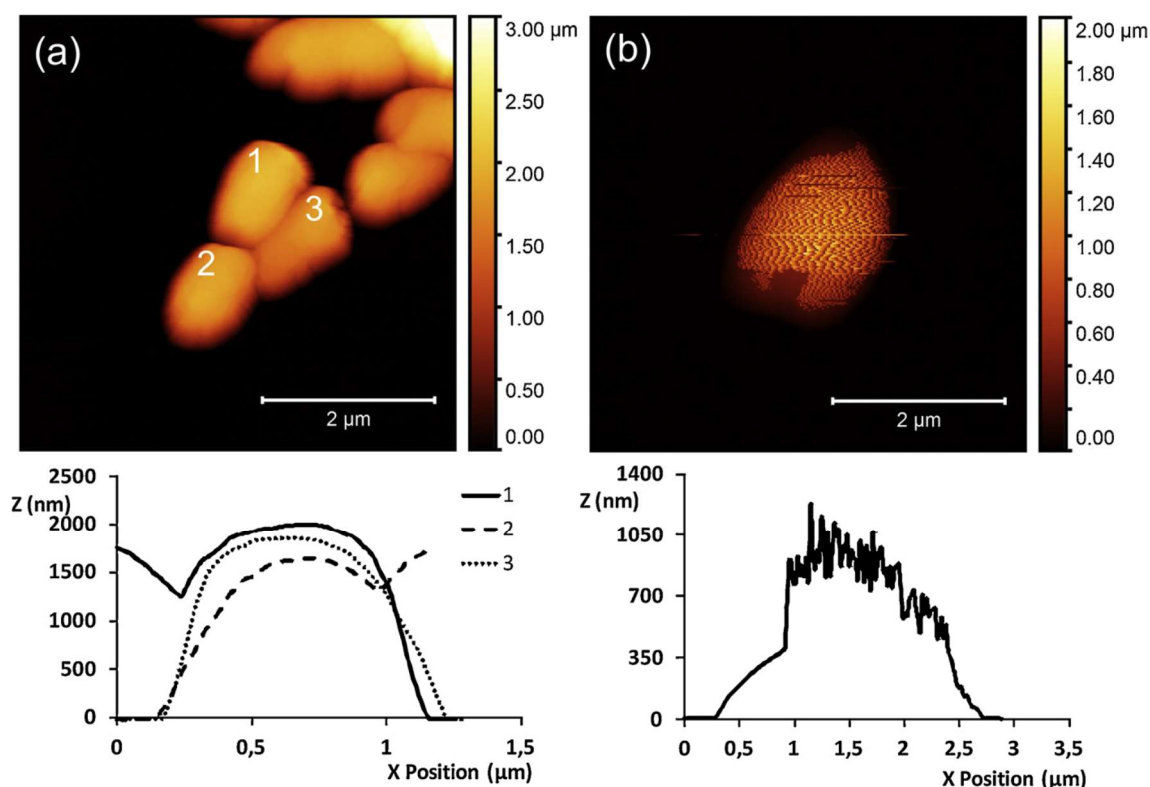
Obrázek 13. Pozitivní (a) a negativní (b) detekce produkce ESBL ESBL-pozitivní *K. pneumoniae* exponované antibiotikům (a) a antibiotikům v kombinaci s AgNP (b).

Mechanismus spolupůsobení AgNP a antibiotik založený na obnově aktivity antibiotika byl také potvrzen pomocí AFM. Pro tyto účely byla ESBL-pozitivní *K. pneumoniae* kultivována v přítomnosti 1 mg/l cefotaximu a 0,01 mg/l cefotaximu kombinovaného s 1,7 mg/l AgNP v M.-H. médiu při 37 °C po dobu 24 hodin. Poté byly bakterie separovány centrifugací a promyty PBS (fosfátový pufr s NaCl, p.a., Sigma-Aldrich). Bakterie byly 1 hodinu fixovány 2% glutaraldehydem (p.a., Sigma-Aldrich) a poté byly třikrát promyty PBS a postupně dehydrovány po 15 minutových krocích v roztocích

ethanolu (30%, 50%, 70% a 90%). Dehydrované bakterie byly deponovány na muskovit (slídu) a byly zobrazeny mikroskopem atomárních sil Ntegra Spectra (NT-MDT, Moskva) v semikontaktním módu pod okolními podmínkami (44–45 % vlhkosti a teplotě 22–23 °C).

Bez aplikace AgNP byly bakteriální buňky vystavené antibiotiku nepoškozené, ale při expozici antibiotiku spolu s AgNP bylo obtížné charakterizovat buněčnou stěnu. To bylo dáno sníženou rigiditou buněčné stěny a tedy obnovením aktivity cefotaximu v subinhibiční koncentraci, který jakožto beta-laktamové antibiotikum, inhibuje tvorbu buněčné stěny. Buňky se také jevily plošší a širší.

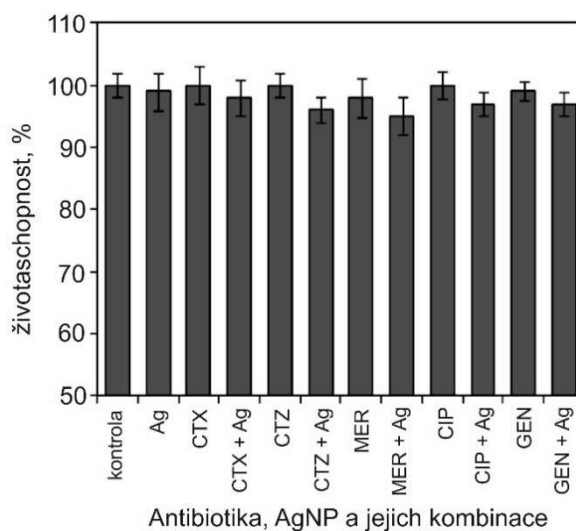
Buňky vystavené působení cefotaximu bez kombinace s AgNP nevykazovaly dle snímků AFM poškození buněčné stěny (obr. 14a), naopak při současném působení cefotaximu s AgNP byl ve snímku i profilu znatelný šum (obr. 14b). Příčinou byla narušená rigidita buněčné stěny působením antibiotika a tedy obnovení aktivity cefotaximu v subinhibiční koncentraci v kombinaci s AgNP.



Obrázek 14. Snímky z mikroskopu atomárních sil a profil (obr. dole) ESBL-pozitivní *K. pneumoniae* exponované cefotaximu (a) a cefotaximu v kombinaci s AgNP (b).

I v tomto případě byla hodnocena cytotoxicita antibiotik a AgNP s cílem vyloučit případný negativní vliv na savčí buňky. Cytotoxicita byla hodnocena v koncentracích 4 mg/l AgNP a 2 mg/l antibiotika. Stejně koncentrace byly použity v případě jejich kombinace. Metodika testování cytotoxicity byla stejná jako v předchozí kapitole.

Díky jejich účinnosti při velmi nízkých koncentracích jsou AgNP neškodné a nemají žádný cytotoxický vliv na savčí buňky, jak potvrdil test cytotoxicity na buněčné linii NIH/3T3. AgNP, antibiotika i jejich kombinace v koncentracích 2 mg/l a 4 mg/l nebyly cytotoxické vůči savčím buňkám ve srovnání s kontrolními buňkami. Životaschopnost exponovaných buněk AgNP klesla na 97 % (4 mg/l) a 98 % (2 mg/l) ve srovnání s kontrolou, a tedy nebyl pozorován významný cytotoxický vliv AgNP. Pokud byla antibiotika kombinována s AgNP, životaschopnost savčích buněk mírně klesla na 98 % až 95 % ve srovnání s kontrolou v závislosti na použitém antibiotiku (obr. 15). Jak jsme ukázali, synergický antibakteriální účinek však nastává při mnohem nižších koncentracích stříbra, a proto můžeme jakýkoliv cytotoxický vliv kombinace AgNP s antibiotiky vyloučit pro koncentrace efektivní vůči rezistentním kmenům.



Obrázek 15. Životaschopnost buněk NIH/3T3 exponovaných AgNP, antibiotikům a kombinaci AgNP a antibiotik.

10. Tvorba rezistence bakterií k AgNP a její překonání^e

O nanočásticích stříbra se uvažuje jako o prostředku, který by mohl nahradit nebo doplnit klasická antibiotika, ke kterým si bakterie rychle a snadno tvoří rezistenci. Nanočástice stříbra mají skvělé antibakteriální vlastnosti a zvyšují účinek antibiotik, jsou-li použity společně. Dalším využitím by mohla být různé obvazy např. k léčbě popálenin, diabetické nohy a jinde, kde je potřeba eliminaci vzniku bakteriální infekce. Nabízí se také využití ve formě kapek, mastí nebo sprejů které se již dnes využívají ve veterinární praxi. V těchto případech se již o mnoho let dříve úspěšně využívalo iontové stříbro.⁴⁵

Logickou otázkou tedy je, zda si bakterie také jednoduše nevytvoří rezistenci k AgNP po opakované a dlouhodobé expozici subinhibičním koncentracím. Opakovaná a dlouhodobá expozice je jednou z příčin vzniku rezistence bakterií k antibiotikům. Dosud publikované práce popisovaly pouze rezistenci k iontovému stříbru nebo k stříbrným iontům uvolněným z povrchu AgNP. Jak se však ukázalo, bakterie mohou odolávat i AgNP jako takovým. Mechanismus, kterým bakterie stříbru odolávají, není založen na eliminaci působení iontového stříbra ani oxidativního stresu způsobeného iontovým stříbrem, jak bylo dříve publikováno,^{206,208,209} ale bakterie jsou schopny narušit agregační stabilitu AgNP během opakované kultivace a minimalizovat nebo úplně zrušit jejich antibakteriální účinek.

Tato studie byla provedena s cílem ověřit možnost tvorby rezistence bakterií vůči AgNP. Pro účely této studie byly opět použity AgNP s průměrnou velikostí 28 nm o koncentraci 108 mg/l, které byly připraveny modifikovaným Tollensovým postupem. Navíc byla v této studii připravena stejným způsobem disperze AgNP o koncentraci 432 mg/l, pouze byly koncentrace všech reakčních komponent kromě NaOH čtyřnásobné.

Průměrná velikost a zeta potenciál AgNP byly určeny pomocí metody DLS na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Snímky z TEM byly pořízeny pomocí mikroskopu JEM 2010 (Jeol, Japan) a snímky HRTEM (TEM s vysokým rozlišením) byly pořízeny pomocí mikroskopu TITAN 60–300 (FEI, USA) opatřeným HAADF (detektorem elektronů difraktovaných pod velkými úhly). Dále bylo provedeno chemické mapování pomocí STEM-EDS (rastrovací transmisní elektronová mikroskopie-energieově disperzní spektroskopie) s akvizičním časem 20 min. Absorpční spektra pro záznam píku povrchového

^eVýsledky publikovány v: Panáček, A., Kvítek, L., **Smékalová, M.**, Večeřová, R., Kolář, M., Röderová, M., Dyčka, F., Šebela, M., Pucek, R., Tomanec, O. a Zbořil, R. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology* 13, 65–71 (2018).

plazmonu AgNP byla pořízena UV/Vis spektrofotometrem Specord S 600 (Analytik Jena, Germany).

Pro studium tvorby rezistence byly zvoleny sbírkové bakteriální kmeny, *E. coli* CCM 3954 a *P. aeruginosa* CCM 3955 (Sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně) a *E. coli* 013 (Sbírka Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého). Bakterie byly opakovaně (20krát) vystavovány subinhibičním koncentracím AgNP a rovněž AgNO₃ na mikrotitračních destičkách. Disperze AgNP a AgNO₃ o koncentraci 1 mmol/l (108 mg/l stříbra) byly postupně ředěny M.-H. médiem (Becton, Dickinson and Company) na výsledné koncentrace 54, 27, 13,5, 6,75, 3,38, 1,69 and 0,89 mg/l. Po naředění byla poté do jamek očkována inokula o koncentraci 10⁶ CFU/ml. Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin. Po každém inkubačním kroku se zaznamenaly MIC AgNP a AgNO₃, tedy nejnižší koncentrace testované látky v řadě, která ještě viditelně inhibovala růst mikroorganismů. Ihned po 24 hodinách kultivace bylo z jamek obsahujících tři nejvyšší subinhibiční koncentrace stříbra odebráno 10 µl suspenze bakterií v M.-H. médiu a po smíchání přeneseno na krevní agar (TRIOS). Agar byl poté inkubován při 37 °C po 24 hodin. Bakterie, které rostly na agaru, byly poté použity jako inokulum o hustotě 10⁶ CFU/ml v dalším kultivačním kroku na mikrotitrační destičce. Výše popsaná procedura se považuje za jeden kultivační krok v použité metodice tvorby rezistence bakterií ke stříbru. Pro kontrolu byla v desátém a dvacátém kroku určena MIC AgNP nebo AgNO₃ inhibující referenční kmeny pro potvrzení vzniku rezistence u opakovaně exponovaných kmenů. Pro stanovení konečných MIC po 20. kultivačním kroku byla aplikována disperze AgNP o koncentraci 432 mg/l. Inhibice růstu ke stříbru senzitivních a rezistentních bakteriálních kmenů byla potvrzena inkubací na agaru, který obsahoval AgNP o koncentracích 20 a 40 mg/l při 35 °C po dobu 24 hodin.

Z narůstajících hodnot MIC AgNP uvedených v tabulce 17 je patrné, že si bakterie v průběhu opakované kultivace při subinhibičních koncentracích postupně vytvářely rezistenci vůči AgNP. Nejrychleji získala rezistenci *E. coli* CCM 3954. Již v šestém kultivačním kroku se MIC zvýšila z původních 3,38 mg/l na 13,5 mg/l a od osmého kroku dosahovala nejvyšší možné koncentrace 54 mg/l (při použití disperze AgNP o koncentraci 108 mg/l). Kmeny *P. aureginosa* CCM 3955 a *E. coli* 013 se staly rezistentní od 13. kroku. Všechny kmeny si poté nadále udržovaly svoji rezistenci při každém přeočkování. Aby se zjistila konkrétní hodnota MIC u bakterií se získanou rezistencí, byly použity disperze AgNP o koncentraci 432 mg/l připravené podobným způsobem jako AgNP používané v předchozích testech. U všech rezistentních kmenů byla zaznamenána výrazně vyšší MIC

AgNP než u kmenů citlivých. MIC AgNP u obou testovaných kmenů *E. coli* byla určena na hodnotu 108 mg/l, zatímco vůči *P. aeruginosa* byla MIC AgNP rovna 54 mg/l (tab. 18).

Tabulka 17. MIC AgNP u Gram-negativních bakterií určovaná po 20 po sobě jdoucích kultivačních krocích.

bakterie	MIC [mg/l]									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>E. coli</i> CCM 3954	3,38	6,75	3,38	6,75	6,75	13,50	13,50	54,00	> 54	> 54
<i>P. aeruginosa</i> CCM 3955	1,69	3,38	0,89	1,69	3,38	3,38	1,69	1,69	3,38	3,38
<i>E. coli</i> 013	13,50	27,00	13,50	27,00	13,50	13,50	13,50	13,50	13,50	13,50

bakterie	MIC [mg/l]									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>E. coli</i> CCM 3954	> 54	> 54	> 54	> 54	> 54	> 54	> 54	> 54	> 54	> 54
<i>P. aeruginosa</i> CCM 3955	6,75	27,00	54,00	> 54	54,00	54,00	> 54	54,00	> 54	54,00
<i>E. coli</i> 013	27,00	27,00	54,00	27,00	27,00	54,00	> 54	54,00	> 54	> 54

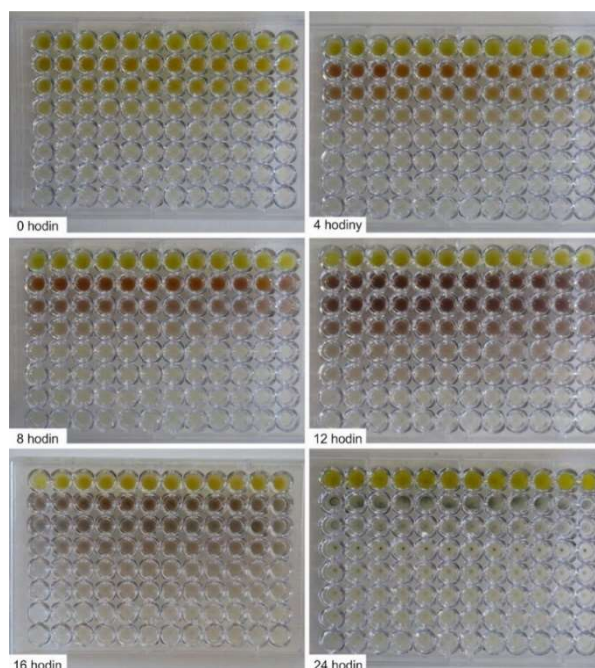
Tabulka 18. MIC AgNP určené pro bakterie citlivé (dříve neexponované AgNP) a rezistentní (po 20 kultivačních krocích s AgNP).

	MIC [mg/l]	MIC [mg/l]
	AgNP-citlivé	AgNP-rezistentní
<i>E. coli</i> CCM 3954	3,38	108
<i>P. aeruginosa</i> CCM 3955	1,69	54
<i>E. coli</i> 013	13,5	108

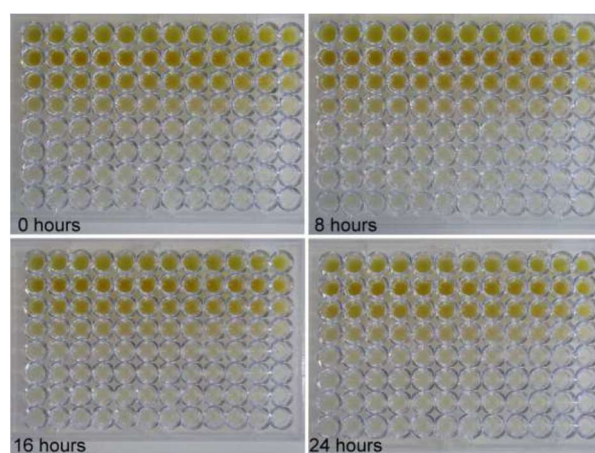
Při opakované kultivaci bakterií s iontovým stříbrem nedocházelo k nárůstu MIC. V tomto případě tedy nebyla rezistence vyvolána. Navíc u kmenů rezistentních k AgNP nebyly v případě jejich kultivace s AgNO₃ potvrzeny vyšší hodnoty MIC. To znamená, že se v tomto případě nejedná o křížovou rezistenci. Bakterie se získanou odolností vůči AgNP jsou stále citlivé k AgNO₃. Je to tedy jasným důkazem toho, že bakteriální rezistence k AgNP je specifická a spojená právě s nanočásticovou podstatou stříbra a že mechanismem rezistence není pouze eliminace uvolněných iontů stříbra.

Postupný vývoj bakteriální rezistence k AgNP byl také doprovázen postupnou agregací a sedimentací AgNP na dně jamek mikrotitrační destičky a změnou barvy disperze ze žluté na hnědou až černou (obr. 16). Naopak v přítomnosti senzitivních bakterií disperze AgNP ředěná M.-H. médiem zůstala žlutohnědá díky zachování povrchového plazmonu, který je typický pro AgNP o velikostech několika jednotek až desítek nm (obr. 17). Tvorba agregátů nebyla u citlivých referenčních kmenů pozorována a barva disperze se během

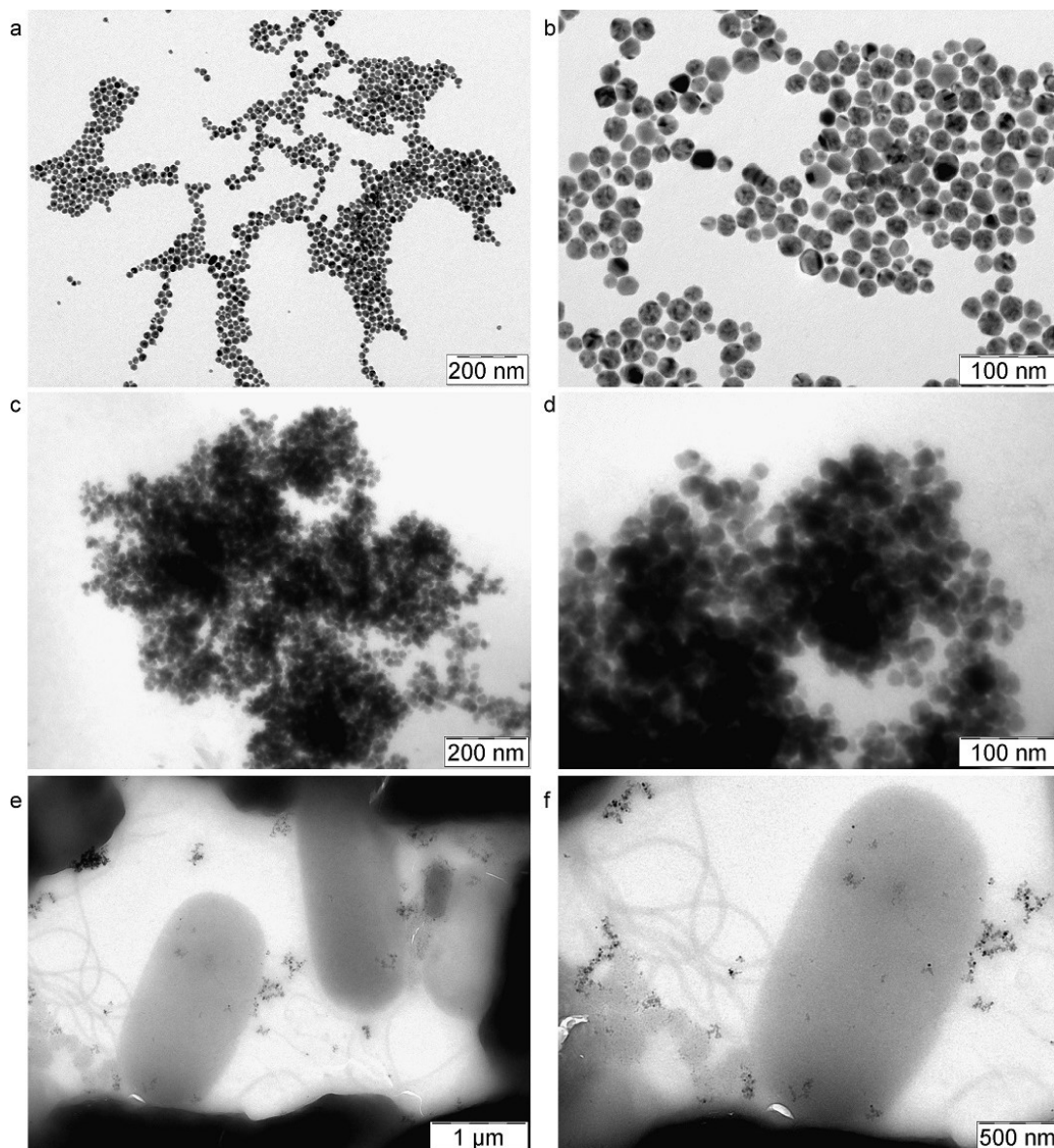
kultivace nezměnila, agregační stabilita tedy nebyla ovlivněna a antibakteriální vlastnosti zůstaly zachovány. Agregační stabilita AgNP po kultivaci se senzitivními bakteriemi byla prokázána TEM (obr. 18a,b). Naopak v případě rezistentních bakterií docházelo ke tvorbě černého precipitátu tvořeného agregáty AgNP o velikostech řádově stovek nm (obr. 18c,d). Agregace AgNP způsobená rezistentní *E. coli* je dobře viditelná na snímcích z TEM (obr. 18e,f).



Obrázek 16. Postupná agregace a precipitace AgNP na mikrotitrační destičce s *E. coli* 3954 rezistentní k AgNP po 0, 4, 8, 12, 16 a 24 hodinách kultivace. Koncentrace AgNP se postupně snižuje od 54 mg/l k 0,84 mg/l od druhé po osmou řadu. První řada obsahuje disperzi AgNP (108 mg/l) bez bakterií nebo kultivačního média.

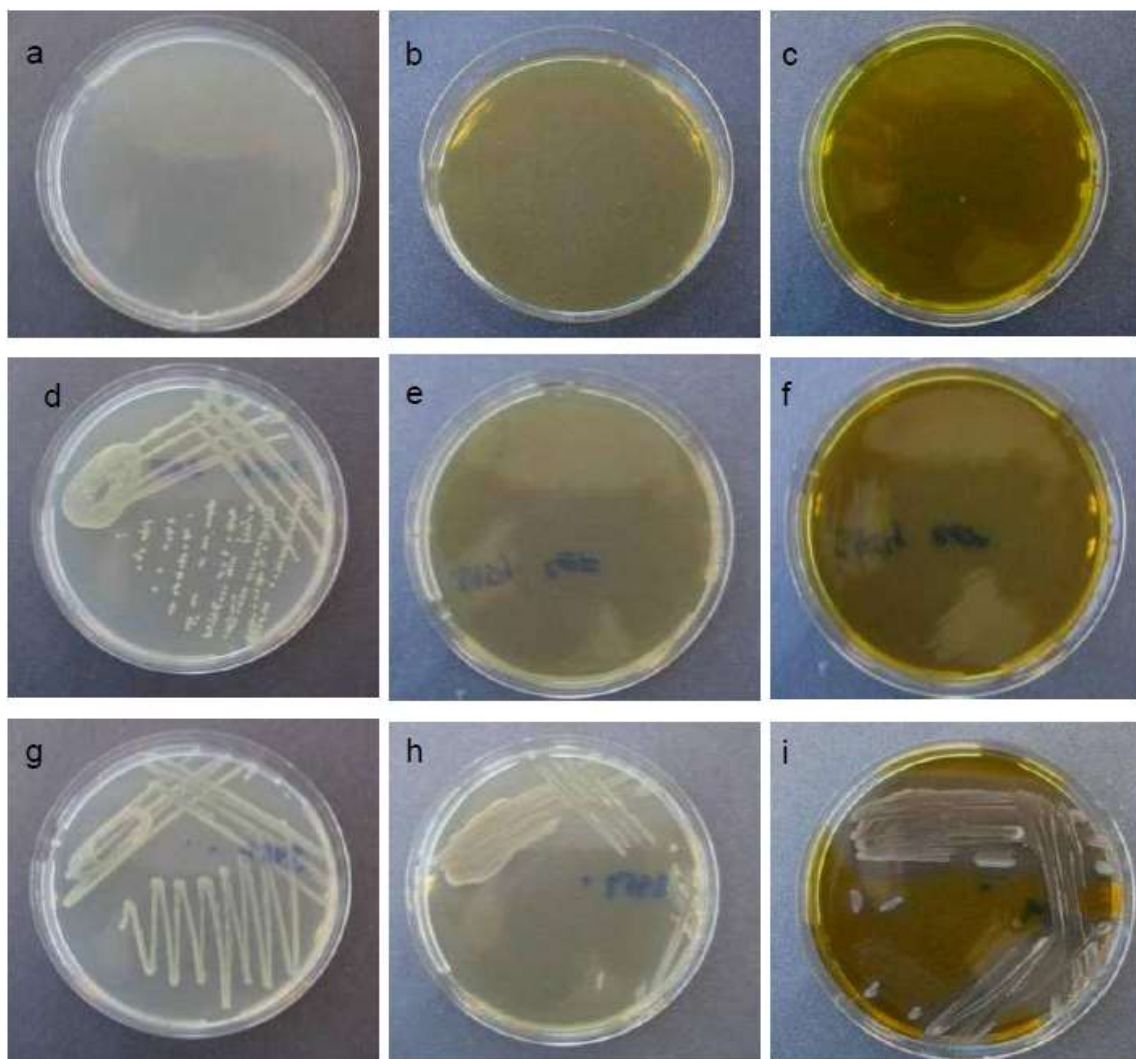


Obrázek 17. Absence agregace AgNP na mikrotitrační destičce s *E. coli* CCM 3954 citlivou k AgNP po 0, 8, 16 a 24 hodinách kultivace. Koncentrace AgNP se postupně snižuje od 54 mg/l k 0,84 mg/l od druhé po osmou řadu. První řada obsahuje disperzi AgNP (108 mg/l) bez bakterií nebo kultivačního média.



Obrázek 18. Vysoká agregační stabilita AgNP po kultivaci s *E. coli* citlivé k AgNP ukázaná na snímcích z TEM (a, b), agregované AgNP po 24 h kultivace s AgNP-rezistentní *E. coli* CCM 3954 (c, d), agregace AgNP způsobená rezistentní *E. coli* CCM 3954 (e, f).

Schopnost AgNP inhibovat nebo neinhibovat růst citlivých a rezistentních *E. coli* CCM 3954 byla potvrzena kultivací na agarových půdách obsahujících AgNP v koncentracích 20 mg/l a 40 mg/l. Bakterie rezistentní k AgNP kultivované na agaru s AgNP nebyly inhibovány na rozdíl od bakterií citlivých k AgNP, jejichž růst byl zcela inhibován. (obr. 19).



Obrázek 19. Čistá agarová miska (a), agarová miska s 20 mg/l AgNP (b) a 40 mg/l AgNP (c), pomnožené citlivé bakterie *E. coli* CCM 3954 na misce s čistým agarem (d), na misce s 20 mg/l AgNP (e) a 40 mg/l AgNP (f), pomnožené rezistentní bakterie *E. coli* CCM 3954 na misce s čistým agarem (g), na misce s 20 mg/l AgNP (h) a 40 mg/l AgNP (i).

V případě růstu AgNP-rezistentní *E. coli* byla navíc během kultivace na agaru pozorována agregace AgNP okolo bakteriálních kolonií. Původně žluté zbarvení způsobené AgNP se kolem bakterií změnilo na šedou (obr. 20).



Obrázek 20. Šedé zbarvení agaru okolo kolonií *E. coli* CCM 3954 rezistentní k AgNP způsobené agregací AgNP po 24hodinové kultivaci.

Ve snaze překonat mechanismus rezistence spočívající v agregaci byla provedena dodatečná stabilizace AgNP běžně používanými netoxickými polymery (2% PAA, 2% GEL – želatina, 2% PEG – polyethylenglykol, 2% TWEEN 80), které velice dobře stabilizují disperze AgNP a předchází jejich agregaci. Výsledky MIC ukázaly, že bakterie *E. coli* CCM 3954 rezistentní k AgNP si rezistenci ponechává i v přítomnosti stabilizovaných AgNP. Bakterie rezistentní k AgNP jsou zřejmě schopny tuto překážku snadno překonat (tab. 19).

Tabulka 19. MIC nestabilizovaných a stabilizovaných AgNP pro *E. coli* CCM 3954 citlivou a rezistentní k AgNP.

	MIC [mg/l]				
	nestabilizované AgNP	stabilizované AgNP			
		PEG	PAA	GEL	TW
AgNP-citlivá <i>E. coli</i>	3,38	3,38	1,69	1,69	3,38
AgNP-rezistentní <i>E. coli</i>	108	54	54	54	54

Agregační stabilita koloidních částic v kapalinách je určena (mimo jiné) kompeticí van der Waalsových přitažlivých a elektrostatických odpuzivých sil mezi koloidními částicemi se stejným povrchovým nábojem. Zeta potenciál AgNP použitých v této studii byl -28 mV, což postačuje k zajištění dlouhodobé agregační stability. Podle teorie DLVO,²⁷ která popisuje agregaci nabitých koloidních částic, může být agregace vyvolána přidáním vhodných protiiontů, které eliminují povrchový náboj částic. Tento mechanismus agregace vyvolaný použitím kationtového polyelektrolytu popisuje publikace Kvítek a kol.²⁹ Agregace AgNP je snadno monitorována UV/Vis spektrofotometrií. Absorpční spektra AgNP zředěných v M.-H. médiu v poměru 1 : 1 (V/V) před a po kultivaci s AgNP-citlivým

a AgNP-rezistentním kmenem *E. coli* CCM 3954 zobrazuje obrázek 21a. Charakteristický pás povrchového plazmonu dobře dispergovaných koloidních AgNP postupně mizí v přítomnosti AgNP-rezistentního kmene *E. coli* CCM 3954 v důsledku agregace AgNP. Naopak v přítomnosti AgNP-citlivého kmene intenzita povrchového plazmonového pásu zůstává nezměněna i po 24 hodinách kultivace (obr. 21a). To naznačuje, že bakterie rezistentní k AgNP vyvolávají jejich agregaci extracelulární sekrecí látky, která zůstává adsorbována na povrchu agregátů. Touto látkou je pravděpodobně látka s vysokou molekulovou hmotností, jako jsou proteiny. Proteinové extrakty připravené za použití různých rozpouštědel byly proto podrobeny analýze hmotnostní spektrometrií (MS) a tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) k identifikaci proteinů, které by mohly být odpovědné za pozorovanou agregaci AgNP. Pro účely hmotnostní spektroskopie byly agregáty AgNP separovány z 500 ml (10 × 50 ml) bakteriální suspenze obsahující 27 mg stříbra centrifugací po dobu 2 minut při 100 × g. Pelet byl jednou promyt destilovanou vodou a doplněn do 6 ml destilovanou vodou na koncentraci 4,5 mg/l. Suspenze precipitovaných agregátů stříbra byla rozdělena do 4 alikvotů do zkumavek o objemu 1,5 ml a zcentrifugována. Pro proteinovou extrakci byly alikvoty inkubovány s 1 ml 0,1% kyseliny trifluoroctové (TFA), 2,5% TFA, 2% NH₄OH a 5% NH₄OH. Extrakty získané po 24hodinové inkubaci při 37 °C a třepání (800 rpm) byly vakuově usušeny a proteiny byly poté rozpuštěny v 50 µl 50 nM NH₄HCO₃ (za pomoci 5minutové sonifikace). Poté bylo přidáno 1,5 µl 200 µM trypsinu pro digesci proteinů a směs byla inkubována přes noc při 37 °C. Po vakuovém sušení byly peptidy získané digescí přečištěny použitím špiček ZipTip-C18 (Merck-Millipore, Tullagreen-Carrigtwohill, Ireland) podle instrukcí výrobce. Vzorky peptidů byly rozpuštěny v 10 µl 0,1% TFA a separovány pomocí LC/MS Dionex UltiMate3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany) spojené s iontovou pastí amaZon speed s technologií ETD (fragmentace přenosem elektronu) s iontovým zdrojem CaptiveSpray (Bruker, Bremen, Germany). Rychlost skenování byla 8100 u/s pro MS i MS/MS. Jako kolizní plyn při kolizí indukované fragmentaci bylo použito helium. Data z MS/MS ve formátu MGF byla vyhodnocena pomocí softwaru Mascot Server 2.4 (Matrix Science, London, UK) a databáze Swiss-Prot.

Pomocí MS/MS analýzy se kromě extrakce v 0,1% trifluoroctové kyselině podařilo identifikovat řadu proteinů. Mimo jiné byly nalezeny 30S a 50S ribozomální proteiny a určité enzymy buněčného metabolismu *E. coli*, které signalizují buněčnou lýzu před nebo během extrakce. Nejčastěji vyskytující se protein v extraktu ve 2,5% TFA byl flagelin následovaný fimbriálním proteinem typu 1. Flagelin byl také nejčastěji vyskytujícím se

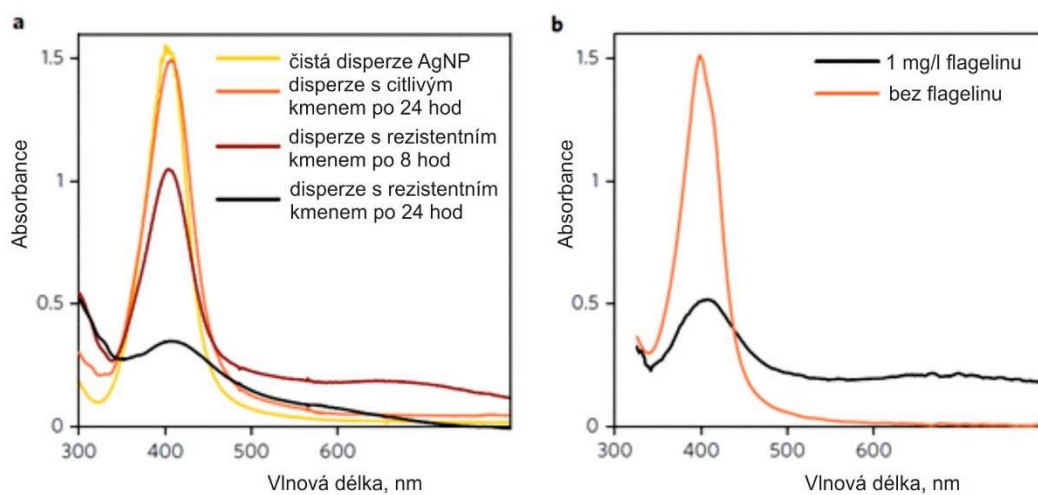
proteinem i při extrakci se zředěným NH₄OH. Tabulka 20 sumarizuje peptidy sekvenované kolizí v MS/MS, které se jednoznačně shodují se sekvencemi flagelinu.

Tabulka 20. Peptidy identifikované pomocí databáze Swiss-prot.

Číslo peptidu	Přístupové číslo	Protein - Organismus	m/z	Vypočítaná hmotnost	Náboj [z+]	Δ m/z [ppm]	Retenční čas [min]	Skóre	Sekvence
1	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	596,288	1190,5891	2	-23,21	12,93	62,8	K.NQSALSSSIER.L
2	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	572,812	1143,6248	2	-13,39	13,73	55,3	L.SLITQNNINK.N
3	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	720,909	1439,8096	2	-4,29	16,77	121,7	K.AQIIQQAGNSVLAK.A
4	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	581,295	1160,5925	2	-14,65	17,15	79,8	K.ALDEAISSIDK.F
5	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	672,872	1343,7409	2	-8,49	17,57	74,5	N.SLSLITQNNINK.N
6	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	750,357	2248,0931	3	-19,53	17,74	23,2	R.LDSAVTNLNNTTTTLNSEAQRS.I
7	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	488,923	1463,762	3	-10,12	19,91	20,0	K.ALDEAISSIDKFR.S
8	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	843,451	1684,8996	2	-7,18	20,54	105,2	K.IQVVGANDGQTITIDLK.K
9	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	640,315	1278,6456	2	-23,53	21,55	21,1	K.KIDSDTLGLNGF.N
10	FLIC_ECOLI	Flagellin - <i>Escherichia coli</i> K12	596,288	1190,5891	2	-23,21	12,93	62,8	K.NQSALSSSIER.L
11	FLIC_ECOLI	Flagellin - <i>Escherichia coli</i> K12	572,812	1143,6248	2	-13,39	13,73	55,3	L.SLITQNNINK.N
12	FLIC_ECOLI	Flagellin - <i>Escherichia coli</i> K12	720,909	1439,8096	2	-4,29	16,77	121,7	K.AQIIQQAGNSVLAK.A
13	FLIC_ECOLI	Flagellin - <i>Escherichia coli</i> K12	672,872	1343,7409	2	-8,49	17,57	74,5	N.SLSLITQNNINK.N
14	FLIC_ECOLI	Flagellin - <i>Escherichia coli</i> K12	750,357	2248,0931	3	-19,53	17,74	23,2	R.LDSAVTNLNNTTTTLNSEAQRS.I

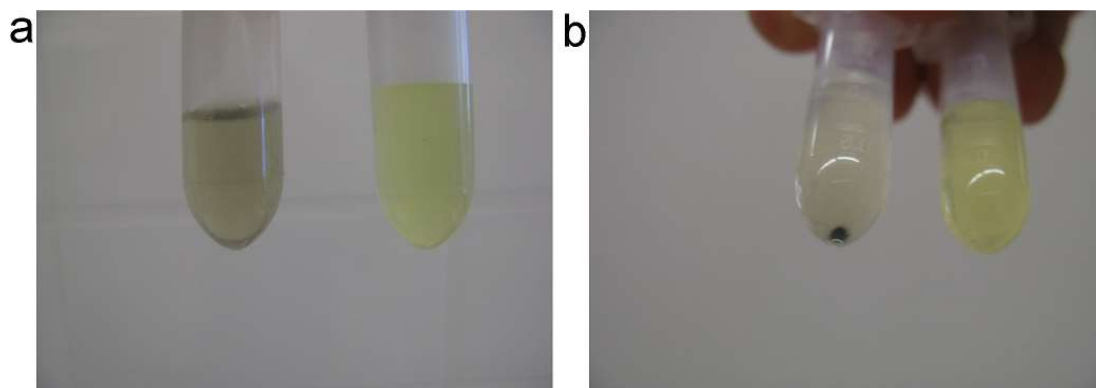
Flagelin je protein, který na povrchu bakteriálních buněk tvoří bičíky umožňující bakteriím pohyb. Je rozpoznáván TLR (toll-like receptor) receptory, které spouští imunitní odpověď organismu. Jako adhezivní protein je klíčovým pro tvorbu biofilmu díky jeho roli v počátečních fázích adheze buňky k povrchu. Nicméně fyzikálně-chemická interakce mezi flagelinem a AgNP, a především vztah mezi flagelinem a agregační stabilitou a antibakteriální aktivitou AgNP, nebyl dosud zkoumán a nebylo možno s jistotou říci, že flagelin přímo způsobuje agregaci.

V dalším experimentu byl použit komerčně dostupný flagelin k ověření, zda AgNP budou agregovat po přidání suspenze flagelinu do disperze AgNP. Původní žlutohnědá barva disperze se ihned po přidání flagelinu změnila na šedou (obr. 22a) a po 24 hodinách (37 °C) byly na dně zkumavky pozorovány precipitáty (obr. 22b). Agregace po přidání flagelinu k disperzi AgNP byla potvrzena měřením zeta potenciálu a UV/Vis spektroskopií. UV/Vis spektra AgNP před a po přidání flagelinu jsou velmi podobná spektrům pořízeným před a po kultivaci s AgNP-rezistentní *E. coli* CCM 3954 (obr. 21). Absorpční pás povrchového plazmonu AgNP se v přítomnosti reistentní *E. coli* CCM 3954 postupně snižoval díky agregaci AgNP. V přítomnosti citlivého kmene zůstal pás povrchového plazmonu po 24hodinové kultivaci stejný (obr. 21a).



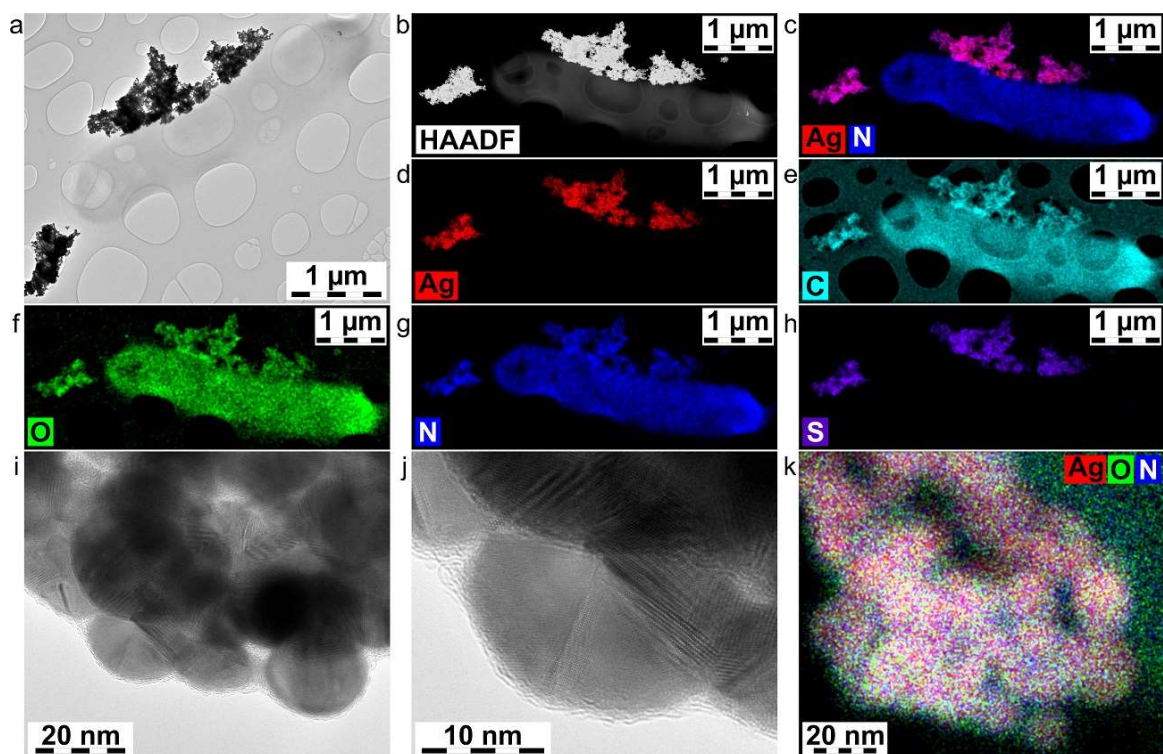
Obrázek 21. UV/Vis absorpční spektra AgNP zředěných M.-H. médii před a po kultivaci s citlivým a rezistentním kmenem *E. coli* 3954 (a), UV/Vis spektra AgNP zředěných M.-H. médii před a po přidání flagelinu (b).

Průměrná velikost AgNP se okamžitě zvětšila z 28 nm na 480 nm následkem tvorby agregátů. Zeta potenciál po přidání flagelinu se změnil z hodnoty -28 mV na -6,2 mV. Při takto nízké hodnotě zeta potenciálu nejsou repulzivní síly dostatečně vysoké k udržení AgNP v dostatečné vzájemné vzdálenosti.



Obrázek 22. Vliv přidavku flagelinu k AgNP. Obrázky ukazují okamžitou agregaci AgNP po přidání flagelinu (a, vlevo) a stav po 24 hodinách od přidavku (b, vlevo). Zkumavka vpravo u obou obrázků obsahuje stabilní AgNP bez flagelinu.

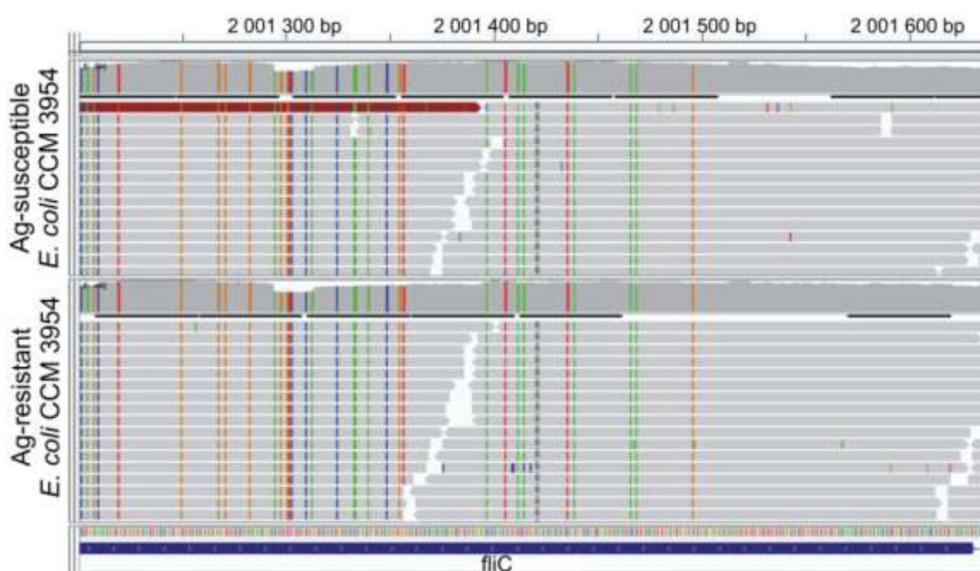
Aby se dále potvrdila role flagelinu v agregaci AgNP, byla provedena charakterizace a chemické mapování agregátů stříbra pomocí HRTEM. Obrázky 23a a 23b jasně ukazují agregáty AgNP na povrchu a v těsné blízkosti bakteriální stěny. Chemické mapování odhalilo na povrchu agregátů stříbra přítomnost základních prvků proteinů, jako je uhlík, kyslík, dusík a síra (obr. 23). AgNP tvořící velké agregáty nevstupují dovnitř buňky, jak lze vidět na obrázku 23c a 23d, kde žádné AgNP nejsou uvnitř vidět. Na snímcích z HRTEM je také vidět tenká vrstva flagelinu adsorbovaná na povrchu agregátů (obr. 23i,j).



Obrázek 23. Chemické mapování agregátů stříbra v přítomnosti bakterií. Snímky HRTEM (a) a HAADF (b) agregátů stříbra na povrchu bakteriální buňky. Kombinované chemické mapování stříbra a dusíku (c), d–h jednoprvkové mapování stříbra (d), uhlíku (e), kyslíku (f), dusíku (g) a síry (h), HRTEM snímky stříbrných agregátů, které zobrazují kompaktní organickou vrstvu na povrchu AgNP (i, j) a kombinované chemické mapování stříbra, kyslíku a dusíku (k).

Po úspěšném popisu mechanismu agregace AgNP, za který je zodpovědný flagelin produkovaný bakteriemi, bylo testováno, zda je bakteriální rezistence k AgNP způsobena změnami v genotypu nebo fenotypu. Celková genomová DNA kmenů *E. coli* rezistentního (NP516) a citlivého k AgNP byla izolována pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Německo) podle manuálu výrobce. Vzorky bakteriální DNA (20 ng/μl) byly poslány do laboratoří firmy Institute of Applied Biotechnologies (Praha, Česká republika) pro získání sekvence metodou WGS (celogenomové náhodné sekvenování). Pro analýzu WGS byla použita platforma MiSeq (Illumina). Referenční soubor ve formátu FASTA byl stažen z nabídky genomů Illumina iGenomes a indexován Burrows-Wheeler Alignerem (BWA; verze 0.7.13). FASTQ soubory z pair-end sekvenování byly namapovány na indexovanou referenční FASTA sekvenci pomocí BWA-MEM algoritmu. K vizualizaci části genetických výsledků byla data z NGS (next-generation sekvenování) vyhodnocena pomocí nástroje Integrative Genomics Viewer IGV verze 2.3 (Broad Institute, Cambridge, UK). Jako

referenční sekvenční pro alignment byla vybrána sekvence *E. coli* K12 MG 1655 (NC_00096.2). Mapování sekvencí neodhalilo žádné statisticky významné změny nukleotidů DNA flagelárního genu, který kóduje proteiny tvořící filamen (fliC), hook (flgE) a capping protein (fliD), ani genů kódujících hlavní transkripční regulátor FlhDC a flagelární regulátor FliA rezistentního kmene. Jako příklad, že nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny mezi genomovými sekvencemi rezistentní a citlivé *E. coli* slouží obrázek 24 zobrazený programem Integrative Genomics Viewer. Pro ilustraci byla vybrána část fliC genu, prvních 428 bp genové sekvence, a nebyly pozorovány žádné rozdíly nukleotidů mezi rezistentním a senzitivním kmenem *E. coli*. Barevné pásy reprezentují odlišnosti od referenční sekvence. Na základě těchto výsledků lze tvrdit, že produkce flagelinu jakožto mechanismus rezistence k AgNP nevyžaduje žádnou genetickou změnu.



Obrázek 24. Prvních 428 párů bází genu *fliC* *E. coli* CCM 3954 rezistentní a citlivé k AgNP.

V další části výzkumu jsme se především díky znalosti mechanismu rezistence bakterií k AgNP mohli zaměřit na možnost překonání vyvinuté odolnosti. Zvoleným přístupem byla aplikace inhibitoru bakteriálního flagelinu, který by potlačením produkce proteinu mohl zastavit agregační proces. Je známo, že produkce flagelinu bakteriemi může být inhibována extraktem z kůry granátového jablka (PGRE). Extrakt z kůry granátového jablka (PGRE) byl připraven podle postupu z publikace Asadishad a kol.²⁸⁴ Kůra byla nakrájena na malé kousky a sušena při 50 °C po dobu 24 hodin. K 15 g vysušené kůry bylo přidáno 200 ml destilované vody a umístěno do třepačky na 24 hodin při laboratorní teplotě.

Extrakt byl přefiltrován přes filtrační papír Whatman č. 1. Vzorek PGRE byl lyofilizován za účelem zjistit hmotnost sušiny (20 g/l). V případě kultivace *E. coli* CCM 3954 rezistentní k AgNP v přítomnosti AgNP a subinhibitorní koncentrace PGRE 0,6 % (w/w) (MIC PGRE byla určena na 2,5 % (w/w)) se MIC AgNP vůči rezistentní *E. coli* 013 v přítomnosti PGRE snížila z 54 mg/l na 13,5 mg/l a v případě rezistentní *E. coli* CCM 3954 na 6,75 mg/l. *E. coli* CCM 3954 rezistentní k AgNP v přítomnosti AgNP a subinhibitorní koncentrace PGRE tedy nebyla schopna odolávat antibakteriálnímu efektu AgNP, bakterie ztratily svoji získanou rezistenci. MIC AgNP vůči rezistentní *E. coli* 013 se v přítomnosti PGRE snížila na MIC původního citlivého kmene a v případě rezistentní *E. coli* CCM 3954 na srovnatelně nízkou hodnotu MIC citlivého referentního kmene.

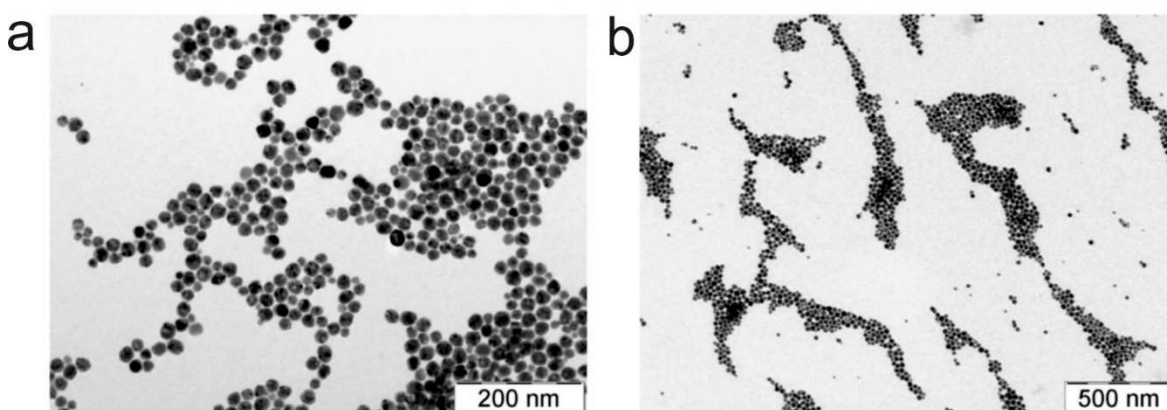
Pro ověření stálosti rezistence k AgNP byla *E. coli* rezistentní k AgNP opakovaně inkubována po dobu 120 hodin při 37 °C v 50 ml M.-H. média bez AgNP. Vhodné podmínky ke kultivaci byly zajištěny přeočkováním inokula do čerstvého média po 5, 24, 48, 72 a 96 hodinách. Současně bylo 100 µl bakteriální suspenze naočkováno na M.-H. agarové misky, které byly inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C a kolonie byly použity pro stanovení MIC AgNP. MIC AgNP (108 mg/l) pro AgNP-rezistentní bakterie zůstala stejná i po šesti kultivačních krocích, bakterie si evidentně svoji rezistenci ponechávají. Stabilita rezistence byla dále potvrzena testem s PGRE, kdy po inkubaci rezistentního kmene se subinhibiční koncentrací PGRE zůstala MIC AgNP stále na hodnotě 108 mg/l.

11. Vliv média a stabilizačního činidla na toxicitu AgNP vůči *Daphnia magna*^f

Byla studována chronická 21denní toxicita stabilizovaných a nestabilizovaných AgNP vůči organismu *D. magna* ve standardním a 2krát zředěném kultivačním médiu. Cílem bylo určit, zda má zředění kultivačního média vliv na stabilitu AgNP, a tím i vliv na mortalitu a na reprodukci a poukázat na důležitost důsledné charakterizace médií a AgNP a chování AgNP v médiích a stanovení toxicity všech složek disperze při vyhodnocování testu toxicity.

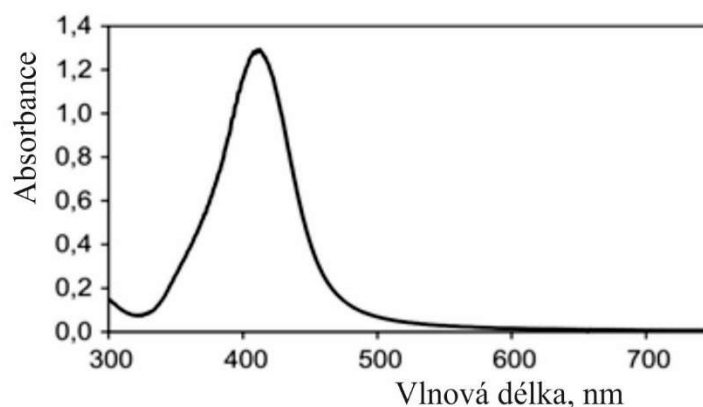
AgNP byly syntetizovány Tollensovou metodou, která je založena na redukci diamminstříbrného komplexu D-maltózou, jak je detailněji popsáno výše. AgNP byly také charakterizovány pomocí DLS, TEM a UV/Vis spektroskopií. Pro experimenty se stabilizovanými AgNP v neředěném médiu byla do připravené disperze AgNP přidána želatina o konečné koncentraci 0,005 % a v případě ředěného média želatina o konečné koncentraci 0,0001 %.

Připravené sférické AgNP dosahovaly průměrné velikosti 28 nm s velmi úzkou distribucí velikosti částic. Výsledky získané pomocí DLS byly ověřeny snímky z TEM, které potvrdily přítomnost sférických částic s průměrem přibližně 30 nm (obr. 25). V UV/Vis absorpčním spektru byl zaznamenán typický absorpční pík povrchového plazmonu s maximem u 412 nm (obr. 26).



Obrázek 25. Snímky AgNP z TEM při nižším (a) a vyšším (b) rozlišení.

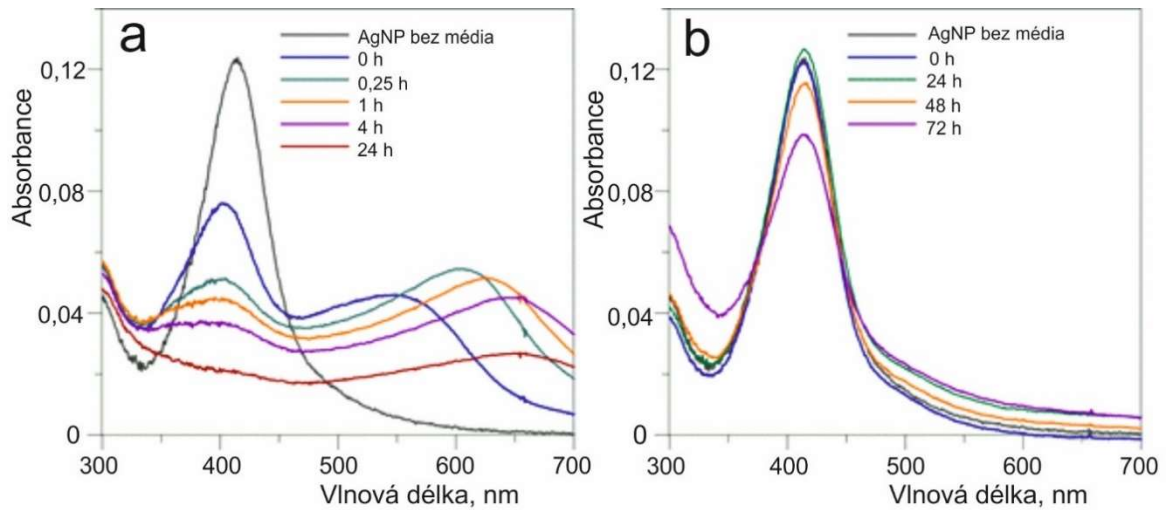
^f Přijato jako: Smékalová, M., Panáček, A., Jančula, D., Maršálek, B., Kolařík, J., Pucek, R., Kvítek, L. a Zbořil, R. Effects of culture medium conditions on stability, crystallinity and chronic toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. Podáno do redakce časopisu *Applied Materials Today*.



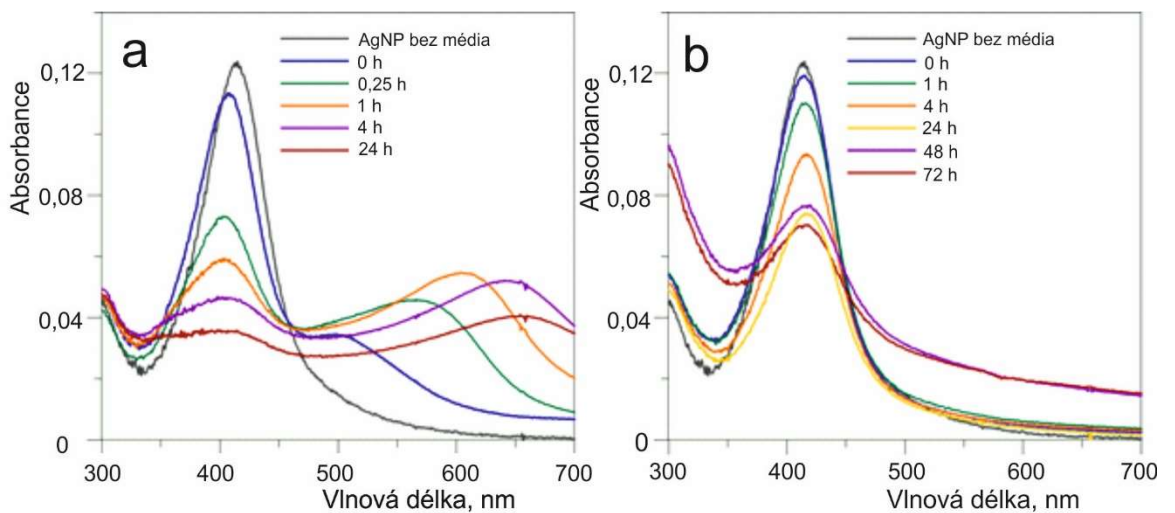
Obrázek. 26. UV/Vis absorpční spectrum AgNP (10 mg/l).

Monitorování stability AgNP o koncentraci 1 mg/l v neředěném a 2krát ředěném kultivačním médiu M4 bylo založeno na sledování změny polohy plazmonového rezonančního píku lokalizovaného původně u 412 nm. Spektra byla zaznamenávána pomocí UV/Vis spektrometru Specord S 600 (Analytic Jena) po dobu 24 hodin (nestabilizované AgNP) nebo 72 hodin (AgNP stabilizované želatinou). Snímky z TEM JEM-2010 (Jeol) nestabilizovaných částic byly pořízeny po 24 hodinách pro srovnání s jejich původní velikostí a tvarem.

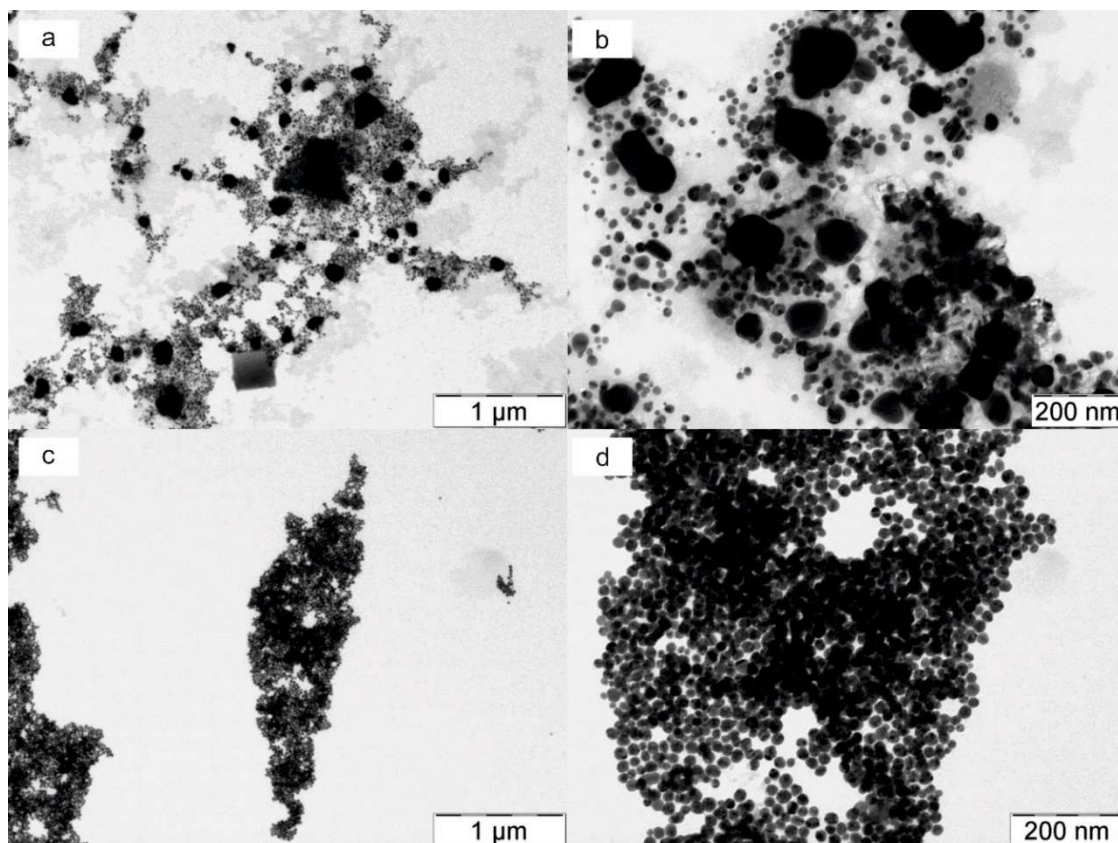
Jakmile se smíchaly AgNP s ředěným i neředěným médiem byla ovlivněna jejich agregační stabilita, jak bylo patrné z UV/Vis spekter (obr. 27a a 28a) a z nárůstu průměrné velikosti z 28 nm na 260 nm. Barva disperze se změnila ze žlutohnědé na modrošedou. Absorbance píku původních částic s maximem u 412 nm se postupně snižovala a zároveň se objevil sekundární pík s maximem 545 nm (neředěné médium) a 505 nm (2krát ředěné médium) ihned po smíchání s médiem. Pozice sekundárního maxima se v čase posouvala k vyšším vlnovým délkám, což koresponduje s narůstající velikostí částic.²⁹ Po 24 hodinách byla stanovena průměrná velikost částic 420 nm. TEM snímky pořízené 24 hodin po smíchání s ředěným i neředěným médiem potvrdily přítomnost velkých aglomerátů, které vznikly z původních malých AgNP (obr. 29). Navíc se v neředěném médiu rekrystalizací zformovaly velké částice o velikostech kolem 200 nm (obr. 29a,b). Tento mechanismus rekrystalizace byl popsán v práci Pucek a kol.²⁸⁵



Obrázek 27. UV/Vis absorpční spektra nestabilizovaných AgNP (10 mg/l) v nezředěném médiu M4 zaznamenaná během 24 hodin (a) a AgNP stabilizované 0,005% želatinou v nezředěném médiu M4 zaznamenaná během 72 hodin (b).

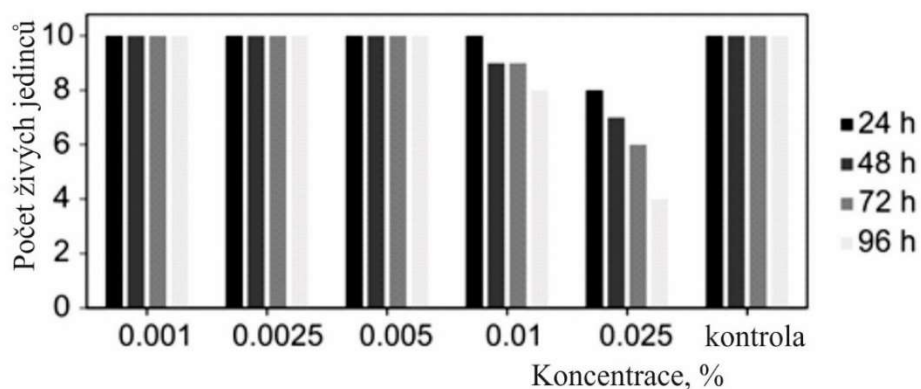


Obrázek 28. UV/Vis absorpční spektra nestabilizovaných AgNP (10 mg/l) ve 2krát zředěném médiu M4 zaznamenaná během 24 hodin (a) a AgNP stabilizované 0,0001% želatinou ve 2krát zředěném médiu M4 zaznamenaná během 72 hodin (b).



Obrázek 29. Snímky z TEM velkých aglomerátů stříbra tvořených rekrystalizací a agregací pořízené 24 hodin po smíchání disperse AgNP s neředěným (a, b) a zředěným (c, d) kultivačním médiem.

Aby se předešlo agregaci AgNP v kultivačním médiu, které je koncentrovaným elektrolytem, byly AgNP stabilizovány želatinou. Ke stabilizaci AgNP byly použity velmi nízké koncentrace želatiny, které neprojevily akutní toxicitu k dafniím, a to 0,005 % pro neředěné médium a 0,0001 % pro 2krát ředěné médium (obr. 30).



Obrázek 30. Počet živých jedinců *D. magna* po expozici různým koncentracím želatiny v čase.

Želatina o koncentraci 0,005 % úspěšně stabilizovala AgNP, což potvrdila UV/Vis absorpční spektra, kde nebyly pozorovány žádné dramatické změny absorpčního pásu povrchového plasmu (obr. 27b) ve srovnání s nestabilizovanými AgNP (obr. 27a). Disperze si také držela svoji žlutohnědou barvu. V oblasti od 450 nm do 550 nm byla zaznamenána pouze velmi slabá absorpce, která naznačuje mírný nárůst průměrné velikosti AgNP (obr. 27b). Měřením velikosti částic pomocí DLS pak byl potvrzen mírný nárůst velikosti částic na 33 nm, nicméně charakterizací pomocí TEM nebyla pozorována žádná rekrystalizace. Disperze AgNP s 0,0001 % želatiny byla méně stabilní ve srovnání s použitím vyšší koncentrace želatiny. Došlo k postupnému snižování pásu povrchového plazmonu s maximem u 412 nm a zvýšení průměrné velikosti částic na 80 nm po 24 hodinách (obr. 28b). Po 24 hodinách byla pozorována částečná agregace AgNP stabilizovaných 0,0001 % želatiny následována sedimentací. Takto nízká koncentrace želatiny není dostačující k úplné stabilizaci AgNP, ale zpomaluje agregaci a předchází rekrystalizaci AgNP do větších aglomerátů (za podmínek, při kterých byly testy prováděny).

Sladkovodní korýš *D. magna* byl použit jako standardní testovací organismus. Ve všech toxicitních experimentech nebyly organismy starší než 24 hodin. Dafnie byly pořízeny z centra RECETOX (Masarykova Univerzita, Brno). Jako kultivační médium bylo připraveno standardní Elendtovo médium M4 (CSN ISO 10706, 2001) obsahující základní anorganické soli a vitamíny. Hodnota pH média byla 7,2.

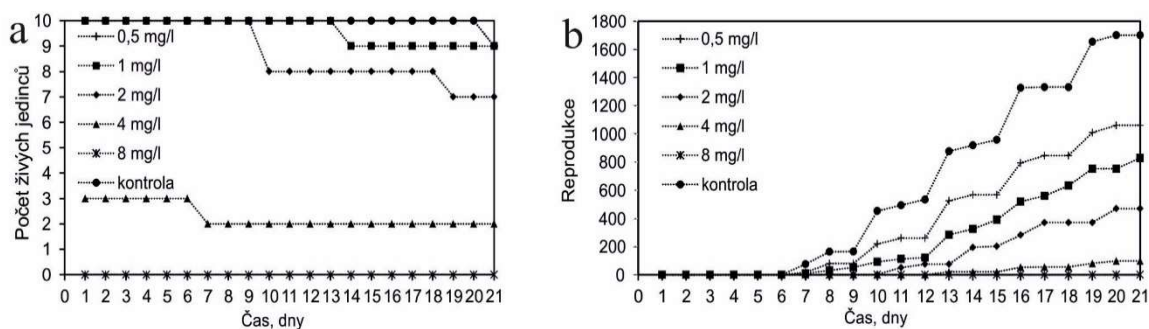
Při testování chronické toxicity se postupovalo podle směrnice OECD (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj) 211 pro testování chemikálií.²⁸⁶ Deset jedinců rozdělených do deseti kádinek s 50 ml média bylo exponováno po 21 dní. Dafnie byly kultivovány v cyklu 16 hodin světlo a 8 hodin tma při 18–22 °C. Organismy byly denně krmeny řasou *Pseudokirchneriella subcapitata*. Koncentrace nestabilizovaných AgNP v neředěném médiu byly 0,5–8,0 mg/l a stabilizovaných AgNP 0,001–1,000 mg/l. Koncentrace stabilizovaných i nestabilizovaných AgNP ve 2krát zředěném médiu byly 0,03–0,50 mg/l. Jako negativní kontrola bylo použito samotné médium M4. Médium a toxikanty byly měněny za čerstvé každé tři dny. Během 21denní expozice byly každý den zaznamenávány počty přeživších dospělců a počty nově narozených jedinců. Rovněž byly zaznamenávány den první reprodukce, celkový počet potomků a délka dospělců na konci testu. Nakonec se spočítala hodnota EC₅₀ (efektivní koncentrace). Pro analýzu statisticky významných rozdílů mezi charakteristikami jedinců z exponované skupiny a kontrolou byl aplikován neparametrický Kruskal-Wallisův test ($p < 0,05$).

Byla také testována akutní toxicita želatiny, aby se určilo, jaké koncentrace želatiny pro stabilizaci AgNP se již nemohou použít, neboť by výrazně ovlivnily výsledky testování toxicity AgNP. Pro tyto účely bylo 10 jedinců odděleně v kádinkách s 50 ml média M4 exponováno želatině po dobu 96 hodin. Kultivace probíhala při 18–22 °C s cyklem 16 hod světlo a 8 hod tma. Organismy byly krmeny řasou *P. subcapitata* od druhého dne. Koncentrace želatiny byla 0,001–0,025 %. Počet přeživších jedinců byl zaznamenáván každý den během 96hodinové expozice. Jako kontrola bylo použito čisté médium M4.

Součástí testů chronické toxicity stabilizovaných AgNP bylo i testování chronické toxicity samotné želatiny v příslušných koncentracích 0,0001 % pro 2krát ředěné médium a 0,005 % pro neředěné médium.

Jak se zřetelně ukázalo, nestabilizované AgNP v neředěném médiu měly nejnižší negativní dopad na populaci dafnií ze všech provedených experimentů. Pro testování byly použity vyšší koncentrace AgNP v rozsahu 0,5–8 mg/l (obr. 31a). Počet přeživších postupně klesal s rostoucí koncentrací AgNP. Expozice nejvyšší použité koncentraci 8 mg/l vedla ke 100% mortalitě hned v první den experimentu. Nejnižší použitá koncentrace 0,5 mg/l pak neukázala žádný negativní vliv na dospělé kromě úhynu jednoho jedince 21. den, který taktéž uhynul v kontrolní skupině.

Přestože koncentrace 0,5; 1 a 2 mg/l neměly žádný nebo jen mírný toxický vliv na životaschopnost rodičovských organismů, byla reprodukce silně ovlivněna v celém koncentračním rozsahu AgNP od 0,5 až po 8 mg/l (obr. 31b). S rostoucí koncentrací AgNP byl počet potomků nižší a čas první snůšky byl opožděn. Celkový počet potomků na konci experimentu klesl na 62 % kontroly dokonce u nejnižší použité koncentraci 0,5 mg/l. Koncentrace 2 mg/l AgNP vedla k opoždění první snůšky o jeden den (kontrola 7,6 dne) a při dvojnásobné koncentraci 4 mg/l dokonce vzrostl na 14,5 dne. Při koncentraci 8 mg/l se pak nevylíhly žádní potomci. Délka dospělců na konci testu postupně klesala s rostoucí koncentrací AgNP z 5 mm (kontrola) na 4,1 mm (4 mg/l). EC_{50} (reprodukce) byla určena na 1 mg/l AgNP.

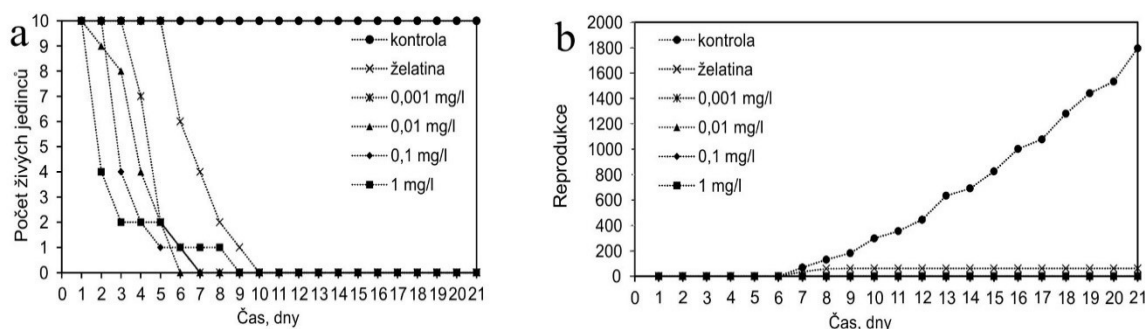


Obrázek 31. Počet přeživších jedinců (a) a potomků (b) *D. magna* exponovaných nestabilizovanému AgNP v neředěném médiu M4 během 21 dní.

Aby mohla být studována toxicita AgNP v jejich původní neovlivněné velikosti, AgNP byly stabilizovány želatinou. Želatina o koncentraci 0,005 % zcela zabránila agregaci v neředěném médiu během 3denního experimentu (obr. 27b), přičemž test akutní toxicity čisté želatiny o stejné koncentraci neodhalil žádné nežádoucí účinky (obr. 30). Stabilizované AgNP projevily mnohem vyšší toxicitu než nestabilizované AgNP, jak potvrdil pokles počtu přeživších dospělců během testu chronické toxicity (obr. 32a). Toxicita byla zaznamenána již během prvních tří dnů testování, kdy třetí den byla pozorována 80% mortalita pro nejvyšší testovanou koncentraci AgNP 1 mg/l, 60% pro 0,1 mg/l a 20% pro 0,01 mg/l. Nejnižší koncentrace 0,001 mg/l neprojevila žádný toxický vliv během těchto tří dnů, nicméně počet dospělců klesl čtvrtý den na 7 a dokonce na jednoho jedince 6. den a 100% mortality bylo dosaženo 7. den. Od devátého dne nezbyl žádný přeživší jedinec v přítomnosti AgNP ve všech testovaných koncentracích.

Překvapivě se želatina během testování chronické toxicity také projevila toxicky, nicméně až mezi 6. a 10. dnem, tedy v době, kdy přežil jediný či dokonce žádný jedinec vystavený AgNP pro všechny koncentrace stříbra (obr. 32a).

V přítomnosti stabilizovaných AgNP se nenarodili žádní potomci. Želatina také značně ovlivnila reprodukci dafnií (obr. 32b). Potomci v přítomnosti čisté želatiny dosáhli celkového počtu pouze 61 oproti kontrolní skupině s počtem 1794 potomků.

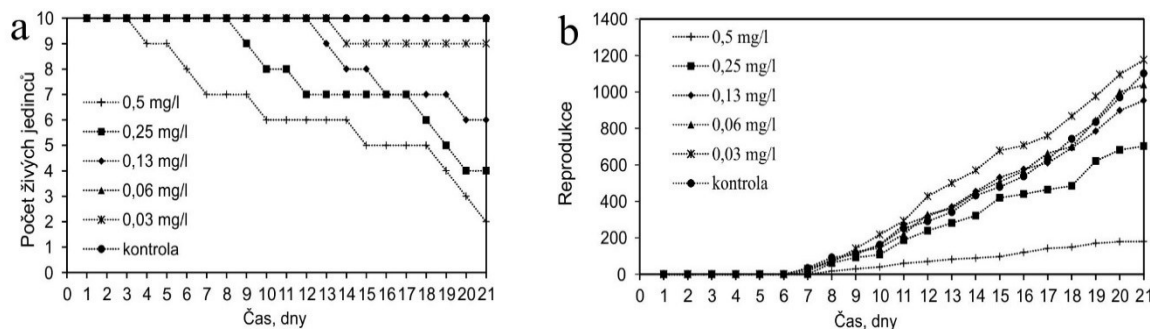


Obrázek 32. Počet přeživších jedinců (a) a potomků (b) *D. magna* exponovaných stabilizovanému AgNP 0,005% želatinou v neředitelném médiu M4 během 21 dní.

Nestabilizované AgNP ve 2krát zředěném médiu byly více toxické (obr. 33) než nestabilizované AgNP v nezředěném médiu (obr. 31). S rostoucí koncentrací AgNP postupně ubýval počet přeživších dospělců a při nejvyšší použité koncentraci 0,5 mg/l byl po 21 dnech pouze dva. Expozice AgNP o koncentracích 0,06 mg/l a 0,03 mg/l nebyly pro dospělé letální kromě jednoho jedince 14. den vystavenému 0,03 mg/l AgNP.

Při všech testovaných koncentracích AgNP také postupně klesal počet potomků (obr. 33b). Oproti 1102 potomkům, kteří se narodili v kontrole bez AgNP, klesl celkový počet potomků na konci testu na 180 v přítomnosti 0,5 mg/l AgNP. Ačkoliv uhynul jeden jedinec při 0,03 mg/l počet potomků byl při této koncentraci AgNP nejen nepatrně vyšší (1176) než u 0,06 mg/l (1040) ale navíc byla pozorována hormeze. Nebyla však ovlivněna ani doba první snůšky ani délka dospělců u žádné ze skupin.

Vypočítaná EC_{50} AgNP pro reprodukci byla 0,32 mg/l.



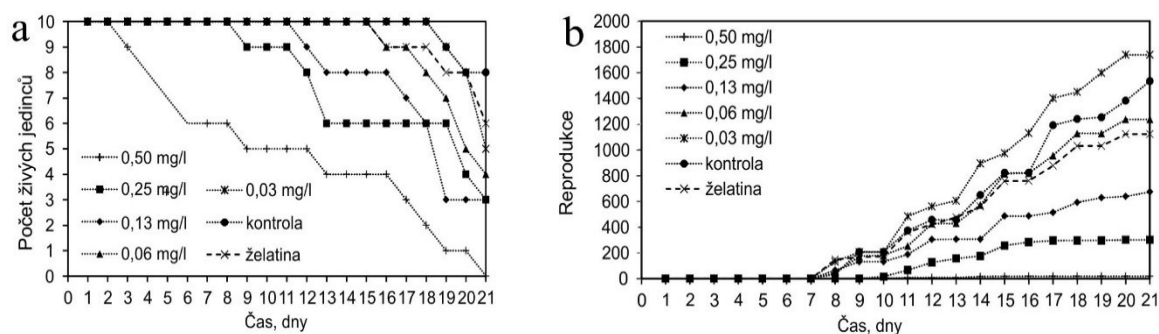
Obrázek 33. Počet přeživších jedinců (a) a potomků (b) *D. magna* exponovaných nestabilizovanému AgNP ve 2krát zředěném médiu M4 během 21 dní.

Dafnie postupně umíraly při vystavení celému rozsahu koncentrací AgNP stabilizovaných 0,0001% želatinou od 0,03 mg/l do 0,5 mg/l (obr. 34a). Na konci testu s AgNP o koncentraci 0,5 mg/l nepřežil žádný dospělec a počet potomků byl pouze 19. Koncentrace 0,25 mg/l AgNP byla přirozeně toxicitější než následujících 0,13 mg/l kromě vyššího počtu přeživších dospělců 19. a 20. den. Nicméně při obou koncentracích byl stejný konečný počet dospělců, tedy tři. AgNP o koncentraci 0,06 mg/l byly mírně toxické, kdy jeden jedinec zemřel 16. den a pouze 4 jedinci přežili na konci testu. Nejnižší koncentrace AgNP 0,03 mg/l také vedla ke smrti jednoho jedince 19. den a na konci testu zbylo 5 jedinců. Mírnou toxicitu vykazovala také želatina ke konci testu, nikoli však v rozsahu, který by ovlivnil interpretaci toxicity samotných AgNP (obr. 34a).

V koncentračním rozsahu AgNP od 0,5 mg/l do 0,06 mg/l byl zaznamenán také postupný pokles celkového počtu potomků s rostoucí koncentrací AgNP (obr. 34b). Taktéž byla pozorována hormeze v nejnižší použité koncentraci AgNP 0,03 mg/l, kdy celkový počet potomků dosáhl 1739 oproti 1534 jedincům v kontrolní skupině. Ačkoliv želatina měla za následek méně mrtvých dospělců než AgNP o koncentraci 0,06 mg/l (1237), celkový počet potomků byl ve skupině za přítomnosti želatiny nižší (1123).

Vypočítaná EC_{50} AgNP pro reprodukci byla 0,16 mg/l.

Doba první snůšky se v žádné ze skupin statisticky významně nelišila od kontrolní skupiny (8,8 dne). Délka dospělců se významně lišila od kontroly po expozici 0,25 mg/l AgNP, kdy se snížila ze 4,8 mm na 3,3 mm.



Obrázek 34. Počet přeživších jedinců (a) a potomků (b) *D. magna* exponovaných stabilizovanému AgNP 0,0001% želatinou ve 2krát zředěném médiu M4 během 21 dní.

Rozpuslné sloučeniny stříbra a AgNP jsou vysoce toxické pro vodní organismy. Toxicita AgNP se často připisuje iontům stříbra uvolněným z jejich povrchu. Různé studie

ukazují, že AgNP jsou pro dafnie toxické v koncentracích od několika mikrogramů až po miligramy na litr. Z toho plyne, že toxicita AgNP velmi závisí na okolních podmínkách, což je třeba brát v potaz při interpretaci výsledků testování toxicity. V této studii bylo cílem charakterizovat chronickou toxicitu AgNP vůči *D. magna* s ohledem na koncentraci média a použití stabilizačního činidla.

Byly pozorovány jasné známky efektu dávka/odpověď nestabilizovaných AgNP na mortalitu a reprodukci *D. magna* v nezředěném M4 médiu (obr. 31a,b). Pozorovaná toxicita však byla mnohem menší než dříve publikované toxické koncentrace AgNP. Nejnižší koncentrace s pozorovanými negativními účinky na délku dospělců na konci testu byla 2 mg/l a vypočítaná EC_{50} pro reprodukci dosáhla 1 mg/l. Naopak bylo publikováno, že např. AgNP pokryté vrstvou uhlíku o koncentraci 50 $\mu\text{g/l}$ mohou inhibovat reprodukci a redukovat délku dospělců,²⁸⁷ a EC_{10} PVP-stabilizovaných AgNP v chronickém testu toxicity dosáhly hodnot 0,92 $\mu\text{g/l}$ pro *D. magna*, 2,25 $\mu\text{g/l}$ pro *D. pulex* a 3,45 $\mu\text{g/l}$ pro *D. galeata*.²⁸⁸

Důvodem nízké toxicity byla agregace a rekrystalizace původních malých 28nm AgNP do větších částic. Je známo, že antibakteriální aktivita a cytotoxicita klesá s rostoucí velikostí částic (viz kapitoly 2.1 a 6.1). Po smíchání AgNP s kultivačním médiem se postupně snižoval absorpční pík povrchového plazmonu původních nanočástic a objevil se nový sekundární pík u větších vlnových délek, který značí přítomnost agregátů větších než 100 nm.²⁸⁹ Navíc se sekundární píky postupně posunovaly k vyšším vlnovým délkám, což také značí zvětšování částic (obr. 27a), jak také potvrdily snímky z TEM. TEM snímky pořízené 24 hodin po smíchání AgNP s médiem potvrdily, že původní malé částice byly přítomny spolu s částicemi nově zformovanými rekrystalizací o průměru kolem 200 nm (obr. 29a,b). Oxidační činidla a koordinační ligandy hrají klíčovou roli v procesu rekrystalizace, protože způsobují tzv. (oxidative etching) oxidační leptání a rozpouštění AgNP, které podporuje růst nových krystalů. Rekrystalizované částice jsou výsledkem dvou kooperujících procesů – oxidace a redukce. Nulavalentní částice, které vznikají redukcí soli kovu a postupně rostou do nanokrystalu, mohou být za přítomnosti oxidovadel a koordinačních ligandů znovu oxidovány do iontové formy. Umožňuje to regulovat velikost, tvar a krystalinitu během nukleace a růstu.^{251,285,290}

V přítomnosti oxidačních činidel se AgNP rozpouští a produkuje iontové stříbro, které je pro vodní organismy velmi toxickou formou stříbra. Proto je toxicita vůči korýšům, jakou jsou dafnie, připisována především uvolněnému iontovému stříbru z povrchu AgNP.^{287,291} Přesto některé studie ukázaly, že mechanismus toxicity AgNP se liší od mechanismu toxicity stříbrných solí.²⁵⁰ Toxicita způsobená ionty stříbra může být

redukována za přítomnosti jiných sloučenin, jako jsou komplexní činidla a rozpuštěné organické látky.^{292,293} Při našich experimentech bylo pravděpodobně iontové stříbro komplexováno kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA), komponentou média M4, a proto lze předpokládat, že toxicita způsobená iontovým stříbrem byla redukována. Další snížení koncentrace přítomných uvolněných iontů stříbra mohlo nastat v přítomnosti řas použitých jako potrava pro dafnie. Podobně Blinova a kol. při použití AgNP stabilizovaných PVP (PVP-AgNP) a Sakamoto a kol. při použití nestabilizovaných AgNP pozorovali nižší chronickou toxicitu než akutní, což přičítají právě přídatku řas v chronickém testu.^{292,294} Navíc exudáty řas mohou výrazně snižovat toxicitu kovů obecně.²⁹⁵

Jak bylo zmíněno výše, toxicita částic nepřímo koreluje s jejich velikostí. Proto je stabilita částic důležitým parametrem, který rozhoduje o jejich toxicitě. Malé částice lépe penetrují do buněk než velké částice a snáze uvolňují ionty stříbra.^{244,296} Kromě stabilizačních činidel je stabilita AgNP velmi závislá na okolních faktorech jako pH nebo iontová síla.^{252,253} Když se tedy koncentrace elektrolytu sníží zředěním média, měla by podle DLVO teorie vzrůst stabilita AgNP.²⁷ Bylo publikováno několik málo studií, které se zabývaly vlivem zředění kultivačního média na stabilitu AgNP a akutní toxicitu k dafniím. Römer a kol. objevili, že standardní OECD médium musí být zředěno alespoň 10krát, aby se významně potlačila agregace citrátem stabilizovaných AgNP a zároveň toto zředění nijak neovlivnilo mobilitu nebo fekunditu organismů v nepřítomnosti AgNP.²⁵⁶ Nejnižší koncentrace s pozorovanými negativními účinky se snížila z 11,2 µg/l na 2,5 µg/l.²⁵⁸ Podobně 10násobné zředění standardního OECD média (s chloridy) neovlivnilo agregační stabilitu PVP-AgNP.²⁵⁷

K minimalizaci toxicity želatiny byla použita velmi nízká koncentrace 0,0001 %. Při takto nízké koncentraci stabilizační látky muselo být kultivační médium 2krát zředěno, aby se potlačila nebo zpomalila agregace. Podle očekávání byla agregace nestabilizovaných AgNP ve zředěném médiu pomalejší a malé částice zůstávaly v médiu po delší dobu, což ukazuje pozvolnější klesání primárního absorpčního maxima v čase než za použití neředěného média (obr. 28a). Ve zředěném médiu byly tedy AgNP toxičtější (obr. 33a,b) než v neředěném (obr. 31a,b) jak z pohledu mortality rodičovských organismů, tak z pohledu reprodukce. Hodnoty EC₅₀ pro reprodukci byly 0,32 mg/l ve zředěném a 1 mg/l v neředěném médiu. Životaschopnost dospělců a jejich reprodukce v kontrolní skupině bez toxikantů nebyla ovlivněna zředěním média.

Přidáním 0,0001 % želatiny se ještě zvýšila stabilita AgNP (obr. 28b). Značná část AgNP zůstala stabilní po dobu tří dnů, což je doba, po které se v chronickém testu

vyměňovaly toxikanty za nové. Stabilizované AgNP byly pak pro dospělé toxičtější a silněji ovlivnily reprodukci (obr. 34a,b) než nestabilizované částice. U nejnižší testované koncentrace stabilizovaných i nestabilizovaných AgNP, tedy 0,03 mg/l, se projevila hormeze, kdy byl konečný počet potomků vyšší než v kontrolní skupině. Podobné pozorování bylo publikováno dříve, kdy reprodukce dafnií exponovaných 2 µg/l ve 21denním chronickém testu toxicity byla 2krát vyšší než v kontrolní skupině.²⁹⁷ V jiné studii se v multigeneračním experimentu dokonce v některých generacích *D. pulex* a *D. galeata* projevila tolerance k AgNP.²⁸⁸

Vypočítané hodnoty EC₅₀ stabilizovaných a nestabilizovaných AgNP v ředěném médiu byly 0,16 mg/l pro stabilizované AgNP a 0,32 mg/l pro nestabilizované AgNP, a tedy stabilizované AgNP byly toxičtější než nestabilizované.

Želatina se i ve velmi nízké koncentraci 0,0001 % projevila na konci 21denního testu také mírně toxicky (obr. 34a,b). Její toxicita však neměla vliv na životaschopnost jedinců při expozici AgNP o nejnižší použité koncentraci.

Za použití vyšší koncentrace želatiny (0,005 %) zůstaly AgNP stabilní (obr. 27b) a se svojí malou velikostí (28 nm) byly v neředěném médiu mnohem toxičtější než AgNP nestabilizované, které podlely agregaci nebo rekrystalizaci. Při všech koncentracích AgNP ≥ 1 µg/l došlo k rychlému úhynu dospělců a organismy se nereprodukovaly (obr. 32a,b). Ve skupině s želatinou se narodilo pouze 16 potomků (obr. 32b). Disperze nanočástic mají několik různých komponent. Kromě částic samotných zde mohou být přítomny např. ionty uvolněné z povrchu částic, zbytky reaktantů, sloučeniny použité ke stabilizaci nebo modifikaci povrchu částice. Každá z těchto složek může přispívat k celkové toxicitě disperze, a proto by každá ze složek měla být testována zvlášť a měl by se vyhodnotit příspěvek k toxicitě. Použitá želatina o koncentraci 0,005 % toxicky v chronickém testu, přestože v akutním testu toxicity (obr. 30) organismy neovlivnila. Závislost toxicity nanočástic na použitém stabilizačním činidle byla publikována i dříve.²⁴⁶ Toxicita celku, která se projevuje navenek, může pocházet pouze od jedné ze složek disperze a nanočástice samotné toxické nemusí být vůbec.²⁹⁸ Alkily a kol. pozorovali, že surfaktant cetyltrimethylamonium bromid (CTAB), který použili při syntéze nanotyček byl cytotoxický, ale samotné nanotyčky nikoliv. Stabilizační činidlo může také měnit náboj nanočástic a redukovat tak elektrostatickou bariéru mezi buňkou a částicí.²⁹⁹ Proto množství a typ stabilizačního činidla musí být vzato v úvahu při vyhodnocování testu toxicity nanomateriálů.

Závěr

Dizertační práce prezentuje ve své teoretické i praktické části poznatky z oblasti biologické aktivity nanočástic stříbra vůči eukaryotním a prokaryotním organismům. Práce na jedné straně vyzdvihuje antimikrobiální vlastnosti AgNP a jejich synergické působení s antibiotiky vůči citlivým a vysoce rezistentním bakteriím a zároveň na straně druhé varuje před možností vzniku bakteriální rezistence podobně jako u antibiotik a před jejich toxikologickými a ekotoxikologickými riziky.

Pro studium biologických vlastností byly převážně aplikovány kulovité AgNP s průměrnou velikostí 28 nm, které byly syntetizovány ověřenou a spolehlivou metodou vycházející z Tollensovy reakce, která spočívá v redukci amoniakálního komplexu stříbra redukujícími sacharidy. Pro posouzení vlivu velikosti AgNP na společný antibakteriální účinek s antibiotiky byly navíc připraveny částice s menší průměrnou velikostí 8 nm redukcí silnějším činidlem tetrahydridoboritanem sodným.

První část experimentální práce je zaměřena na studium společného antibakteriálního účinku AgNP v kombinaci s antibiotiky. Dosažené výsledky této studie prokázaly, že AgNP posilují účinek celé řady antibiotik proti různým druhům nejen lidských, ale i zvířecích Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií, a to nezávisle na mechanismu účinku a chemické struktuře použitých antibiotik. Pozitivní výsledky přineslo testování synergie nejen vůči bakteriím citlivým k antibiotikům, ale i vůči multirezistentním enterobakteriím. Synergický antibakteriální efekt AgNP v kombinaci s antibiotiky vůči citlivým i rezistentním bakteriím byl dosažen při velmi nízkých koncentracích, řádově až v desetinách mg/l stříbra. Takto nízké koncentrace AgNP v kombinaci s antibiotiky nevykazovaly cytotoxický účinek vůči savcím buňkám a nepředstavují tak toxikologické riziko pro vyšší organismy. Navíc v případě rezistentních bakterií došlo k obnovení citlivosti bakterií k antibiotikům v kombinaci s AgNP, jinými slovy byla úspěšně překonána bakteriální rezistence vůči antibiotikům, pokud se aplikovala společně s AgNP.

V druhé části experimentální práce se podařilo vyvolat a následně objasnit mechanismus rezistence bakterií *E. coli* a *P. aeruginosa* k AgNP po opakované expozici subinhibičními koncentracemi AgNP. Rezistence k AgNP byla indukována poměrně snadno a brzy, již ve 13. kultivačním kroku vykazovaly testované bakterie zvýšenou odolnost vůči AgNP. Příčinou indukované rezistence je produkce proteinu flagelinu, který

způsobuje agregaci AgNP za vzniku rozměrných sedimentujících částic stříbra, které nevykazují antibakteriální účinnost. Tento doposud v odborné literatuře nepopsaný objev má obrovský význam nejen v prevenci vzniku rezistence bakterií, ale i v oblasti eliminace vysoce infekčních bakterií.

Poslední část práce popisuje výsledky studie vlivu koncentrace živného média a stabilizačních činidel na stabilitu a dlouhodobou toxicitu AgNP vůči organismus *D. magna*. AgNP bez dodatečné povrchové stabilizace snadno a rychle podléhají agregaci díky vysoké iontové síle živného média a následně až rekrystalizaci do větších útvarů doprovázené ztrátou toxicity. Naopak v případě aplikace živného média s poloviční koncentrací a v případě želatinou stabilizovaných AgNP byla jejich toxicita k *D. magna* výrazně vyšší vzhledem k zachování malého rozměru a tím vysoké biologické aktivity AgNP.

Summary

Theoretical and practical part of dissertation thesis discussed discoveries related to biological activity of silver nanoparticles against eukaryotic and prokaryotic organisms. On the one hand, the thesis is focused on antimicrobial properties of AgNPs and their synergistic action with antibiotics against highly resistant bacteria and, on the other hand, deals with possible occurrence of bacterial resistance to AgNPs similar to antibiotics and their toxicological and eco-toxicological risks.

For study of biological properties, spherical AgNPs with mean diameter of 28 nm were applied. AgNPs were synthesized by reliable method derived from Tollen's reaction, which is based on reduction of ammonia complex of silver by reducing saccharides. Also, smaller AgNPs with mean diameter of 8 nm was prepared by reduction with stronger reducing agent sodium borohydride for assessment of size effect on antibacterial activity.

The first part of experimental work is focused on study of combined antibacterial action of AgNPs with antibiotics. The results proved that AgNPs enhance the activity of many antibiotics against different species of human and animal Gram-positive and Gram-negative bacteria. This enhancement was shown with no dependence on mechanism of action or chemical structure of antibiotics. Positive results of synergy testing was shown not only against bacteria sensitive to antibiotics but also against multi-resistant Enterobacteriaceae. Synergic antibacterial effect of AgNPs in combination with antibiotics against both, sensitive and resistant bacteria, was achieved in very low concentrations, in the order from tenths to units of mg/l. These concentrations of AgNPs does not exhibit toxic effects against mammalian cells and does not pose a toxicological risk for higher organisms. Moreover, in the case of resistant bacteria, restoration of sensitivity to antibiotics caused by combination of AgNPs was shown.

The second part of experimental work deals with resistance of bacteria to AgNPs. Resistance to AgNPs was successfully induced in *E. coli* and *P. aeruginosa* and mechanism of this resistance was elucidated. The resistance was caused by exposition the bacteria to sub-inhibitory concentrations of AgNPs and was observed only after 13 exposition steps, when bacteria exhibit increased tolerance to AgNPs. The observed induced resistance is based on production of protein flagellin, which causes aggregation of AgNPs and formation of large particles of silver, which sediment and does not exhibit antibacterial activity. This

phenomenon, which has never been described in literature before, has importance in prevention of emergence of resistance and in the elimination of highly infectious bacteria.

The last part of work describes the influence of culture medium concentration and surface stabilizers to stability and long-term toxicity of AgNPs against crustacean *D. magna*. AgNPs without additional surface stabilization subject to fast aggregation as result of high ionic strength of culture medium. The aggregation is accompanied with recrystallization to bigger particles and loss of toxicity. On the contrary, in case of using 2-fold diluted medium and AgNPs stabilized by gelatine, the toxicity against *D. magna* was significantly higher, because small diameter and AgNP biological activity was unaffected.

Seznam použitých zkratek

AFM	mikroskopie atomárních sil
AgNP	nanočástice stříbra
AMC	amoxilin + klavulanát
AMI	amikacin
AMP	ampicilin
AmpC	cefalosporinázy
AMS	ampicilin/sulbaktam
ATM	aztreonam
AZT	aztreonam
BHI	bujón z mozkosrdcové infuze
BWA	Burrows-Wheeler Alignerem
CCA	ceftazidim + klavulanát
CFU	jednotky tvořící kolonie
CIP	ciprofloxacín
CLI	klindamycin
CLSI	Institut pro klinické a laboratorní standardy
CMP	chloramfenikol
COL	kolistin
COT	kotrimoxazol
COX	cefotaxim
CPM	cefepim
CPR	cefoperazon
CRX	cefuroxim
CReSA	centrum pro výzkum nemocí zvířat
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CTZ	ceftazidim
CXT	cefoxitin
CZD	ceftazidim
CZL	cefazolin
DDST	diskový difuzní test s inhibitorem betalaktamáz
DLS	dynamický rozptyl světla
DLVO	teorie stability lyofobních koloidů (dle jmen: Derjagin, Landau, Verwey a Overbeek)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium
EC ₅₀ (EC ₁₀)	koncentrace látky, která způsobí určitý efekt u 50 (10) % testovaných organismů
EDS	energieově disperzní spektroskopie
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EPS	extracelulární polymerní látky
ERY	erytromycin
ETD	fragmentace přenosem elektronu
EUCAST	Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti
FEP	cefepim
FIC	frakční inhibiční koncentrační index
GEL	želatina
GEN	gentamicin

HAADF	detektor elektronů difraktovaných pod velkými úhly
HRTEM	transmisní elektronová mikroskopie s vysokým rozlišením
HSV	herpes simplex virus
KPC	karbapenemázy
LD ₅₀	dávka látky, která je smrtelná pro 50 % testovaných organismů
LOAEL	nejnižší dávka látky, při které je ještě pozorován významný nepříznivý účinek na organismus
M.-H.	Müller-Hinton
MALDI-TOF	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s hmotnostním analyzátozem doby letu
MER	meropenem
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MTT	thiazolylová modř
NGS	next-generation sekvenování
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
OFL	ofloxacin
OXA	oxacilin
OXO	oxolinová kyselina
PAA	kyselina polyakrylová
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
PEN	penicilin
PGRE	extrakt z kůry granátového jablka
PIP	piperacilin
PPT	piperacilin/tazobaktam
PVP	polyvinylpyrrolidon
SAM	Sequence Alignment/Map
SARS	syndrom náhlého selhání dýchání
SDS	dodecyl sulfát sodný
SERRS	povrchem zesílený rezonanční Ramanův rozptyl
SERS	povrchem zesílená Ramanova spektroskopie
STEM	rastrovací transmisní elektronová mikroskopie
TCRV	virus Tacaribe
TEI	teikoplanin
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TET	tetracyklin
TFA	kyselina trifluoroctová
TLR	toll-like receptor
TNBC	triple negativní karcinom prsu
TW	tween
VAN	vankomycin
WGS	whole-genome shotgun

Reference

1. Vance, M. E. et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1769–1780 (2015).
2. Panáček, A. et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem. B* 110, 16248–16253 (2006).
3. Shrivastava, S. et al. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* 18, 225103 (2007).
4. Farkas, J. et al. Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine. *Environ. Int.* 37, 1057–1062 (2011).
5. Wagner, S., Gondikas, A., Neubauer, E., Hofmann, T. & Von Der Kammer, F. Spot the difference: Engineered and natural nanoparticles in the environment-release, behavior, and fate. *Angewandte Chemie - International Edition* 53, 12398–12419 (2014).
6. Krutyakov, Y. A., Kudrinskiy, A. A., Olenin, A. Y. & Lisichkin, G. V. Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. *Russ. Chem. Rev.* 77, 233–257 (2008).
7. Peiris, S., McMurtrie, J. & Zhu, H.-Y. Metal nanoparticle photocatalysts: emerging processes for green organic synthesis. *Catal. Sci. Technol.* 6, 320–338 (2016).
8. Link, S. & El-Sayed, M. A. OPTICAL PROPERTIES AND ULTRAFast DYNAMICS OF METALLIC NANOCRYSTALS. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 54, 331–66 (2003).
9. Mock, J. J., Barbic, M., Smith, D. R., Schultz, D. A. & Schultz, S. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *J. Chem. Phys.* 116, 6755–6759 (2002).
10. Willets, K. A. & Van Duyne, R. P. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 58, 267–297 (2007).
11. Pecora, R. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *J. Nanoparticle Res.* 2, 123–131 (2000).
12. Panáček, A. et al. Polyacrylate-Assisted Size Control of Silver Nanoparticles and Their Catalytic Activity. *Chem. Mater.* 26, 1332–1339 (2014).
13. Lee, I., Han, S. W. & Kim, K. Simultaneous preparation of SERS-active metal colloids and plates by laser ablation. *J. Raman Spectrosc.* 32, 947–952 (2001).
14. Creighton, J. A., Blatchford, C. G. & Albrecht, M. G. Plasma Resonance Enhancement of Raman Scattering by Pyridine Adsorbed on Silver or Gold Sol Particles of Size Comparable to the Excitation Wavelength. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* 75, 790–798 (1979).
15. Soukupová, J., Kvítek, L., Panáček, A., Nevěčná, T. & Zbořil, R. Comprehensive study on surfactant role on silver nanoparticles (NPs) prepared via modified Tollens process. *Mater. Chem. Phys.* 111, 77–81 (2008).
16. Lee, P. C. & Meisel, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem.* 86, 3391–3395 (1982).
17. Sato, T., Onaka, H. & Yonezawa, Y. Sensitized photoreduction of silver ions in the presence of acetophenone. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 127, 83–87 (1999).
18. Scaiano, J. C. et al. Photochemical routes to silver and gold nanoparticles. *Pure Appl. Chem.* 81, 635–647 (2009).
19. Callegari, A., Tonti, D. & Chergui, M. Photochemically Grown Silver Nanoparticles with Wavelength-Controlled Size and Shape. *Nano Lett.* 3, 1565–1568 (2003).
20. Scaiano, J. C., Aliaga, C., Maguire, S. & Wang, D. Magnetic Field Control of Photoinduced Silver Nanoparticle Formation. *J. Phys. Chem. B* 110, 12856–12859 (2006).
21. Shahverdi, A. R., Fakhimi, A., Shahverdi, H. R. & Minaian, S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine* 3, 168–171 (2007).
22. Birla, S. S. et al. Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 173–179 (2009).
23. Devi, L. S., Khaund, P., Nongkhaw, F. M. W. & Joshi, S. R. Diversity of culturable soil micro-fungi along altitudinal gradients of eastern Himalayas. *Mycobiology* 40, 151–158 (2012).
24. Fayaz, A. M. et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine* 6, 103–9 (2010).

25. Mala, R., Arunachalam, P. & Sivasankari, M. SYNERGISTIC BACTERICIDAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES AND CIPROFLOXACIN AGAINST PHYTOPATHOGENS. *J. Cell Tissue Res.* 12, 3249–3254 (2012).
26. Ghosh, S. et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *Int. J. Nanomedicine* 7, 483–496 (2012).
27. Verwey, E. J. W. & Overbeek, J. T. G. Theory of the stability of lyophobic colloids. *The Journal of physical and colloid chemistry* 51, 631–636 (1947).
28. Brown, M. A., Goel, A. & Abbas, Z. Effect of Electrolyte Concentration on the Stern Layer Thickness at a Charged Interface. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 55, 3790–3794 (2016).
29. Kvítek, L. et al. Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *J. Phys. Chem. C* 112, 5825–5834 (2008).
30. Ramyadevi, J., Jeyasubramanian, K., Marikani, A., Rajakumar, G. & Rahuman, A. A. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Mater. Lett.* 71, 114–116 (2012).
31. Sirelkhatim, A. et al. Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Lett.* 7, 219–242 (2015).
32. Lima, E., Guerra, R., Lara, V. & Guzmán, A. Gold nanoparticles as efficient antimicrobial agents for *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Chem. Cent. J.* 7, (2013).
33. Sharma, V. K., Yngard, R. a & Lin, Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv. Colloid Interface Sci.* 145, 83–96 (2009).
34. Panáček, A. et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 30, 6333–6340 (2009).
35. Kvítek, L. et al. Initial Study on the Toxicity of Silver Nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. *J. Phys. Chem. C* 113, 4296–4300 (2009).
36. Sujitha, V. et al. Green-synthesized silver nanoparticles as a novel control tool against dengue virus (DEN-2) and its primary vector *Aedes aegypti*. *Parasitol. Res.* 114, 3315–3325 (2015).
37. Chaudhary, A. Ayurvedic Bhasma: Nanomedicine of ancient India - Its global contemporary perspective. *J. Biomed. Nanotechnol.* 7, 68–69 (2011).
38. Magner, L. N. in *Hippocrates and the Hippocratic Tradition. A history of medicine* (ed. Duffy, J.) 66–96 (Marcel Dekker, Inc., NYC, 1992).
39. Rosenman, K. D., Moss, A. & Kon, S. Argyria: clinical implications of exposure to silver nitrate and silver oxide. *J. Occup. Med.* 21, 430–5 (1979).
40. Forbes, G. B. & Forbes, G. M. Silver Nitrate and the Eyes of the Newborn. *Am. J. Dis. Child.* 121, 1 (1971).
41. Klasen, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* 26, 117–130 (2000).
42. Morris, M. The therapeutic effects of colloidal preparations. *Br. Med. J.* 1, 617 (1917).
43. Hovell, T. M. GASTRO-INTESTINAL SEPSIS A CAUSE OF MENIERE'S SYMPTOMS. *Br. Med. J.* 2, 787–8 (1917).
44. Sanderson-Wells, T. H. A CASE OF PUERPERAL SEPTICÆMIA SUCCESSFULLY TREATED WITH INTRAVENOUS INJECTIONS OF COLLOSOL ARGENTUM. *Lancet* 191, 258–259 (1918).
45. Alexander, J. W. History of the Medical Use of Silver *. 10, (2009).
46. Fox, C. L. & Modak, S. M. Mechanism of Silver Sulfadiazine Action on Burn Wound Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5 (6), 582–588 (1974).
47. Knetsch, M. L. W. & Koole, L. H. New strategies in the development of antimicrobial coatings: The example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 3, 340–366 (2011).
48. Vasilev, K., Cook, J. & Griesser, H. J. Antibacterial surfaces for biomedical devices. *Expert Rev. Med. Devices* 6, 553–567 (2009).
49. Samuel, U. & Guggenbichler, J. P. Prevention of catheter-related infections: The potential of a new nano-silver impregnated catheter. *Int. J. Antimicrob. Agents* 23, 75–78 (2004).
50. Chaloupka, K., Malam, Y. & Seifalian, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 28, 580–588 (2010).
51. Das, B. et al. Green-synthesized silver nanoparticles kill virulent multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains: A mechanistic study. *BLDE Univ. J. Heal. Sci.* 1, 89–101 (2016).
52. Panáček, A. et al. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant *Enterobacteriaceae*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 142, 392–399 (2016).
53. Lubick, N. Nanosilver toxicity: Ions, nanoparticles - Or both? *Environmental Science and Technology* 42, 8617 (2008).

54. Xiu, Z. M., Zhang, Q. B., Puppala, H. L., Colvin, V. L. & Alvarez, P. J. J. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Lett.* 12, 4271–4275 (2012).
55. Jung, W. K. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2171–2178 (2008).
56. Lara, H. H., Ayala-Núñez, N. V., Ixtepan Turrent, L. D. C. & Rodríguez Padilla, C. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 615–621 (2010).
57. Feng, Q. L. et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* 52, 662–668 (2000).
58. Holt, K. B. & Bard, A. J. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺. *Biochemistry* 44, 13214–13223 (2005).
59. Das, B. et al. Green synthesized silver nanoparticles destroy multidrug resistant bacteria via reactive oxygen species mediated membrane damage. *Arab. J. Chem.* 10, 862–876 (2017).
60. Yamanaka, M., Hara, K. & Kudo, J. Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on *Escherichia coli* , Studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on *Escherichia coli* , Studied by Energy-Filtering Transmi. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7589–7593 (2005).
61. Amro, N. A. et al. High-resolution atomic force microscopy studies of the *Escherichia coli* outer membrane: structural basis for permeability. *Langmuir* 16, 2789–2796 (2000).
62. Dibrov, P., Dzioba, J., Gosink, K. K. & Häse, C. C. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2668–2670 (2002).
63. Morones, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346–2353 (2005).
64. Martínez-Castañón, G. A., Niño-Martínez, N., Martínez-Gutierrez, F., Martínez-Mendoza, J. R. & Ruiz, F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J. Nanoparticle Res.* 10, 1343–1348 (2008).
65. Agnihotri, S., Mukherji, S. & Mukherji, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv.* 4, 3974–3983 (2014).
66. Lu, Z., Rong, K., Li, J., Yang, H. & Chen, R. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24, 1465–1471 (2013).
67. Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan, D. & Shah, S. I. Synthesis and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 5, 244–249 (2005).
68. Pal, S., Tak, Y. K. & Song, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1712–1720 (2007).
69. Singh, S., Bharti, A. & Meena, V. K. Green synthesis of multi-shaped silver nanoparticles: optical, morphological and antibacterial properties. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* 26, 3638–3648 (2015).
70. Flemming, H. C. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8, 623–633 (2010).
71. O’Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79 (2000).
72. Watnick, P. & Kolter, R. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 182, 2675–9 (2000).
73. Venditti, M. et al. Catheter-Related Endocarditis Due to Glycopeptide-Resistant *Enterococcus faecalis* in a Transplanted Heart. *Clin. Infect. Dis.* 17, 524–525 (1993).
74. Gaidhani, S. V. et al. Time dependent enhanced resistance against antibiotics & metal salts by planktonic & biofilm form of *Acinetobacter haemolyticus* MMC 8 clinical isolate. *Indian J. Med. Res.* 140, 665–671 (2014).
75. Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 114–122 (2003).
76. Elasri, M. O. & Miller, R. V. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2025–2031 (1999).
77. Chang, W. S. et al. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. in *Journal of Bacteriology* 189, 8290–8299 (2007).
78. Goodman, S. D. et al. Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. *Mucosal Immunol.* 4, 625–637 (2011).

79. Gaidhani, S. et al. Biofilm disruption activity of silver nanoparticles synthesized by *Acinetobacter calcoaceticus* PUCM 1005. *Mater. Lett.* 108, 324–327 (2013).
80. Martinez-Gutierrez, F. et al. Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. *Biofouling* 29, 651–660 (2013).
81. Kalishwaralal, K., BarathManiKanth, S., Pandian, S. R. K., Deepak, V. & Gurunathan, S. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 79, 340–344 (2010).
82. Ansari, M., Khan, H., Khan, A., Cameotra, S. & Alzohairy, M. Anti-biofilm efficacy of silver nanoparticles against MRSA and MRSE isolated from wounds in a tertiary care hospital. *Indian J. Med. Microbiol.* 33, 101–109 (2015).
83. Salunke, G. R. et al. Rapid efficient synthesis and characterization of silver, gold, and bimetallic nanoparticles from the medicinal plant *Plumbago zeylanica* and their application in biofilm control. *Int. J. Nanomedicine* 9, 2635–2653 (2014).
84. Brown, G. D., Denning, D. W. & Levitz, S. M. Tackling human fungal infections. *Science* (80-.). 336, 647 (2012).
85. Hay, R. J., Robles, W., Midgley, G. & Moore, M. K. Tinea capitis in Europe: new perspective on an old problem. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 15, 229–233 (2001).
86. Ogar, A., Tylko, G. & Turnau, K. Antifungal properties of silver nanoparticles against indoor mould growth. *Sci. Total Environ.* 521–522, 305–314 (2015).
87. Crook, B. & Burton, N. C. Indoor moulds, Sick Building Syndrome and building related illness. *Fungal Biol. Rev.* 24, 106–113 (2010).
88. Lockhart, S. R. et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3435–3442 (2012).
89. Perlin, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist. Updat.* 10, 121–130 (2007).
90. Jo, Y.-K., Kim, B. H. & Jung, G. Antifungal Activity of Silver Ions and Nanoparticles on Phytopathogenic Fungi. *Plant Dis.* 93, 1037–1043 (2009).
91. Lamsal, K. et al. Application of silver nanoparticles for the control of *Colletotrichum* species in vitro and pepper anthracnose disease in field. *Mycobiology* 39, 194–199 (2011).
92. Jo, Y. K. et al. Use of silver nanoparticles for managing *Gibberella fujikuroi* on rice seedlings. *Crop Prot.* 74, 65–69 (2015).
93. Gorczyca, A., Pocięcha, E., Kasprończak, M. & Niemiec, M. Effect of nanosilver in wheat seedlings and *Fusarium culmorum* culture systems. *Eur. J. Plant Pathol.* 142, 251–261 (2015).
94. Gajbhiye, M., Kesharwani, J., Ingle, A., Gade, A. & Rai, M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 5, 382–386 (2009).
95. Kim, K. J. et al. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *BioMetals* 22, 235–242 (2009).
96. Kim, S. W. et al. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology* 40, 53–58 (2012).
97. Servin, A. et al. A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *J. Nanoparticle Res.* 17, 92 (2015).
98. Rai, M. et al. Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: The emerging trends and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1951–1961 (2014).
99. Akbarzadeh, A. et al. An overview application of silver nanoparticles in inhibition of herpes simplex virus. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 46, 1–5 (2017).
100. Mehrbod, P. et al. In Vitro Antiviral Effect of ‘Nanosilver’ on Influenza Virus. *DARU J. Pharm. Sci.* 17, 88–93 (2015).
101. Lara, H. H., Ayala-Núñez, N. V., Ixtapan-Turrent, L. & Rodríguez-Padilla, C. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J. Nanobiotechnology* 8, 1–10 (2010).
102. Lu, L. et al. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivir. Ther.* 13, 253–262 (2008).
103. Elbeshehy, E. K. F., Elazzazy, A. M. & Aggelis, G. Silver nanoparticles synthesis mediated by new isolates of *Bacillus* spp., nanoparticle characterization and their activity against Bean Yellow Mosaic Virus and human pathogens. *Front. Microbiol.* 6, 1–13 (2015).
104. Rogers, J. V., Parkinson, C. V., Choi, Y. W., Speshock, J. L. & Hussain, S. M. A preliminary assessment of silver nanoparticle inhibition of monkeypox virus plaque formation. *Nanoscale Res. Lett.* 3, 129–133 (2008).
105. Elechiguerra, J. L. et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. Nanobiotechnology* 3, 6 (2005).

106. Xiang, D., Chen, Q., Pang, L. & Zheng, C. Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro. *J. Virol. Methods* 178, 137–142 (2011).
107. Speshock, J. L., Murdock, R. C., Braydich-Stolle, L. K., Schrand, A. M. & Hussain, S. M. Interaction of silver nanoparticles with Tacaribe virus. *J. Nanobiotechnology* 8, 9 (2010).
108. Baram-Pinto, D., Shukla, S., Perkas, N., Gedanken, A. & Sarid, R. Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate. *Bioconjug. Chem.* 20, 1497–1502 (2009).
109. Baliyan, A., Usha, S. P., Gupta, B. D., Gupta, R. & Sharma, E. K. Localized surface plasmon resonance-based fiber-optic sensor for the detection of triacylglycerides using silver nanoparticles. *J. Biomed. Opt.* 22, 1 (2017).
110. Abumazwed, A., Kubo, W., Shen, C., Tanaka, T. & Kirk, A. G. Projection method for improving signal to noise ratio of localized surface plasmon resonance biosensors. *Biomed. Opt. Express* 8, 446–459 (2017).
111. De Angelis, F. et al. Breaking the diffusion limit with super-hydrophobic delivery of molecules to plasmonic nanofocusing SERS structures. *Nat. Photonics* 5, 682–687 (2011).
112. Nie, S. M. & Emery, S. R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science* (80-.). 275, 1102–1106 (1997).
113. Xu, R., Wang, D., Zhang, J. & Li, Y. Shape-dependent catalytic activity of silver nanoparticles for the oxidation of styrene. *Chem. - An Asian J.* 1, 888–893 (2006).
114. Jana, N. R. & Pal, T. Growing small metal particle as redox catalyst. *Curr. Sci.* 75, 145–149 (1998).
115. Pradhan, N., Pal, A. & Pal, T. Silver nanoparticle catalyzed reduction of aromatic nitro compounds. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 196, 247–257 (2002).
116. Zhai, H.-J., Sun, D.-W. & Wang, H.-S. Catalytic properties of silica/silver nanocomposites. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6, 1968–1972 (2006).
117. Zhang, W. et al. Facile, template-free synthesis of silver nanodendrites with high catalytic activity for the reduction of p-nitrophenol. *J. Hazard. Mater.* 217–218, 36–42 (2012).
118. Shiraishi, Y. & Toshima, N. Colloidal silver catalysts for oxidation of ethylene. *J. Mol. Catal. A Chem.* 141, 187–192 (1999).
119. Furno, F. et al. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: A new approach to prevention of infection? *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 1019–1024 (2004).
120. Fazly Bazzaz, B. S., Khameneh, B., Jalili-Behabadi, M. mehdi, Malaekheh-Nikouei, B. & Mohajeri, S. A. Preparation, characterization and antimicrobial study of a hydrogel (soft contact lens) material impregnated with silver nanoparticles. *Contact Lens Anterior Eye* 37, 149–152 (2014).
121. Willcox, M. D. P., Hume, E. B. H., Vijay, A. K. & Petcavich, R. Ability of silver-impregnated contact lenses to control microbial growth and colonisation. *J. Optom.* 3, 143–148 (2010).
122. Riley, D. K., Classen, D. C., Stevens, L. E. & Burke, J. P. A large randomized clinical trial of a silver-impregnated urinary catheter: Lack of efficacy and staphylococcal superinfection. *Am. J. Med.* 98, 349–356 (1995).
123. Li, Y., Leung, P., Yao, L., Song, Q. W. & Newton, E. Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles. *J. Hosp. Infect.* 62, 58–63 (2006).
124. Kalishwaralal, K. et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 77, 257–262 (2010).
125. Adeyemi, O. S. & Sulaiman, F. A. Evaluation of metal nanoparticles for drug delivery systems. *J. Biomed. Res.* 29, 145–149 (2015).
126. Perelshtein, I. et al. Sonochemical coating of silver nanoparticles on textile fabrics (nylon, polyester and cotton) and their antibacterial activity. *Nanotechnology* 19, 1–6 (2008).
127. Zhang, G., Liu, Y., Gao, X. & Chen, Y. Synthesis of silver nanoparticles and antibacterial property of silk fabrics treated by silver nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* 9, 1–8 (2014).
128. Ersoy, M. S. & Onder, E. Electroless silver coating on glass stitched fabrics for electromagnetic shielding applications. *Text. Res. J.* 84, 2103–2114 (2014).
129. Mecha, C. A. & Pillay, V. L. Development and evaluation of woven fabric microfiltration membranes impregnated with silver nanoparticles for potable water treatment. *J. Memb. Sci.* 458, 149–156 (2014).
130. Yuranova, T. et al. Performance and characterization of Ag-cotton and Ag/TiO₂ loaded textiles during the abatement of *E. coli*. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 181, 363–369 (2006).
131. Tran, Q. H., Nguyen, V. Q. & Le, A.-T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 4, 33001 (2013).
132. Karthik, L., Kumar, G., Kirthi, A. V., Rahuman, A. A. & Bhaskara Rao, K. V. *Streptomyces* sp. LK3 mediated synthesis of silver nanoparticles and its biomedical application. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 261–267 (2014).

133. Qu, X., Alvarez, P. J. J. & Li, Q. Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. *Water Res.* 47, 3931–3946 (2013).
134. Oyanedel-Craver, V. a. & Smith, J. a. Sustainable colloidal-silver-impregnated ceramic filter for point-of-use water treatment. *Environ. Sci. Technol.* 42, 927–933 (2008).
135. Ramar, M. et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Solanum trilobatum* fruits extract and its antibacterial, cytotoxic activity against human breast cancer cell line MCF 7. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 140, 223–228 (2015).
136. Barua, S. et al. Silver Nanoparticles as Antibacterial and Anticancer Materials Against Human Breast, Cervical and Oral Cancer Cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 16, 1–9 (2016).
137. He, Y. et al. Effects of green-synthesized silver nanoparticles on lung cancer cells in vitro and grown as xenograft tumors in vivo. *Int. J. Nanomedicine* 11, 1879–1887 (2016).
138. Martins, A. F. et al. Polyelectrolyte complex containing silver nanoparticles with antitumor property on Caco-2 colon cancer cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 79, 748–755 (2015).
139. Braun, G. B. et al. Etchable plasmonic nanoparticle probes to image and quantify cellular internalization. *Nat. Mater.* 13, 1–19 (2014).
140. Zhou, Y. T. et al. Effect of silver nanomaterials on the activity of thiol-containing antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 61, 7855–7862 (2013).
141. Aykin-Burns, N., Ahmad, I. M., Zhu, Y., Oberley, L. W. & Spitz, D. R. Increased levels of superoxide and hydrogen peroxide mediate the differential susceptibility of cancer cells vs. normal cells to glucose deprivation. *Biochem. J.* 418, 319–335 (2010).
142. Swanner, J. et al. Differential cytotoxic and radiosensitizing effects of silver nanoparticles on triple-negative breast cancer and non-triple-negative breast cells. *Int. J. Nanomedicine* 10, 3937–3953 (2015).
143. Prabhu, D., Arulvasu, C., Babu, G., Manikandan, R. & Srinivasan, P. Biologically synthesized green silver nanoparticles from leaf extract of *Vitex negundo* L. induce growth-inhibitory effect on human colon cancer cell line HCT15. *Process Biochem.* 48, 317–324 (2013).
144. Sriram, M. I., Kanth, S. B. M., Kalishwaralal, K. & Gurunathan, S. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. *Int. J. Nanomedicine* 5, 753–762 (2010).
145. Arora, S. et al. Abstract 2811: Silver nanoparticles protect human keratinocytes from deleterious effects of ultraviolet radiation: Implications for skin cancer chemoprevention. *Cancer Res.* 75, 2811–2811 (2015).
146. Palanki, R. et al. Size is an essential parameter in governing the UVB-protective efficacy of silver nanoparticles in human keratinocytes. *BMC Cancer* 15, 636 (2015).
147. Alvarez, P. J. J., Colvin, V., Lead, J. & Stone, V. Research priorities to advance eco-responsible nanotechnology. *ACS Nano* 3, 1616–1619 (2009).
148. Hu, X., Zhou, Q. & Luo, Y. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environ. Pollut.* 158, 2992–2998 (2010).
149. Abd-Elghany, S. M., Sallam, K. I., Abd-Elkhalek, A. & Tamura, T. Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from chicken meat and giblets. *Epidemiol. Infect.* 143, 997–1003 (2015).
150. Chantziaras, I., Boyen, F., Callens, B. & Dewulf, J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 827–834 (2014).
151. Dayao, D. A. E., Gibson, J. S., Blackall, P. J. & Turni, C. Antimicrobial resistance in bacteria associated with porcine respiratory disease in Australia. *Vet. Microbiol.* 171, 232–235 (2014).
152. Kalan, L. & Wright, G. D. Antibiotic adjuvants: multicomponent anti-infective strategies. *Expert Rev. Mol. Med.* 13, e5 (2011).
153. Soltani, M. et al. The inhibitory effect of silver nanoparticles on the bacterial fish pathogens, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas hydrophila*. *Int. J. Vet. Res.* 3, 137–142 (2009).
154. Hwang, I., Hwang, J. H., Choi, H., Kim, K.-J. & Lee, D. G. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *J. Med. Microbiol.* 61, 1719–26 (2012).
155. Botelho, M. G. Fractional inhibitory concentration index of combinations of antibacterial agents against cariogenic organisms. *J. Dent.* 28, 565–570 (2000).
156. Orhan, G., Bayram, A., Zer, Y. & Balci, I. Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 140–143 (2005).
157. Kurek, A., Nadkowska, P., Pliszka, S. & Wolska, K. I. Modulation of antibiotic resistance in bacterial pathogens by oleanolic acid and ursolic acid. *Phytomedicine* 19, 515–519 (2012).
158. Li, P., Li, J., Wu, C., Wu, Q. & Li, J. Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 1912–1917 (2005).

159. Jain, J. et al. articles Silver Nanoparticles in Therapeutics : Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use. *Mol. Pharm.* 6, 1388–1401 (2009).
160. Brown, A. N. et al. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2768–2774 (2012).
161. Deng, H. et al. Mechanistic Study of the Synergistic Antibacterial Activity of Combined Silver Nanoparticles and Common Antibiotics. *Environ. Sci. Technol.* 104, acs.est.6b00998 (2016).
162. Wang, Y.-W. et al. Enhanced bactericidal toxicity of silver nanoparticles by the antibiotic gentamicin. *Environ. Sci. Nano* 788–798 (2016). doi:10.1039/C6EN00031B
163. Padalia, H., Moteriya, P. & Chanda, S. Green synthesis of silver nanoparticles from marigold flower and its synergistic antimicrobial potential. *Arab. J. Chem.* 8, 732–741 (2014).
164. Hamed, S., Emara, M., Shawky, R. M., El-domany, R. A. & Youssef, T. Silver nanoparticles: Antimicrobial activity, cytotoxicity, and synergism with N-acetyl cysteine. *J. Basic Microbiol.* 57, 659–668 (2017).
165. Potara, M. et al. Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*. *Nanotechnology* 22, 135101 (2011).
166. Vertelov, G. K., Krutyakov, Y. a, Efremenkova, O. V, Olenin, a Y. & Lisichkin, G. V. A versatile synthesis of highly bactericidal Myramistin® stabilized silver nanoparticles. *Nanotechnology* 19, 355707 (2008).
167. Ammons, M. C. B., Ward, L. S. & James, G. a. Anti-biofilm efficacy of a lactoferrin/xylitol wound hydrogel used in combination with silver wound dressings. *Int. Wound J.* 8, 268–273 (2011).
168. Ruden, S., Hilpert, K., Berditsch, M., Wadhwani, P. & Ulrich, A. S. Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3538–3540 (2009).
169. Habash, M. B., Park, A. J., Vis, E. C., Harris, R. J. & Khursigara, C. M. Synergy of Silver Nanoparticles and Aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5818–5830 (2014).
170. Kareem, P. A. & Alsammak, E. G. The Effect of Silver and Zinc Oxide Nanoparticles on Multi Drug Resistance *Staphylococcus aureus*. 2, 405–417 (2014).
171. Kora, A. J. & Rastogi, L. Enhancement of antibacterial activity of capped silver nanoparticles in combination with antibiotics, on model gram-negative and gram-positive bacteria. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2013, 871097 (2013).
172. de Vicente, A., Avilés, M., Codina, J. C., Borrego, J. J. & Romero, P. Resistance to antibiotics and heavy metals of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from natural waters. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 625–32 (1990).
173. Pereira, S. et al. Using extracellular polymeric substances (EPS)-producing cyanobacteria for the bioremediation of heavy metals: do cations compete for the EPS functional groups and also accumulate inside the cell? *Microbiology* 157, 451–458 (2011).
174. Teitzel, G. M. & Parsek, M. R. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2313–20 (2003).
175. Bonnefoy, V. & Holmes, D. S. Genomic insights into microbial iron oxidation and iron uptake strategies in extremely acidic environments. *Environ. Microbiol.* 14, 1597–1611 (2012).
176. Ferris, F. G. & Beveridge, T. J. Binding of a paramagnetic metal cation to *Escherichia coli* K-12 outer-membrane vesicles. *FEMS Microbiol. Lett.* 24, 43–46 (1984).
177. Achard, M. E. S. et al. The multi-copper-ion oxidase CueO of *Salmonella enterica* serovar typhimurium is required for systemic virulence. *Infect. Immun.* 78, 2312–2319 (2010).
178. Isabell R. Loftin, §,l et al. A Novel Copper-Binding Fold for the Periplasmic Copper Resistance Protein CusF†,‡. (2005). doi:10.1021/BI050827B
179. Beveridge, T. J. & Murray, R. G. E. Uptake and Retention of Metals by Cell-Walls of *Bacillus-Subtilis*. *J. Bacteriol.* 127, 1502–1518 (1976).
180. Díaz-Vásquez, W. A. et al. Tellurite reduction by *Escherichia coli* NDH-II dehydrogenase results in superoxide production in membranes of toxicant-exposed cells. *BioMetals* 27, 237–246 (2014).
181. Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B. P. & Das, N. Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review. *J. Environ. Manage.* 146, 383–399 (2014).
182. Argüello, J. M., Eren, E. & González-Guerrero, M. The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *BioMetals* 20, 233–248 (2007).
183. Qin, J. et al. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 2075–2080 (2006).
184. Lefevre, C. T. & Bazylnski, D. A. Ecology, Diversity, and Evolution of Magnetotactic Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 497–526 (2013).

185. Wrede, C. et al. Deposition of biogenic iron minerals in a methane oxidizing microbial mat. *Archaea* 2013, 102972 (2013).
186. Miller, C. D. et al. Copper and cadmium: responses in *Pseudomonas putida* KT2440. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 775–783 (2009).
187. Zhang, X. et al. Global transcriptome analysis of hexavalent chromium stress responses in *Staphylococcus aureus* LZ-01. *Ecotoxicology* 23, 1534–1545 (2014).
188. Poirier, I., Hammann, P., Kuhn, L. & Bertrand, M. Strategies developed by the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* BA3SM1 to resist metals: A proteome analysis. *Aquat. Toxicol.* 128–129, 215–232 (2013).
189. Tappin, A. D. et al. Dissolved silver in European estuarine and coastal waters. *Water Res.* 44, 4204–4216 (2010).
190. Kaegi, R. et al. Fate and transformation of silver nanoparticles in urban wastewater systems. *Water Res.* 47, 3866–3877 (2013).
191. Aminov, R. I. Horizontal Gene Exchange in Environmental Microbiota. *Front. Microbiol.* 2, 158 (2011).
192. Heuer, H., Kopmann, C., Binh, C. T. T., Top, E. M. & Smalla, K. Spreading antibiotic resistance through spread manure: characteristics of a novel plasmid type with low %G+C content. *Environ. Microbiol.* 11, 937–949 (2009).
193. Li, X. Z., Nikaido, H. & Williams, K. E. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J. Bacteriol.* 179, 6127–32 (1997).
194. Gupta, A., Matsui, K., Lo, J. F. & Silver, S. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat. Med.* 5, 183–188 (1999).
195. Nies, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 313–339 (2003).
196. Silver, S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 341–353 (2003).
197. Silver, S., Phung, L. T. & Silver, G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 627–634 (2006).
198. Li, X. Z., Nikaido, H. & Williams, K. E. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J. Bacteriol.* 179, 6127–6132 (1997).
199. Jelenko, C. Silver Nitrate Resistant *E. Coli* : Report of Case THE MODERN revival of the use of silver in its nitrate form or a colloidal preparation began with the work of Moyer and his. (1964).
200. McHugh, G. L., Moellering, R. C., Hopkins, C. C. & Swartz, M. N. *Salmonella typhimurium* resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin. *Lancet (London, England)* 1, 235–40 (1975).
201. Hobman, J. L. & Crossman, L. C. Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *J. Med. Microbiol.* 64, 471–497 (2015).
202. Asiani, K. R. et al. SilE is an intrinsically disordered periplasmic molecular sponge involved in bacterial silver resistance. *Mol. Microbiol.* 101, 731–742 (2016).
203. Hendry, A. T. & Stewart, I. O. Silver-resistant Enterobacteriaceae from hospital patients. *Can. J. Microbiol.* 25, 915–921 (1979).
204. Haefeli, C., Franklin, C. & Hardy, K. Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from a silver mine. *J. Bacteriol.* 158, 389–392 (1984).
205. Choudhury, P. & Kumar, R. Multidrug- and metal-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from *Penaeus monodon* of the coastal waters of deltaic Sundarban. *Can. J. Microbiol.* 44, 186–9 (1998).
206. Gunawan, C., Teoh, W. Y., Marquis, C. P. & Amal, R. Induced adaptation of *Bacillus* sp. to antimicrobial nanosilver. *Small* 9, 3554–60 (2013).
207. Khan, S., Mukherjee, A. & Chandrasekaran, N. Silver nanoparticles tolerant bacteria from sewage environment. *J. Environ. Sci.* 23, 346–352 (2011).
208. Graves, J. L. et al. Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. *Front. Genet.* 6, 1–13 (2015).
209. Losasso, C. et al. Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different *Salmonella* serovars. *Front. Microbiol.* 5, 1–9 (2014).
210. Zhang, T., Wang, L., Chen, Q. & Chen, C. Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles. 55, 283–291 (2014).
211. Johnston, H. J. et al. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 328–346 (2010).
212. Kawata, K., Osawa, M. & Okabe, S. In Vitro Toxicity of Silver Nanoparticles at Noncytotoxic Doses to HepG2 Human Hepatoma Cells. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6046–6051 (2009).
213. Park, M. V. D. Z. et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* 32, 9810–7 (2011).

214. Hsin, Y.-H. et al. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol. Lett.* 179, 130–139 (2008).
215. Asharani, P. V., Low, G., Mun, K., Hande, M. P. & Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. 3, 279–290 (2009).
216. Luther, E. M., Koehler, Y., Diendorf, J., Eppler, M. & Dringen, R. Accumulation of silver nanoparticles by cultured primary brain astrocytes. *Nanotechnology* 22, 375101 (2011).
217. Rahman, M. F. et al. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 187, 15–21 (2009).
218. Guo, H. et al. Intravenous administration of silver nanoparticles causes organ toxicity through intracellular ROS-related loss of inter- endothelial junction. *Part. Fibre Toxicol.* 1–13 (2016). doi:10.1186/s12989-016-0133-9
219. Hadrup, N. & Lam, H. R. Oral toxicity of silver ions , silver nanoparticles and colloidal silver – A review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 68, 1–7 (2014).
220. Ema, M., Okuda, H., Gamo, M. & Honda, K. A review of reproductive and developmental toxicity of silver nanoparticles in laboratory animals. 67, 149–164 (2017).
221. Munger, M. A. et al. Assessing orally bioavailable commercial silver nanoparticle product on human cytochrome P450 enzyme activity. *Nanotoxicology* 9, 474–481 (2015).
222. Kuwagata, M., Kumagai, F., Saito, Y. & Higashisaka, K. Permeability of skin to silver nanoparticles after epidermal skin barrier disruption in rats. 4, 109–119 (2017).
223. Park, E.-J. et al. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 30, 162–168 (2010).
224. Kim, Y. S. et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal. Toxicol.* 20, 575–583 (2008).
225. Korani, M., Rezayat, S. M., Gilani, K., Arbabi Bidgoli, S. & Adeli, S. Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig. *Int. J. Nanomedicine* 6, 855–862 (2011).
226. Tang, J. et al. Influence of silver nanoparticles on neurons and blood-brain barrier via subcutaneous injection in rats. *Appl. Surf. Sci.* 255, 502–504 (2008).
227. Tang, J. et al. Distribution, Translocation and Accumulation of Silver Nanoparticles in Rats. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9, 4924–4932 (2009).
228. Munger, M. a et al. In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. *Nanomedicine* 10, 1–9 (2014).
229. Lee, J. H., Mun, J., Park, J. D. & Yu, I. J. A health surveillance case study on workers who manufacture silver nanomaterials. *Nanotoxicology* 6, 667–669 (2012).
230. Zhang, S. et al. Reduced cytotoxicity of silver ions to mammalian cells at high concentration due to the formation of silver chloride. *Toxicol. Vitro.* 27, 739–744 (2013).
231. Vlachou, E. et al. The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: a study of systemic silver absorption. *Burns* 33, 979–85 (2007).
232. Gottschalk, F., Sun, T. & Nowack, B. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modeling and analytical studies. *Environ. Pollut.* 181, 287–300 (2013).
233. Navarro, E. et al. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* 42, 8959–64 (2008).
234. Burchardt, A. D. et al. Effects of Silver Nanoparticles in Diatom *Thalassiosira pseudonana* and Cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11336–11344 (2012).
235. Choi, J. E. et al. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 100, 151–9 (2010).
236. Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F. & Popovic, R. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 80–5 (2012).
237. Jiang, H. S., Qiu, X. N., Li, G. B., Li, W. & Yin, L. Y. Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrrhiza*. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 1398–1405 (2014).
238. Oukarroum, A., Barhoumi, L., Pirastru, L. & Dewez, D. Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 902–7 (2013).
239. Chan, C. Y. S. & Chiu, J. M. Y. Chronic effects of coated silver nanoparticles on marine invertebrate larvae: A proof of concept study. *PLoS One* 10, (2015).
240. Salari Joo, H., Kalbassi, M. R., Yu, I. J., Lee, J. H. & Johari, S. A. Bioaccumulation of silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): influence of concentration and salinity. *Aquat. Toxicol.* 140–141, 398–406 (2013).
241. Rajkumar, K. S., Kanipandian, N. & Thirumurugan, R. Toxicity assessment on haematology, biochemical and histopathological alterations of silver nanoparticles-exposed freshwater fish *Labeo rohita*. *Appl. Nanosci.* 19–29 (2015). doi:10.1007/s13204-015-0417-7

242. Cho, J.-G. et al. Stepwise embryonic toxicity of silver nanoparticles on *Oryzias latipes*. *Biomed Res. Int.* 2013, 494671 (2013).
243. Muth-Köhne, E. et al. The toxicity of silver nanoparticles to zebrafish embryos increases through sewage treatment processes. *Ecotoxicology* 22, 1264–77 (2013).
244. Zhao, C. M. & Wang, W. X. Size-dependent uptake of silver nanoparticles in *daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11345–11351 (2012).
245. Wang, W. Biokinetic Uptake and Efflux of Silver Nanoparticles in *Daphnia magna*. 44, 7699–7704 (2010).
246. Allen, H. J. et al. Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2742–50 (2010).
247. Gaiser, B. K. et al. Effects of silver and cerium dioxide micro- and nano-sized particles on *Daphnia magna*. *J. Environ. Monit.* 13, 1227 (2011).
248. Asghari, S. et al. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. *J. Nanobiotechnology* 10, 14 (2012).
249. Park, S.-Y. & Choi, J.-H. Geno- and Ecotoxicity Evaluation of Silver Nanoparticles in Freshwater Crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Eng. Res.* 15, 23–27 (2010).
250. Poynton, H. C. et al. Toxicogenomic responses of nanotoxicity in *Daphnia magna* exposed to silver nitrate and coated silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6288–96 (2012).
251. Yang, J., Zhang, Q., Lee, J. Y. & Too, H. P. Dissolution-recrystallization mechanism for the conversion of silver nanospheres to triangular nanoplates. *J. Colloid Interface Sci.* 308, 157–161 (2007).
252. El Badawy, A. M. et al. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticle suspensions. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1260–1266 (2010).
253. Stebounova, L. V., Guio, E. & Grassian, V. H. Silver nanoparticles in simulated biological media: A study of aggregation, sedimentation, and dissolution. *J. Nanoparticle Res.* 13, 233–244 (2011).
254. Yue, Y. et al. Toxicity of silver nanoparticles to a fish gill cell line: Role of medium composition. *Nanotoxicology* 5390, 15–16 (2015).
255. Erickson, R. J. et al. Effects of Laboratory Test Conditions on the Toxicity of Silver To Aquatic Organisms. *Environmental Toxicol. Chem.* 17, 572–578 (1998).
256. Römer, I. et al. Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests. *J. Chromatogr. A* 1218, 4226–4233 (2011).
257. Tejamaya, M., Römer, I., Merrifield, R. C. & Lead, J. R. Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7011–7017 (2012).
258. Römer, I. et al. The critical importance of defined media conditions in *Daphnia magna* nanotoxicity studies. *Toxicol. Lett.* 223, 103–108 (2013).
259. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, CLSI document VET01-A3 (formerly M31-A3). (2008).
260. Matter, D. et al. Antimicrobial resistance profile of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus porcitonisillarum*. *Vet. Microbiol.* 122, 146–56 (2007).
261. Fondevila, M., Herrer, R., Casallas, M. C., Abecia, L. & Duchá, J. J. Silver nanoparticles as a potential antimicrobial additive for weaned pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150, 259–269 (2009).
262. Carlson, C. et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B* 112, 13608–19 (2008).
263. Rao, C. N. R., Kulkarni, G. U., Thomas, P. J. & Edwards, P. P. Size-dependent chemistry: properties of nanocrystals. *Chemistry* 8, 28–35 (2002).
264. Kim, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 3, 95–101 (2007).
265. Bossé, J. T. et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect.* 4, 225–235 (2002).
266. Nedbalcova, K., Satran, P., Jaglic, Z., Ondriasova, R. & Kucerova, Z. Monitoring of Antibiotic Resistance in Isolates of *Haemophilus Parasuis* in the Czech Republic Between 2004 and 2005. 2005, 2005 (2005).
267. Kempf, I. et al. What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? *Int. J. Antimicrob. Agents* 42, 379–383 (2013).
268. Naqvi, S. Z. H. et al. Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. *Int. J. Nanomedicine* 8, 3187–95 (2013).
269. Muhsin, T. M. & Hachim, A. K. Mycosynthesis and characterization of silver nanoparticles and their activity against some human pathogenic bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 2081–90 (2014).

270. Sathiyarayanan, G., Kiran, G. S. & Selvin, J. Synthesis of silver nanoparticles by polysaccharide bioflocculant produced from marine *Bacillus subtilis* MSBN17. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 102, 13–20 (2013).
271. Markowska, K., Grudniak, A. M., Krawczyk, K., Wróbel, I. & Wolska, K. I. Modulation of antibiotic resistance and induction of a stress response in *Pseudomonas aeruginosa* by silver nanoparticles. *J. Med. Microbiol.* 63, 849–54 (2014).
272. Singh, R. et al. Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *Int. J. Nanomedicine* 8, 4277–4290 (2013).
273. Krishnaraj, C. et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 76, 50–56 (2010).
274. Lok, C.-N. et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J. Proteome Res.* 5, 916–924 (2006).
275. Sondi, I. & Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* 275, 177–182 (2004).
276. Cabiscol, E., Tamarit, J. & Ros, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* 3, 3–8 (2000).
277. Krajewski, S. et al. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood. *Acta Biomater.* 9, 7460–7468 (2013).
278. Panacek, A. et al. Acute and chronic toxicity effects of silver nanoparticles (NPs) on *Drosophila melanogaster*. *Environ. Sci. Technol.* 45, 4974–4979 (2011).
279. Kolar, M. et al. ESBL and AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in poultry in the Czech Republic. *Vet. Med. (Praha)*. 55, 119–124 (2010).
280. Monteiro, J., Widen, R. H., Pignatari, A. C. C., Kubasek, C. & Silbert, S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 906–909 (2012).
281. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, 2013. <http://www.eucast.org>. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf. (Accessed: 20th March 2014)
282. Sen, I. K. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using glucan from mushroom and study of antibacterial activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 62, 439–449 (2013).
283. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015. Available at: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
284. Asadishad, B., Hidalgo, G. & Tufenkji, N. Pomegranate materials inhibit flagellin gene expression and flagellar-propelled motility of uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073. *FEMS Microbiol. Lett.* 334, 87–94 (2012).
285. Prucek, R. et al. Re-crystallization of silver nanoparticles in a highly concentrated NaCl environment—a new substrate for surface enhanced IR-visible Raman spectroscopy. *CrystEngComm* 13, 2242 (2011).
286. Oecd. Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. OECD Guidel. Test. Chem. - Eff. Biot. Syst. Section 2, 23 (2012). doi:10.1787/9789264070127-en
287. Zhao, C.-M. & Wang, W.-X. Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 885–92 (2011).
288. Völker, C., Boedicker, C., Daubenthaler, J., Oetken, M. & Oehlmann, J. Comparative toxicity assessment of nanosilver on three *Daphnia* species in acute, chronic and multi-generation experiments. *PLoS One* 8, e75026 (2013).
289. Evanoff, D. D. & Chumanov, G. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. *ChemPhysChem* 6, 1221–1231 (2005).
290. Long, R., Zhou, S., Wiley, B. J. & Xiong, Y. Oxidative etching for controlled synthesis of metal nanocrystals: atomic addition and subtraction. *Chem. Soc. Rev.* 43, 6288–310 (2014).
291. Newton, K. M., Puppala, H. L., Kitchens, C. L., Colvin, V. L. & Klaine, S. J. Silver nanoparticle toxicity to *Daphnia magna* is a function of dissolved silver concentration. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2356–64 (2013).
292. Blinova, I. et al. Toxicity of two types of silver nanoparticles to aquatic crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. (2012). doi:10.1007/s11356-012-1290-5
293. Seitz, F. et al. Effects of silver nanoparticle properties, media pH and dissolved organic matter on toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111, 263–70 (2015).
294. Sakamoto, M. et al. Free Silver Ion as the Main Cause of Acute and Chronic Toxicity of Silver Nanoparticles to Cladocerans. (2014).

295. Koukal, B. et al. Effect of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae) exudates on metal toxicity and colloid aggregation. *Water Res.* 41, 63–70 (2007).
296. Dobias, J. & Bernier-Latmani, R. Silver release from silver nanoparticles in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* 47, 4140–4146 (2013).
297. Pokhrel, L. R. & Dubey, B. Potential Impact of Low-Concentration Silver Nanoparticles on Predator – Prey Interactions between Predatory Dragonfly Nymphs and *Daphnia magna* as a Prey. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7755–7762 (2012).
298. Alkilany, A. M. et al. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: Molecular origin of cytotoxicity and surface effects. *Small* 5, 701–708 (2009).
299. El Badawy, A. M. et al. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 45, 283–287 (2011).

Seznam publikací

- **Monika Smékalová**, Virginia Aragon, Aleš Panáček, Robert Pucek, Radek Zbořil a Libor Kvítek. Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. *The Veterinary Journal* 209, 174–179 (2016).
- **Monika Smékalová**, Aleš Panáček, Daniel Jančula, Blahoslav Maršálek, Jan Kolařík, Robert Pucek, Libor Kvítek a Radek Zbořil. Culture medium induced aggregation and re-crystallization of silver nanoparticles reduces their toxicity. Podáno do redakce časopisu Applied Materials Today.
- Aleš Panáček, Libor Kvítek, **Monika Smékalová**, Renata Večeřová, Milan Kolář, Magdalena Röderová, Filip Dyčka, Marek Šebela, Robert Pucek, Ondřej Tomanec a Radek Zbořil. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology* 13, 65–71 (2018).
- Aleš Panáček, **Monika Smékalová**, Renata Večeřová, Kateřina Bogdanová, Magdaléna Röderová, Milan Kolář, Martina Kilianová, Šárka Hradilová, Jens P. Froning, Markéta Havrdová, Robert Pucek, Radek Zbořil a Libor Kvítek. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant *Enterobacteriaceae*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 142, 392–399 (2016).
- Aleš Panáček, **Monika Smékalová**, Martina Kilianová, Robert Pucek, Kateřina Bogdanová, Renata Večeřová, Milan Kolář, Markéta Havrdová, Grażyna Anna Płaza, Joanna Chojniak, Radek Zbořil a Libor Kvítek. Strong and Nonspecific Synergistic Antibacterial Efficiency of Antibiotics Combined with Silver Nanoparticles at Very Low Concentrations Showing No Cytotoxic Effect. *Molecules* 21(1), 26 (2016).
- Adéla Galandáková, Jana Franková, Nikol Ambrožová, Klára Habartová, Veronika Pivodová, Bohumil Zálešák, Klára Šafářová, **Monika Smékalová** a Jitka Ulrichová. Effects of silver nanoparticles on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Human and Experimental Toxicology* 35(9), 946–957 (2016).

Přílohy



Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens



Monika Smekalova^a, Virginia Aragon^b, Ales Panacek^{a,*}, Robert Prucek^a, Radek Zboril^a, Libor Kvitek^a

^a Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, 17 Listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

^b Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 10 October 2015

Keywords:
Silver nanoparticles
Antibacterial activity
Bacterial resistance
Synergy

ABSTRACT

Antibiotic resistant bacteria are a serious health risk in both human and veterinary medicine. Several studies have shown that silver nanoparticles (AgNPs) exert a high level of antibacterial activity against antibiotic resistant strains in humans. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effects of a combined therapy of AgNPs and antibiotics against veterinary bacteria that show resistance to antibiotics. A microdilution checkerboard method was used to determine the minimal inhibitory concentrations of both types of antimicrobials, alone and in combination. The fractional inhibitory concentration index was calculated and used to classify observed collective antibacterial activity as synergistic, additive (only the sum of separate effects of drugs), indifferent (no effect) or antagonistic.

From the 40 performed tests, seven were synergistic, 17 additive and 16 indifferent. None of the tested combinations showed an antagonistic effect. The majority of synergistic effects were observed for combinations of AgNPs given together with gentamicin, but the highest enhancement of antibacterial activity was found with combined therapy together with penicillin G against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *A. pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* originally resistant to amoxicillin, gentamicin and colistin were sensitive to these antibiotics when combined with AgNPs. The study shows that AgNPs have potential as adjuvants for the treatment of animal bacterial diseases.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Extensive use of antimicrobial agents contributes to the development and rapid spread of bacterial resistance, which implies a decrease in antibiotic efficacy in both human and veterinary medicine (Schwarz et al., 2001). Resistance to antimicrobial agents in commensal bacteria (e.g. *Escherichia coli*), zoonotic enteropathogens (e.g. *Salmonella* spp.) and animal pathogens (e.g. *Pasteurella multocida* or *Actinobacillus* spp.) has been reported (Abd-Elghany et al., 2014; Chantziaras et al., 2014; Dayao et al., 2014). One approach to control bacterial infections is combination therapy in which antibiotics are given together with other antimicrobial or non-antimicrobial agents. These adjuvants include other antibiotics, non-antibiotic substances (e.g. cardiovascular drugs), resistance inhibitors, such as β -lactamase inhibitors, and inhibitors of biofilm formation (Kalan and Wright, 2011).

Silver nanoparticles (AgNPs) have bactericidal effects against many species of human bacteria (Kim et al., 2007; Taglietti et al., 2012)

and their veterinary counterparts (Soltani et al., 2009), including highly resistant strains, such as methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Panáček et al., 2006; Lara et al., 2009). AgNPs are efficient as antimicrobial agents at low concentrations (mg/L) and are not cytotoxic to eukaryotic cells, including human erythrocytes (Krajewski et al., 2013). Moreover, because of the non-specific mechanism of AgNP-mediated antibacterial activity, the risk for development of resistance is not as high as for antibiotics.

The mechanism whereby AgNPs interact with bacteria cannot be described in terms of a single and specific mode, as with antibiotics. AgNPs damage the bacterial cell wall, change membrane permeability, and cause a collapse of plasma membrane potential (Sondi and Salopek-Sondi, 2004; Lok et al., 2006). Furthermore, AgNPs interact with DNA, inactivate enzymes, influence metabolic processes, change protein expression and damage the respiratory chain (Lara et al., 2009; Li et al., 2011; Cui et al., 2013). Silver ions are released from the nanoparticle surface and enter the bacterial cell to generate reactive oxygen species (ROS), which destroy biomacromolecules (Choi and Hu, 2008).

AgNPs facilitate the interaction of antibiotics with cells in numerous ways. For example, they may help the penetration of antibiotics into the bacterial cell by changing membrane permeability;

* Corresponding author. Tel.: +420 585 634427.
E-mail address: ales.panacek@upol.cz (A. Panacek).

alternatively, both AgNP and antibiotic may cooperate in the destruction of the cell wall. In the case of β -lactam antibiotics, AgNPs may inhibit hydrolytic β -lactamases produced by bacteria. Damage and weakness by simultaneous action of antibiotic and AgNP will lead to cell death. Hwang et al. (2012) suggested that this synergism is associated with generation of hydroxyl radicals, the alteration of protective cellular functions and an anti-biofilm potential. Therefore, the combination of antibiotics with AgNPs seems to be a more effective method for enhancing antibiotic efficacy in comparison with other adjuvants currently used in clinical practice. The combination implies reduced antibiotic dose requirements, reduced development of bacterial resistance and increased efficiency of co-administered antibiotics.

Many antibiotics, with differing mechanisms of action, are more effective against human bacteria when combined with AgNPs (Li et al., 2005; Jain et al., 2009; Brown et al., 2012; Ghosh et al., 2012; Hwang et al., 2012). Unfortunately, several of these studies evaluated combined antimicrobial effects using the disc diffusion method employing standard discs with predetermined concentration of antibiotics. In most cases, a zone of inhibition was apparent indicating that the antibiotic was itself effective (Shahverdi et al., 2007; Birla et al., 2009; Fayaz et al., 2010). There would appear to be no reason to combine drugs if a single drug at a specific concentration is effective.

In the present study, we evaluated the synergistic effects of antibiotics administered at doses lower than their minimum inhibitory concentrations (MICs) with AgNPs of two different sizes to test whether it was possible to enhance the antibacterial activity of antibiotics that targeted veterinary-relevant bacteria, including resistant species. Potential synergistic antibacterial effects were quantified by the fractional inhibitory concentration (FIC) index, which was determined using MICs obtained by the microdilution checkerboard method (Lorian, 2005).

Materials and methods

Preparation of silver nanoparticles

AgNPs with diameters of 28 nm (AgNP-28 nm) and 8 nm (AgNP-8 nm) were synthesised through the reduction of complex cation $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ by D-maltose (Sivera et al., 2014) and sodium borohydride, respectively. Detailed description of synthetic procedures and characterisation techniques is included in the Appendix: Supplementary material.

Evaluation of synergistic effect of antibiotics combined with AgNPs

Bacterial strains *Salmonella enterica* LT2, *Staphylococcus aureus* GP0004, *Escherichia coli* eae+ GN2514, *Actinobacillus pleuropneumoniae* 17/06L, *Pasteurella multocida* P-813 and *Streptococcus uberis* GP1037 were obtained from the Centre de Recerca en Sanitat Animal, Barcelona, Spain.

The antibiotic sensitivity of bacterial strains was assessed according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) document VET01-A3 (CLSI, 2008). MICs of antibiotics, AgNPs and their combinations were determined using the microdilution checkerboard method. *S. enterica*, *S. aureus*, *S. uberis* and *E. coli* were tested in MH (pH 7.3), while *A. pleuropneumoniae* and *P. multocida* were tested in BHI (pH 7.4). BHI was supplemented with 1% IsoVitalEx (BBL) for cultivation of *A. pleuropneumoniae*.

The microtitre plates were incubated at 37 °C for 24 h (see Appendix: Supplementary material).

The FIC index was calculated to evaluate the combined antimicrobial effect of antibiotics and AgNPs (Lorian, 2005):

$$\text{FIC} = \frac{\text{MIC of drug A in the combination}}{\text{MIC of drug A alone}} + \frac{\text{MIC of drug B in the combination}}{\text{MIC of drug B alone}}$$

There are differences in the interpretation of the FIC index (Botelho, 2000; Orhan et al., 2005; Kurek et al., 2012). In the present study, the combined antibacterial effects of antibiotics and AgNPs were considered to be synergistic, additive, indifferent or antagonistic when the FIC indices were ≤ 0.5 , >0.5 to ≤ 1 , >1 to ≤ 2 and >2 , respectively (Kurek et al., 2012).

Results

Silver nanoparticles

The results of antibacterial activity of AgNPs are summarised in Table 1. AgNPs exhibited antimicrobial activity against Gram negative organisms. The MICs of AgNPs were 6.3–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ depending on the tested strains and size of AgNPs. The growth of Gram positive bacteria was inhibited less by AgNPs than Gram negative bacteria. However, the final MICs of AgNP-28 nm could not be determined because the MIC was greater than the highest silver concentration used in the dilution method ($>50 \mu\text{g}/\text{mL}$).

The antibacterial activity of smaller nanoparticles was stronger than the antibacterial activity of larger AgNPs. Both AgNP-28 nm and AgNP-8 nm showed the most antibacterial effects against the Gram negative bacteria *P. multocida* and *E. coli* (AgNP-8 nm), whereas the Gram positive bacterium *S. uberis* was the least sensitive of the tested strains.

Amoxycillin

The MIC of amoxycillin against the tested bacteria was 0.25 to $>32 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Table 2). *E. coli* and *A. pleuropneumoniae* had MICs $>32 \mu\text{g}/\text{mL}$ (breakpoint MIC $\geq 32 \mu\text{g}/\text{mL}$) and were resistant to amoxycillin. When 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amoxycillin was combined with 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AgNP-28 nm or AgNP-8 nm, antibiotic resistant *A. pleuropneumoniae* becomes sensitive. The antibacterial activity of amoxycillin combined with AgNP-28 nm was synergistic (FIC index 0.4). An FIC index of 0.6 was obtained when AgNP-8 nm was combined with

Table 1
Minimum inhibitory concentrations ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of silver nanoparticles with diameters of 28 nm (AgNP-28 nm) or 8 nm (AgNP-8 nm).

Bacteria	AgNP-28 nm	AgNP-8 nm
<i>Salmonella enterica</i>	25	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	>50	25
<i>Escherichia coli</i>	25	6.3
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	50	25
<i>Streptococcus uberis</i>	>50	100
<i>Pasteurella multocida</i>	6.3	6.3

Table 2
Minimum inhibitory concentrations (MICs; $\mu\text{g}/\text{mL}$) of amoxycillin alone or with silver nanoparticles with diameters of 28 nm (AgNP-28 nm) or 8 nm (AgNP-8 nm).

Bacteria	Amoxycillin	Drug combination MIC		FIC	Effect	Drug combination MIC		FIC	Effect
		AgNP-28 nm	Amoxycillin			AgNP-8 nm	Amoxycillin		
<i>Salmonella enterica</i>	1	25	1	2.0	I	12.5	1	2.0	I
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	25	1	0.8	A	12.5	0.5	0.8	A
<i>Escherichia coli</i> (R)	>32	25	>32	2.0	I	6.3	>32	2.0	I
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (R)	>32	12.5	8	0.4	S	12.5	8	0.6	A
<i>Pasteurella multocida</i>	0.25	6.3	0.25	2.0	I	6.3	0.25	2.0	I
<i>Streptococcus uberis</i>	0.25	>50	0.25	2.0	I	50	0.125	1.0	A

FIC, fractional inhibitory concentration index; S, synergy; A, additivity; I, indifference; R, resistant strain.

Table 3
Minimum inhibitory concentrations (MICs; µg/mL) of penicillin G alone or with silver nanoparticles with diameters of 28 nm (AgNP-28 nm) or 8 nm (AgNP-8 nm).

Bacteria	Penicillin G	Drug combination MIC		FIC	Effect	Drug combination MIC		FIC	Effect
		AgNP-28 nm	Penicillin G			AgNP-8 nm	Penicillin G		
<i>Salmonella enterica</i>	2	25	1	1.5	I	12.5	1	1.5	I
<i>Staphylococcus aureus</i> (R)	1	12.5	0.5	0.6	A	12.5	0.125	0.6	A
<i>Escherichia coli</i> (R)	>32	25	>32	2.0	I	6.3	>32	2.0	I
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (R)	>32	25	8	0.6	A	6.3	2	0.3	S
<i>Pasteurella multocida</i>	0.03	6.3	0.03	2.0	I	6.3	0.03	2.0	I

FIC, fractional inhibitory concentration index; S, synergy; A, additivity; I, indifference; R, resistant strain.

Table 4
Minimum inhibitory concentrations (MICs; µg/mL) of gentamicin alone or with silver nanoparticles with diameters of 28 nm (AgNP-28 nm) or 8 nm (AgNP-8 nm).

Bacteria	Gentamicin	Drug combination MIC		FIC	Effect	Drug combination MIC		FIC	Effect
		AgNP-28 nm	Gentamicin			AgNP-8 nm	Gentamicin		
<i>Salmonella enterica</i>	1	12.5	0.25	0.8	A	12.5	0.25	1.3	I
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	25	0.25	0.4	S	6.3	0.5	0.5	S
<i>Escherichia coli</i>	>32	6.3	8	0.4	S	3.1	16	0.8	A
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (R)	8	25	0.25	0.5	S	25	8	2.0	I
<i>Pasteurella multocida</i> (R)	8	3.1	2	0.8	A	3.1	2	0.8	A

FIC, fractional inhibitory concentration index; S, synergy; A, additivity; I, indifference; R, resistant strain.

Table 5
Minimum inhibitory concentrations (MICs; µg/mL) of colistin alone or with silver nanoparticles with diameters of 28 nm (AgNP-28 nm) or 8 nm (AgNP-8 nm).

Bacteria	Colistin	Drug combination MIC		FIC	Effect	Drug combination MIC		FIC	Effect
		AgNP-28 nm	Colistin			AgNP-8 nm	Colistin		
<i>Salmonella enterica</i> (R)	4	12.5	2	1.0	A	6.3	2	1.0	A
<i>Escherichia coli</i> (R)	8	12.5	2	0.8	A	1.6	2	0.5	S
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (R)	8	25	2	0.8	A	25	8	2.0	I
<i>Pasteurella multocida</i> (R)	8	3.1	1	0.6	A	3.1	1	0.6	A

FIC, fractional inhibitory concentration index; S, synergy; A, additivity; I, indifference; R, resistant strain.

amoxicillin. The additive effects of amoxicillin in combination with both sizes of AgNPs were observed against Gram positive *S. aureus*, with an FIC index of 0.8. An additive effect with an FIC index of 1.0 was also demonstrated for amoxicillin combined with AgNP-8 nm against *S. uberis*.

Penicillin G

Penicillin G exhibited a similar pattern of results to amoxicillin (Table 3). The MIC values for penicillin G were 0.03 to >32 µg/mL. *S. aureus* (MIC 1 µg/mL, breakpoint MIC ≥0.25 µg/mL), *E. coli* (MIC >32 µg/mL, breakpoint MIC ≥4 µg/mL) and *A. pleuropneumoniae* (MIC >32 µg/mL, breakpoint MIC ≥4 µg/mL) showed resistance to penicillin G. The antibacterial effects of penicillin G in combination with AgNP-8 nm or AgNP-28 nm were synergistic and additive, respectively, against *A. pleuropneumoniae*. This synergistic effect was the strongest of all combinations tested, with an FIC index of 0.3 for the combination of 2 µg/mL penicillin G plus 6.3 µg/mL AgNP-8 nm. Additive effects were observed for *S. aureus* with penicillin G plus AgNPs of either size.

Gentamicin

The most effective antibiotic in combination with AgNPs was gentamicin (Table 4). When gentamicin was combined with AgNP-8 nm, enhanced antibacterial effects were additive against *S. enterica* and *P. multocida*, and synergistic against *S. aureus*, *E. coli* and *A. pleuropneumoniae*. With AgNP-8 nm, the effects were additive against *E. coli* and *P. multocida*, and synergistic against *S. aureus*. Combining 3.1 µg/mL of either AgNP-28 nm or AgNP-8 nm with gentamicin

enhanced sensitivity of resistant *P. multocida* (MIC 8 µg/mL, breakpoint MIC ≥8 µg/mL), sufficient to make these bacteria gentamicin-sensitive. Resistant *A. pleuropneumoniae* (MIC 8 µg/mL, breakpoint MIC ≥8 µg/mL) became sensitive to gentamicin when this antibiotic was combined with AgNP-28 nm.

Colistin

The MICs of colistin reached 4 or 8 µg/mL (Table 5), indicating that all bacteria tested were resistant to this antibiotic (breakpoint MIC ≥2 µg/mL). When combined with AgNP-28 nm, the effect was additive in all cases. Additive effects were also observed for the combination of AgNP-8 nm and colistin against *S. enterica* and *P. multocida*. *P. multocida* also became sensitive to colistin when it was combined with 6.3 µg/mL AgNP-28 nm or 3.1 µg/mL AgNP-8 nm. The combination of colistin with 1.6 µg/mL AgNP-8 nm produced a synergistic effect against *E. coli*.

Discussion

AgNPs are known for their exceptional antibacterial activity against human bacteria (Panáček et al., 2006) and demonstrate synergistic action when given in combination with various adjuvants (Potara et al., 2011). Further investigation into their activity is required to combat fast-spreading antibiotic resistances in bacteria causing important diseases in livestock, such as mastitis (*S. uberis*) or respiratory diseases (*A. pleuropneumoniae*) (Matter et al., 2007). In the present study, AgNPs in combination with four different antibiotics were investigated for efficacy in several bacteria of veterinary

origin to determine whether the antibacterial activity of a given antibiotic is enhanced.

The antibacterial activity of AgNPs strongly depends on their size (Martínez-Castañón et al., 2008). In the present study, AgNPs of two different sizes were synthesised to determine whether appropriate enhancement of antibacterial activity of antibiotics combined with AgNPs depends on nanoparticle size. The average sizes of AgNPs preliminary determined by DLS (28 and 8 nm) were larger than those calculated from TEM micrographs (20.6 and 4.7 nm; Appendix: Supplementary Figs. S1A and S2A); the DLS method overestimates larger size fractions, since the intensity of scattered light depends on the sixth power of the particle size. Using UV/Vis spectrophotometry, AgNP-28 nm and AgNP-8 nm showed plasmon bands at 409 nm (Appendix: Supplementary Fig. S1B) and 392 nm (Appendix: Supplementary Fig. S2B), respectively, which are characteristic for nanoscale silver (Kvítek et al., 2005). Smaller nanoparticles present absorption maxima at shorter wavelengths, whereas red shifts in maxima occur when the particle size increases (Panáček et al., 2014).

When non-stabilised AgNP-28 nm particles were mixed with broth prior to bacterial cultivation, slight aggregation of AgNPs occurred, which was evident in the emergence of secondary absorption peaks at longer wavelengths. Secondary absorption peaks located at the wavelengths of 550–650 nm occur when AgNPs undergo aggregation (Kvítek et al., 2008). To prevent this particle aggregation, gelatine was used as a stabilising agent for AgNP-28 nm. Because BHI broth consists of higher concentrations of electrolytes and proteins than MH broth, it was necessary to use a higher gelatine concentration to sufficiently stabilise AgNP-28 nm. In contrast, AgNP-8 nm particles are stabilised by PAA directly in the preparation process and were sufficiently stable in the cultivating media.

The smaller nanoparticles showed greater activity, corresponding to previous observations that antibacterial activity is size-dependent (Martínez-Castañón et al., 2008). Small nanoparticles can pass through pores in the cellular membrane, release greater numbers of silver ions and generate more ROS (Carlson et al., 2008) and the larger surface area to volume ratio makes smaller AgNPs more reactive (Rao et al., 2002). It was also observed that the growth of Gram positive bacteria was less inhibited by AgNPs than Gram negative bacteria, in agreement with previous reports (Kim et al., 2007). These results perhaps can be attributed to the thinner peptidoglycan layer of Gram negative bacteria, in comparison with the rigid peptidoglycan cell wall of Gram positive bacteria.

Amoxicillin can be used as an example of the potential for AgNPs. Amoxicillin is a β -lactam antibiotic, which acts by inhibiting the synthesis of bacterial cell walls (Tipper, 1985) and is used for the treatment of a wide range of bacterial infections in many animal species (Wilson et al., 1999). As an example, amoxicillin has been used against *A. pleuropneumoniae*, which causes important respiratory diseases that result in economic losses in pigs (Bossé et al., 2002). Unfortunately, bacterial strains resistant to amoxicillin have emerged. In the present study we show that the combination of amoxicillin with the two types of AgNPs enhanced its activity against this *A. pleuropneumoniae* such that it became sensitive to amoxicillin. The effects of amoxicillin combined with AgNP-28 nm and AgNP-8 nm were synergistic and additive, respectively, against *A. pleuropneumoniae*. Additive effects were also observed against *S. aureus*, similar to the effects noted by Shahverdi et al. (2007).

Li et al. (2005) proposed possible mechanisms for the synergistic action of amoxicillin and AgNPs. Antibiotics most likely bind to AgNPs, forming a structure in which amoxicillin molecules surround the AgNP core. This favours the concentration of antimicrobial groups at particular points on the cell surface, increasing the severity of damage to the bacterium. In addition, AgNPs facilitate recruitment of amoxicillin to the bacterial cell surface (Fayaz et al.,

2010). Brown et al. (2012) showed that the biocidal activity of ampicillin increased when the drug was combined with AgNPs.

Similar results to those observed in the combination assay for amoxicillin were observed with penicillin G, which also belongs to β -lactam group. The strongest synergistic effect in this study was observed for penicillin G combined with AgNP-8 nm directed against *A. pleuropneumoniae*. The additive activity of penicillin G in combination with AgNP-28 nm and AgNP-8 nm against *S. aureus* was in agreement with findings by Shahverdi et al. (2007).

The most enhanced antibacterial activity through combination with AgNPs was achieved with gentamicin. As with other aminoglycosides, gentamicin acts by irreversibly binding to the 30S subunit of the bacterial ribosome so interfering with protein synthesis. In total, four additive and four synergistic effects were observed by combining this antibiotic with AgNPs. Birla et al. (2009) demonstrated an increased activity of gentamicin in the presence of AgNPs against *E. coli* and *S. aureus*. In contrast, the efficiency of a combined AgNP-gentamicin treatment against these bacteria was not demonstrated in other studies (Shahverdi et al., 2007; Ghosh et al., 2012). An important observation from this current study is the sensitivity of *A. pleuropneumoniae* and *P. multocida* to gentamicin in the presence of AgNPs, whereas these strains were resistant to gentamicin alone. *P. multocida* is a Gram negative bacterium that infects wild and domesticated animals and causes important diseases such as fowl cholera (Harper et al., 2006).

The same phenomenon of antibiotic sensitivity of *P. multocida* was observed for combinations of AgNPs with colistin, a mixture of cyclic polypeptides effective against most Gram negative bacteria, whose antibacterial activity is directed against the bacterial cell membrane (Falagas and Kasiakou, 2005).

Most studies dealing with the synergistic effect of antibiotics combined with AgNPs were performed using the disc diffusion method, but this method has no parameter to classify results as synergistic (Shahverdi et al., 2007; Birla et al., 2009; Fayaz et al., 2010; Ghosh et al., 2012). There are also questions as to the extent to which AgNPs are able to diffuse through solid agar and, for the purposes of synergy testing, drugs at concentrations lower than the MICs should be used. Unfortunately, previous studies used each drug in such an amount that evidently inhibits bacterial growth (Shahverdi et al., 2007; Birla et al., 2009; Fayaz et al., 2010).

AgNP-containing materials have been applied for use in human medicine for wound dressing, impregnation of catheters, as implants and in surgical mesh (Nirmala et al., 2010; Antonelli et al., 2012; Wu et al., 2014; Nisticò et al., 2015). Most silver-based products for animals are designed for surface disinfection, but some preparations (e.g. TraumaPet Ag, Auxivet) are used as drops, ointments, sprays or gels to suppress bacterial infections. AgNPs are also used as prebiotics in animal feeding (Fondevila et al., 2009). Effects on organisms depend on specific AgNP characteristics, such as size, morphology or surface modification, and different AgNPs show different level of toxicity. Although potential adverse health implications associated with AgNPs have been reported (Korani et al., 2011; Genter et al., 2012; Patlolla et al., 2015), several cytotoxic studies demonstrated that AgNPs have a wide therapeutic window (Martínez-Gutiérrez et al., 2012; Mohanty et al., 2012; Boonkaew et al., 2014; Ivask et al., 2014). Moreover, the combination of AgNPs with antibiotics lowers the concentrations of both antibiotics and silver required to kill bacteria.

Ivask et al. (2014) demonstrated no cytotoxicity to mammalian cells at 26.7 mg/L, while the average EC₅₀ (half-maximum effective concentration) for *E. coli* was 1.56 mg/L. AgNPs at 2 μ M killed >98% of bacteria, whereas this concentration was harmless for macrophages (Mohanty et al., 2012). AgNP-containing hydrogels designed for infected burn care also showed antimicrobial activity without cytotoxicity (Boonkaew et al., 2014). Martínez-Gutiérrez et al. (2012) tested the antibacterial activity of AgNPs against a range of Gram

positive and Gram negative bacteria, along with toxicity to THP-1 monocytes; AgNPs had MICs of 0.4–1.7 µg/mL, while a significant increase in cytotoxicity was observed >5 µg/mL.

In mice, the lowest observed adverse effect was at 0.5 mg/kg bodyweight/day following 28 days of repeated oral administration of AgNPs (Park et al., 2010). Conversely, nanoparticles caused only slight liver damage when rats were exposed to >300 mg/kg AgNPs (Kim et al., 2008).

Conclusions

Antibiotics in combination with AgNPs showed synergistic, additive or indifferent effects independent of nanoparticle size, with no antagonism observed. Although most of the effects were additive or indifferent, the combination of AgNPs with antibiotics reduced the MIC of a given antibiotic in most cases. In the case of *P. multocida* and *A. pleuropneumoniae*, AgNPs induced antibiotic sensitivity of the selected strains to amoxicillin, gentamicin and colistin. AgNPs most frequently exhibited the effect by increasing the antibacterial activity of gentamicin, although the strongest synergistic effect was observed for penicillin G combined with AgNP-8 nm against *A. pleuropneumoniae*. The combination of antimicrobial agents with AgNPs could be a promising way to decrease the amount of antibiotics currently used in animal husbandry.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper have a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support by the projects LO1305 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, by the Operational Programme Education for Competitiveness – European Social Fund (project number CZ.1.07/2.3.00/20.0056 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic), by project CZ.1.07/2.4.00/31.0130 from the European Social Fund, by Czech Science Foundation (project No.15-22248S) and by Internal Grants of Palacký University Olomouc (PrF.2015.022). The authors are also grateful to Nuria Galofré from Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA) for technical support and Ignacio Badiola from CReSA for donating *E. coli*, *S. uberis* and *P. multocida* strains.

Appendix: Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.tvjl.2015.10.032.

References

- Abd-Elghany, S.M., Sallam, K.I., Abd-Elkhalik, A., Tamara, T., 2014. Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from chicken meat and giblets. *Epidemiology and Infection* 8, 1–7.
- Antonelli, M., De Pascale, G., Ranieri, V.M., Pelaia, P., Tufano, R., Piazza, O., Zangrillo, A., Ferrario, A., De Gaetano, A., Guaglianone, E., et al., 2012. Comparison of triple-lumen central venous catheters impregnated with silver nanoparticles (AgTive®) vs conventional catheters in intensive care unit patients. *Journal of Hospital Infection* 82, 101–107.
- Birla, S.S., Tiwari, V., V. Gade, A.K., Ingle, A.P., Yadav, A.P., Rai, M.K., 2009. Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology* 48, 173–179.
- Boonkaew, B., Suwanpreuksa, P., Cuttle, L., Barber, P.M., Supaphol, P., 2014. Hydrogels containing silver nanoparticles for burn wounds show antimicrobial activity without cytotoxicity. *Journal of Applied Polymer Science* 131, 40215.
- Bossé, J.T., Janson, H., Sheehan, B.J., Beddek, A.J., Rycroft, A.N., Simon Kroll, J., Langford, P.R., 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection* 4, 225–235.
- Botelho, M.G., 2000. Fractional inhibitory concentration index of combinations of antibacterial agents against cariogenic organisms. *Journal of Dentistry* 28, 565–570.
- Brown, A.N., Smith, K., Samuels, T.A., Lu, J., Obare, S.O., Scott, M.E., 2012. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 2768–2774.
- Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., Hess, K.L., Jones, R.L., Schlager, J.J., 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species. *Journal of Physical Chemistry B* 112, 13608–13619.
- Chantziaras, I., Boyen, F., Callens, B., Dewulf, J., 2014. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: A report on seven countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69, 827–834.
- Choi, O., Hu, Z., 2008. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental Science and Technology* 42, 4583–4588.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, Third Ed. CLSI, Wayne, PA, USA. <http://clsi.org> (accessed 26 March 2015). CLSI document VET01-A3 (formerly M31-A3).
- Cui, L., Chen, P., Chen, S., Yuan, Z., Yu, C., Ren, B., Zhang, K., 2013. In situ study of the antibacterial activity and mechanism of action of silver nanoparticles by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry* 85, 5436–5443.
- Dayao, D.A.E., Gibson, J.S., Blackall, P.J., Turni, C., 2014. Antimicrobial resistance in bacteria associated with porcine respiratory disease in Australia. *Veterinary Microbiology* 171, 232–235.
- Falagas, M.E., Kasiakou, S.K., 2005. Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases* 40, 1333–1341.
- Fayaz, A.M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P.T., Venkatesan, R., 2010. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: A study against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Nanomedicine* 6, 103–109.
- Fondevila, M., Herrero, R., Casallas, M.C., Abecia, L., Duchá, J.J., 2009. Silver nanoparticles as a potential antimicrobial additive for weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology* 150, 259–269.
- Genet, M.B., Newman, N.C., Shertzer, H.G., Ali, S.F., Bolon, B., 2012. Distribution and systemic effects of intranasally administered 25 nm silver nanoparticles in adult mice. *Toxicologic Pathology* 40, 1004–1013.
- Ghosh, S., Patil, S., Ahire, M., Kitture, R., Kale, S., Pardesi, K., Cameotra, S.S., Bellare, J., Dhavale, D.D., Jagunde, A., et al., 2012. Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *International Journal of Nanomedicine* 7, 483–496.
- Harper, M., Boyce, J.D., Adler, B., 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiology Letters* 265, 1–10.
- Hwang, I., Hwang, J.H., Choi, H., Kim, K.-J., Lee, D.G., 2012. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *Journal of Medical Microbiology* 61, 1719–1726.
- Ivask, A., Kurvet, I., Kasemets, K., Blinova, I., Aruoja, V., Suppi, S., Vija, H., Kakinen, A., Titma, T., Heinlaan, A., et al., 2014. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PLoS ONE* 9, e102108.
- Jain, J., Arora, S., Rajwade, J.M., Omray, P., Khandelwal, S., Paknikar, K.M., 2009. Silver nanoparticles in therapeutics: Development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Molecular Pharmaceutics* 6, 1388–1401.
- Kalan, L., Wright, G.D., 2011. Antibiotic adjuvants: Multicomponent anti-infective strategies. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 13, e5.
- Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.-H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.-Y., et al., 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 3, 95–101.
- Kim, Y.S., Kim, J.S., Cho, H.S., Rha, D.S., Kim, J.M., Park, J.D., Choi, B.S., Lim, R., Chang, H.K., Chung, Y.H., et al., 2008. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalation Toxicology* 20, 575–583.
- Korani, M., Rezaayat, S.M., Gilani, K., Arbabi Bidgoli, S., Adeli, S., 2011. Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig. *International Journal of Nanomedicine* 6, 855–862.
- Krajewski, S., Pucek, R., Panáček, A., Avci-Adali, M., Nolte, A., Straub, A., Zbořil, R., Wendel, H.P., Kvítek, L., 2013. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood. *Acta Biomaterialia* 9, 7460–7468.
- Kurek, A., Nadkowska, P., Pliszka, S., Wolska, K.L., 2012. Modulation of antibiotic resistance in bacterial pathogens by oleonic acid and ursolic acid. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 19, 515–519.
- Kvítek, L., Pucek, R., Panáček, A., Novotný, R., Hrbáč, J., 2005. The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis. *Journal of Materials Chemistry* 15, 1099–1105.
- Kvítek, L., Soukupová, J., Večeřová, R., Pucek, R., Holecová, M., Zbořil, R., 2008. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *Journal of Physical Chemistry C* 112, 5825–5834.

- Lara, H.H., Ayala-Núñez, N.V., Ixtepan Turrent, L.D.C., Rodríguez Padilla, C., 2009. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, 615–621.
- Li, P., Li, J., Wu, C., Wu, Q., Li, J., 2005. Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 1912–1917.
- Li, W.-R., Xie, X.-B., Shi, Q.-S., Duan, S.-S., Ouyang, Y.-S., Chen, Y.-B., 2011. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 24, 135–141.
- Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., Tam, P.K.-H., Chiu, J.-F., Che, C.-M., 2006. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research* 5, 916–924.
- Lorian, V., 2005. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Fifth Ed. Lippincott Williams & Wilkins, PA, USA, pp. 367–373.
- Martínez-Castañón, G.A., Niño-Martínez, N., Martínez-Gutiérrez, F., Martínez-Mendoza, J.R., Ruiz, F., 2008. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research* 10, 1343–1348.
- Martínez-Gutiérrez, F., Thi, E.P., Silverman, J.M., de Oliveira, C.C., Svensson, S.L., Vanden Hoek, A., Sánchez, E.M., Reiner, N.E., Gaynor, E.C., Prydzial, E.L.G., et al., 2012. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 8, 328–336.
- Matter, D., Rossano, A., Limat, S., Vorlet-Fawer, L., Brodard, I., Perreten, V., 2007. *Antimicrobial resistance profile of Actinobacillus pleuropneumoniae and Actinobacillus porciconsillarum*. *Veterinary Microbiology* 122, 146–156.
- Mohanty, S., Mishra, S., Jena, P., Jacob, B., Sarkar, B., Sonawane, A., 2012. An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. *Nanomedicine* 8, 916–924.
- Nirmala, R., Sheikh, F.A., Kanjwal, M.A., Lee, J.H., Park, S.-J., Navamathavan, R., Kim, H.Y., 2010. Synthesis and characterization of bovine femur bone hydroxyapatite containing silver nanoparticles for the biomedical applications. *Journal of Nanoparticle Research* 13, 1917–1927.
- Nisticò, R., Rosellini, A., Rivolo, P., Faga, M.G., Lamberti, R., Martorana, S., Castellino, M., Virga, A., Mandracci, P., Malandrino, M., et al., 2015. Surface functionalisation of polypropylene hernia-repair meshes by RF-activated plasma polymerisation of acrylic acid and silver nanoparticles. *Applied Surface Science* 328, 287–295.
- Orhan, G., Bayram, A., Zer, Y., Balci, I., 2005. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 140–143.
- Panáček, A., Kvítek, L., Pucek, R., Kolář, M., Večeřová, R., Pizúrova, N., Sharma, V.K., Nevečná, T., Zbořil, R., 2006. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B* 110, 16248–16253.
- Panáček, A., Pucek, R., Hrbáč, J., Nevečná, T., Štefková, J., Zbořil, R., Kvítek, L., 2014. Polyacrylate-assisted size control of silver nanoparticles and their catalytic activity. *Chemistry of Materials* 26, 1332–1339.
- Park, E.-J., Bae, E., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., Lee, S.H., Yoon, J., Lee, B.C., Park, K., 2010. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 30, 162–168.
- Patlolla, A.K., Hackett, D., Tchounwou, P.B., 2015. Silver nanoparticle-induced oxidative stress-dependent toxicity in Sprague-Dawley rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 399, 257–268.
- Potara, M., Jakab, E., Damert, A., Popescu, O., Canpean, V., Astilean, S., 2011. Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*. *Nanotechnology* 22, 135101.
- Rao, C.N.R., Kulkarni, G.U., Thomas, P.J., Edwards, P.P., 2002. Size-dependent chemistry: Properties of nanocrystals. *Chemistry* 8, 28–35.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Walsh, T.R., 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17, 431–437.
- Shahverdi, A.R., Fakhimi, A., Shahverdi, H.R., Minaian, S., 2007. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine* 3, 168–171.
- Sivera, M., Kvítek, L., Soukupová, J., Panáček, A., Pucek, R., Večeřová, R., Zbořil, R., 2014. Silver nanoparticles modified by gelatin with extraordinary pH stability and long-term antibacterial activity. *PLoS ONE* 9, e103675.
- Soltani, M., Ghodrathema, M., Ahari, A., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Atee, M., Dastmalchi, F., Rahmánya, J., 2009. The inhibitory effect of silver nanoparticles on the bacterial fish pathogens, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas hydrophila*. *International Journal of Veterinary Research* 3, 137–142.
- Sondi, I., Salopek-Sondi, B., 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* 275, 177–182.
- Taglietti, A., Diaz Fernandez, Y.A., Amato, E., Cucca, L., Dacarro, G., Grisoli, P., Necchi, V., Pallavicini, P., Pasotti, L., Patrini, M., 2012. Antibacterial activity of glutathione-coated silver nanoparticles against Gram positive and Gram negative bacteria. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 28, 8140–8148.
- Tipper, D.J., 1985. Mode of action of β -lactam antibiotics. *Pharmacology and Therapeutics* 27, 1–35.
- Wilson, D.J., Gonzalez, R.N., Case, K.L., Garrison, L.L., Groöhn, Y.T., 1999. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* 82, 1664–1670.
- Wu, J., Zheng, Y., Wen, X., Lin, Q., Chen, X., Wu, Z., 2014. Silver nanoparticle/bacterial cellulose gel membranes for antibacterial wound dressing: Investigation in vitro and in vivo. *Biomedical Materials* 9, 035005.

Culture medium mediated aggregation and re-crystallization of silver nanoparticles reduce their toxicity

Monika Smékalová^a, Aleš Panáček^{a,*}, Daniel Jančula^b, Blahoslav Maršálek^b, Jan Kolařík^a, Robert Pucek^a, Libor Kvítek^a and Radek Zbořil^a

^aRegional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

^bCentre for Cyanobacteria and Their Toxins, Institute of Botany, The Academy of Sciences of the Czech Republic and RECETOX, Masaryk University Brno, Kamenice 3, CZ 625 00 Brno, Czech Republic

Abstract

Due to their wide uses in both domestic and industrial applications it is important to consider possible releases of silver nanoparticles (AgNPs) into the environment and the possible consequences. Thus, the potential toxicity of AgNPs to aquatic organisms has been intensively studied recently. However, culture media composition and stability of AgNPs seriously affect dose-response relationship. In present study the chronic toxicity of AgNPs to *Daphnia magna* in undiluted and 2-fold diluted media was examined. Both gelatin-stabilized and non-stabilized AgNPs were synthesized and their stability was assessed by transmission electron microscopy and UV/Visible spectroscopy. The half maximal effective concentrations (EC₅₀ values) for *D. magna* reproduction of non-stabilized AgNPs in undiluted medium, non-stabilized AgNPs in 2-fold diluted medium and AgNPs stabilized with 0.0001% (w/v) gelatin in 2-fold diluted medium were found to be 0.96, 0.32 and 0.16 mg/L, respectively. AgNPs stabilized with 0.005% gelatin did not aggregate and marked toxicity was observed across the AgNP concentration range from 0.001 to 1 mg/L. On the contrary, AgNPs with low stability in media were subjected to aggregation and re-crystallization towards large particles, which reduced their toxicity. Thus, the results demonstrate the importance of rigorous characterization of media composition for robust assessment of AgNPs' toxicological effects.

Keywords: Silver nanoparticles; aggregation; environmental toxicity; *Daphnia magna*

Abbreviations: AgNPs, silver nanoparticles; TEM, transmission electron microscopy; EC₅₀, half maximal effective concentration; Ag⁺, silver ions; OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development; PVP, Polyvinylpyrrolidone; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; CTAB, cetyltrimethylammonium bromide; DLVO, Derjagin, Landau, Verwey and Overbeek; LOAEC, lowest observed adverse effect concentration.

Introduction

Silver nanoparticles are well known mainly for their strong antimicrobial activity^{2,34}. Together with their easy manufacturing and manipulation, AgNPs have become the most popular nanomaterial used in various commercial, medical and sanitary products^{1,47}. Due to an increased amount of AgNPs applications, there is a high risk of aquatic environmental pollution and toxic effect on aquatic organisms. Toxicity studies have demonstrated that AgNPs are toxic to diverse aquatic organisms, including algae, cyanobacteria, plants, molluscs, crustaceans and fish, as illustrated by the following examples. They reportedly decrease photosystem II quantum yields of algae and impair growth of algae and cyanobacteria^{234,300}. They can cause oxidative stress and change antioxidant enzyme activities in aquatic plants and animals^{235,237,238}. They can retard the growth and development of marine benthic invertebrate larvae and reduce larval settlement rates²³⁹. They can also bioaccumulate in and damage fish gills, liver and muscle^{241,301}. Moreover, they can retard development, cause heart abnormalities and reduce both hatching rates and body lengths of fish larvae^{242,243}.

Their toxicity mechanisms have not been fully elucidated, but some studies indicate that their toxicity could be ascribed to silver ions (Ag^+) released from nanoparticle surfaces³⁰⁰, while others suggest their toxicity is more likely particle-specific²³⁷, or a combination of both^{234,238}.

Various studies have shown that AgNPs can have acute or chronic toxic effects on *Daphnia* spp. at concentrations ranging from a few micrograms to milligrams per litre upwards, depending (*inter alia*) on the nanoparticles' preparation method, size, surface coating and surface charge³⁰²⁻³⁰⁵. More than 70% of AgNPs enter these organisms through ingestion of algae^{302,306}. Consequently, silver is accumulated in their bodies around gills and the gut^{246,288}. Exposure to 0.1 mg/L of AgNPs reportedly change neonates' feeding behaviour, induces lesions and reduces both their body size and amounts of brown lipid storage droplets²⁴⁷. Exposure to just 0.002 mg/L may also affect their swimming ability³⁰⁷. Furthermore, a toxicogenomic study showed that AgNPs induce DNA damage in *D. magna*^{249,250}.

However, numerous factors in aquatic environments affect AgNPs' stability and thus their physico-chemical properties and toxicity. *Inter alia*, their aggregation and dissolution depend on pH, ionic strength and presence of oxidizing agents and other compounds²⁵¹⁻²⁵³. The importance of media composition has been highlighted in several recent studies. Yue et al. found that exposure to citrate-coated AgNPs in three media with varying ionic strength and chloride contents had differing toxicity against a fish gill cell²⁵⁴. Similarly, organic carbon content, pH and chloride content reportedly affect silver ions toxicity to the fish *Pimephales promelas*²⁵⁵.

A few recent studies have examined long-term effects of diluting artificial medium on the stability of AgNPs with different stabilizing agents^{256,257} and found that standard OECD medium should be diluted 10-fold to avoid aggregation (without affecting *D. magna* viability). In addition, Römer et al. found that diluting the medium increased the toxicity of citrate-stabilized AgNPs against *D. magna*²⁵⁸. However, the chronic toxicity of AgNPs to *D. magna* in diluted standard media has not been previously assessed. Thus, in the study presented here we examined effects of medium dilution on the chronic toxicity AgNPs to *D. magna*, by exposing the organism to undiluted and 2-fold diluted Elendt M4 medium. Effects of culture medium conditions on stability and crystallinity of silver nanoparticles was also investigated.

Materials and methods

Preparation and characterization of AgNPs

AgNPs were synthesized according to Kvítek et al.³⁰⁸ via reduction of $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ by D-maltose using the following (p.a. grade) chemicals: 1 mM silver nitrate (Fagron), 5 mM ammonium hydroxide (28 to 30% [w/w], Sigma-Aldrich), 9.6 mM sodium hydroxide (Lach-ner) and 10 mM D(+)-maltose monohydrate (Sigma-Aldrich). Reduction was completed within a few minutes. For experiments with stabilized AgNPs, gelatin (p.a. grade, Penta) was added to a final concentration of 0.005% (w/v) into undiluted medium or 0.0001% (w/v) into 2-fold diluted medium to prepared AgNP dispersions to prevent aggregation of nanoparticles. All experiments were carried out at room temperature (approx. 21 °C).

The AgNPs' size distributions were determined by the dynamic light scattering (DLS) method using a 90 Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instr. Co., USA) and transmission electron microscopy (TEM) using a JEM 2010 (Jeol, Japan), which also enabled determination of their shapes.

Stability of AgNPs in media

We evaluated the stability of the prepared AgNPs in both undiluted and 2-fold diluted Elendt M4 medium (at a silver concentration of 1 mg/L) by monitoring changes in their diameter using DLS technique, surface plasmon band at 412 nm by UV/Vis spectrophotometry (Specord S 600 Analytik Jena, Germany) over 24 h for non-stabilized AgNPs or 72 h for gelatin-stabilized AgNPs. In addition, TEM images of non-stabilized particles were taken after 24 hours to compare their sizes and shapes to those of fresh AgNPs.

Graphite furnace atomic absorption spectroscopy (GFAAS) using ContrAA 600 (Analytik Jena AG, Germany, detection limit 0.01 µg/L) equipped with a high-resolution Echelle double

monochromator (spectral band width of 2 pm at 200 nm) and with a continuum radiation source (xenon lamp) was used to determine a concentration of dissolved silver in order to consider possible toxic effect of free ionic silver released from stabilized and non-stabilized AgNPs. For this purpose total concentrations of AgNPs in undiluted or diluted media were 0.01, 0.1, 1, 10 mg/L and 0.01, 0.1, 1 mg/L, respectively. Determinations of dissolved ionic silver were performed immediately after mixing the AgNP dispersion (both stabilized and non-stabilized) with the media (both diluted and undiluted) and after three day period. Before measurements, AgNP dispersions were centrifuged for 30 min at 12000 x g in order to remove silver nanoparticles and aggregates. Obtained supernatants were dissolved in 2% HNO₃ and analysed by GFAAS. No organisms were present during these experiments.

Organisms and medium

The freshwater crustacean *D. magna* was used as a standard test organism. In all toxicity experiments, juveniles not older than 24 h (obtained from RECETOX, Masaryk University, Brno, Czech Republic) were used. The animals were maintained in standard Elendt's M4 solution (CSN ISO 10706, 2001) containing basic inorganic salts and vitamins prepared at pH 7.2, and this medium was used in all tests either undiluted or diluted 2-fold.

21-d chronic toxicity tests

According to Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD) Guideline 211 for testing chemicals, sets of 10 neonates were exposed to the AgNPs in vessels containing 50 mL medium for 21 days²⁸⁶, under 16/8 h light/dark cycles at 18 to 22 °C. The organisms were fed with *Pseudokirchneriella subcapitata* green algae daily and exposed to non-stabilized and stabilized AgNPs at 0.5 to 8.0 mg/L and 0.001 to 1.000 mg/L, respectively, in undiluted media, and to both non-stabilized and stabilized AgNPs at 0.03 to 0.50 mg/L in 2-fold diluted media. M4 medium with no AgNPs was used as a negative control. Sets of neonates were also exposed to 0.005% gelatin in undiluted medium and 0.0001% gelatin in 2-fold diluted medium without AgNPs to test for possible adverse effects of gelatin. Medium and toxicants were replaced with fresh medium and toxicants every three days. During each 21-d exposure period the number of surviving parents and numbers of neonates were recorded daily. The time to first brood and total number of juveniles at the end of exposure were also determined. At the end of the experiments lengths of parental organisms were measured, 21-d EC50 values were calculated, and the nonparametric Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$) was applied to evaluate the significance of differences between treated groups and controls.

Results

Synthesis and characterisation of AgNPs

To synthesize the AgNPs used in the toxicity tests we applied the modified Tollens process, involving reduction of the complex cation $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$. This reliably generates AgNPs of 28 nm diameter with a very narrow size distribution, as confirmed by TEM images showing that our preparations contained spherical particles with diameters of approximately 30 nm (Fig. S1). Moreover, UV/Vis absorption spectra of our AgNPs showed the typical surface plasmon absorption peak at 412 nm (Fig. S2).

Stability of AgNPs in undiluted and 2-fold diluted M4 media

Mixing AgNPs with either undiluted or diluted culture medium strongly affected the aggregation stability of silver particles, manifested by immediate increase in particle diameter from 28 nm to hundreds of nm and by changes in both colour and UV/Vis absorption spectra (Fig. 1a and 2a). The colour of dispersions changed from yellowish to blue-grey, while the absorption peak of fresh particles at 412 nm continuously decreased and secondary peaks emerged at 545 nm and 505 nm after mixing with undiluted and 2-fold diluted media, respectively. The positions of the maxima also shifted toward longer wavelengths with time, indicating increases in particle diameter from original 28 nm to final hundreds of nm after 24 hours which is in agreement with previous studies²⁹. TEM images confirmed the presence of large agglomerates arising from primary small AgNPs after mixing with either undiluted or 2-fold diluted culture media (Fig. 3). Moreover, large silver crystals with diameters of nearly 200 nm formed in undiluted culture media (Fig. 3a and 3b), possibly via re-crystallization of the initially small AgNPs induced by electrolytes²⁸⁵.

To prevent particle aggregation in culture media containing various electrolytes the biocompatible AgNP-stabilizing agent gelatin was used at very low concentrations that have no acute toxic effects on *D. magna*: 0.005% and 0.0001% in undiluted and 2-fold diluted culture media, respectively (Supplementary data). The presence of 0.005% gelatin eliminated the marked changes observed in the particle diameter and surface plasmon band of non-stabilised particles (Fig. 1a and 1b) and the colour of AgNP dispersions, confirming its stabilizing effect. Only slight increase in particle diameter up to 33 nm and slight light absorption in the region of 450 nm to 550 nm was observed in its presence, indicating very slight aggregation (Fig. 1b), and no evidence of re-crystallization was detected. In the presence of 0.0001% gelatin AgNP dispersions were less stable than in 0.005% gelatin, as manifested by a gradual decline in the surface plasmon peak at 412 nm

(Fig. 2b). Also particle diameter increased up to 80 nm after 24 hours. We observed some aggregation and subsequent sedimentation of particles stabilised by 0.0001% gelatin after 24 hours. Thus, such low gelatin concentrations appear to be insufficient for complete stabilization of AgNPs but sufficient to retard aggregation and prevent re-crystallization of silver particles into large silver agglomerates (under our test conditions).

Concentrations of free silver ions released from both non-stabilized and stabilized AgNPs into diluted and undiluted culture media were considerably low and were found to be of the same order of magnitude ($< 0.06 \mu\text{g/L}$) within three days in media.

Toxicity of non-stabilized AgNPs in undiluted medium

Of the tested permutations, non-stabilized AgNPs in undiluted M4 medium clearly had the weakest negative impact on *D. magna* survival (Fig. 4a), and the number of surviving adult individuals exposed to AgNPs gradually decreased with increases in silver concentration. Exposure to AgNPs at the highest concentration (8 mg/L) led to 100% mortality during the first day of *D. magna* breeding, and just three and two adults exposed to 4 mg/L of AgNPs survived for 6 and 21 days, respectively. Lower silver concentrations from 2 to 0.5 mg/L had less toxic effects on *D. magna* adults. Only two individuals exposed to 2 mg/L of AgNPs died on day 10 (from the start of exposure) and three on day 19. All individuals exposed to 1 mg/L of AgNPs survived until day 13, and nine of 10 individuals survived until the end of the exposure. AgNPs had no apparent effect on the survival of adults at the lowest test concentration (0.5 mg/L silver), as just one individual died during day 20 both at this concentration and in the control group that was not exposed to AgNPs.

Although AgNPs did not affect the viability of adult *D. magna* at 0.5 mg/L, and concentrations of 1 and 2 mg/L had moderate toxic effects, exposure to all tested concentrations (0.5 to 8 mg/L) markedly affected their reproductive ability (Fig. 4b). The number of neonates that hatched and the time to first brood was delayed as the concentration of AgNPs increased. The total number of juveniles was 38% lower than the control number at the end of exposure to the lowest AgNP concentration (0.5 mg/L). Moreover, the time to first brood increased from 7.6 days for controls to 8.6 days at 2 mg/L and 14.5 days at 4 mg/L, and no neonates hatched at the highest silver concentration (8 mg/L). The body length of adult *D. magna* gradually decreased with increasing silver concentration from 5 mm (control group) to 4.1 mm (at 4 mg/L of AgNPs). The reproduction EC50 was determined to be 1 mg/L of AgNPs.

Toxicity of stabilized AgNPs in undiluted medium

Gelatin was used to stabilize AgNPs to determine their toxicity at their original nanoparticle size. At 0.005% it successfully prevented aggregation of AgNPs in undiluted medium during a 3-d experiment (Fig. 1b), and no adverse effects of pure gelatin at this concentration on *D. magna* adults were detected in acute toxicity tests (Fig. S3). Stabilized AgNPs had significantly stronger toxic effects on *D. magna* than non-stabilized AgNPs, as fewer individuals survived in their presence during the tests (Fig. 5a). Toxic effects of AgNPs were noted within the first three days. On day 3 of the tests, mortality rates at silver concentrations of 0.01, 0.1 and 1.0 mg/L were 20, 60 and 80%, respectively. At the lowest silver concentration (0.001 mg/L) no toxic effects were detected during the first three days, but the number of surviving adults decreased to seven individuals on the 4th day and to one individual on the 6th day. No individuals survived in the presence of stabilized AgNPs at any concentration beyond the 9th day of the tests.

It should be noted that gelatin showed toxic effects on adult individuals during chronic toxicity tests (Fig. 5), as some individuals exposed to pure gelatin died during the 6th and 10th days (Fig. 5a). Moreover, both stabilized AgNPs and gelatin alone severely affected the reproduction ability of adult *D. magna* (Fig. 5b); just 61 neonates were produced in the presence of pure gelatin, compared to 1794 in the control conditions.

Toxicity of non-stabilized AgNPs in 2-fold diluted medium

In 2-fold diluted medium non-stabilized AgNPs were more toxic (Fig. 6a) than in undiluted medium (Fig. 4a), and their toxicity was dose-dependent. At 0.06 mg/L no adults died, at 0.03 mg/L one adult died on day 14, but only 20% of the adults survived the full 21-d exposure at the highest concentration (0.5 mg/L). In addition, the total number of juveniles generally declined with increases in the concentration of non-stabilized AgNPs in diluted medium (Fig. 6b). The total number of juveniles dropped to 180 at the end of exposure to 0.5 mg/L AgNPs, from 1102 individuals in control conditions. Moreover, although one adult individual died at 0.03 mg/L, more juveniles were produced at 0.03 mg/L than at 0.06 mg/L of AgNPs. However, the non-stabilized particles did not significantly affect either the time to first brood or the length of parents. Moreover, hormesis was observed at the lowest AgNP concentration, 0.03 mg/L (Fig. 6b). The calculated EC50 for reproduction of non-stabilized AgNPs in diluted media was 0.32 mg/L.

Toxicity of stabilized AgNPs in 2-fold diluted medium

In the diluted medium the number of *D. magna* adults that survived and numbers of juveniles declined with increases in concentration of stabilised AgNPs (Fig. 7). During exposure to the highest tested concentration (0.5 mg/L) all adults died and just 19 juveniles were produced. At 0.25 mg/L the AgNPs had consistently more toxic effects than at 0.13 mg/L, except for lower numbers of survivors on days 19 and 20, but there were only three surviving adults in both cases at the end of exposure. At 0.06 mg/L one adult died on day 16 and four individuals survived until the end of exposure. Exposure to the lowest AgNP concentration (0.03 mg/L) also led to death of one individual, on day 19, and five survived the full exposure. Gelatin also showed slight toxicity at the end of the 21-d experiment, but not sufficient to affect results of AgNP toxicity tests (Fig. 7a).

The total number of juveniles declined with increases in concentration of stabilised AgNPs from 0.06 to 0.5 mg/L (Fig. 7b). However, hormesis was detected at the lowest tested concentration (0.03 mg/L), at which more juveniles were produced (1739) than in the control group (1534). Although gelatin killed less adults than AgNPs at a concentration of 0.06 mg/L, fewer juveniles were produced in the presence of pure gelatin (1123) than in the presence of stabilised AgNPs (1237). The calculated EC_{50} of stabilized AgNPs in diluted media was 0.16 mg/L.

The presence of stabilised AgNPs did not significantly change the time to first brood from the control duration (8.8 days), and only significantly affected the mean length of adults at 0.25 mg/L, where it dropped from 4.8 mm (for controls) to 3.3 mm.

Discussion

Soluble silver compounds and AgNPs are considered to be highly toxic to aquatic organisms, but it is unclear whether the toxicity of AgNPs is largely due to their nano-size or release of dissolved ions from their surfaces. In various studies they have displayed toxic effects on *D. magna* at concentrations ranging from a few micrograms to milligrams per litre. However, the toxicity of nanoparticles is strongly dependent on the surrounding environment, which should be considered when assessing results of such studies. In this work we aimed to characterize the chronic toxicity of AgNPs to *D. magna* with respect to stability and crystallinity of silver nanoparticles influenced by media condition.

We observed clear dose-dependent effects of non-stabilized AgNPs on *D. magna* mortality and reproduction in undiluted M4 medium (Fig. 4a and 4b). However, the toxicity was far lower than reportedly observed in studies of other preparations' chronic toxicity. The lowest observed effective concentration in our study for impairing the length of *D. magna* and time to first brood was 2 mg/L,

and the calculated EC50 for *D. magna* reproduction was 1 mg/L. In contrast, concentrations of carbonate-coated AgNPs as low as 50 µg/L can reportedly inhibit reproduction and reduce the length of parents³⁰⁹, and EC10 values of 0.92, 2.25 and 3.45 µg/L for chronic toxicity of polyvinylpyrrolidone (PVP)-coated AgNPs towards *D. magna*, *D. pulex* and *D. galeata*, respectively, have been published²⁸⁸.

Aggregation and re-crystallization of the primary small (28 nm) AgNPs into larger particles presumably account for the low toxicity we observed, as it is well known that nanoparticles' antibacterial activity and toxicity are negatively correlated with their size^{310,311}. When AgNPs were mixed with medium, the absorption peak of the original particles was suppressed and secondary peaks emerged at longer wavelengths, indicating the presence of aggregates larger than 100 nm²⁸⁹. Furthermore, the secondary peaks gradually shifted to longer wavelengths, indicating that aggregates were growing (Fig. 1a), as confirmed by TEM. TEM images taken 24 h after mixing AgNPs with medium also clearly show that original small nanoparticles were present together with newly formed particles with diameters up to 200 nm (Fig. 3a and 3b), formed by re-crystallization. Oxidative species and coordination ligands play key roles in this process by causing so-called oxidative etching and dissolution of AgNPs, which promote the growth of new crystals. Oxidative etching is an important part of the metal nanocrystals synthesis. The re-crystallized particles are result of two cooperative processes – oxidation and reduction. Original zerovalent species produced by reduction of salt precursor and followed by growth into nanocrystals can be re-oxidized to the ionic form when oxidative species and coordination ligand for the metal ions are present. It enables to control size, shape and crystallinity during nucleation and growth^{251,285,290}.

In the presence of oxidizing agents, AgNPs dissolve and produce Ag⁺, which is a highly toxic form of silver to aquatic organisms. Thus, toxicity to cladocerans (such as *D. magna*) is often attributed mainly to Ag⁺ released from AgNPs^{291,309}. However, there are indications that the mechanism of AgNPs' toxicity may differ from that of silver salt solutions²⁵⁰. Notably, toxicity due to release of Ag⁺ should theoretically be reduced by the presence of other compounds such as complexing agent and dissolved organic matter^{293,312}. In our study, concentration of free Ag⁺ in medium was below 0.06 µg/L which represents very low concentration. Considerable amounts of any Ag⁺ released could have been complexed by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), a component of M4 medium. Further reductions in free Ag⁺ concentration could occur in the presence of algae used as feed. Accordingly, Blinova et al.³¹² and Sakamoto et al.²⁹⁴ respectively found that the chronic toxicity of PVP-coated and non-coated AgNPs was lower than their acute toxicity, as measured by standard protocols, and suggested that this could have been due to the addition of algae as food in the chronic tests. Moreover, algae exudates can significantly decrease metal toxicity generally²⁹⁵.

Because concentrations of Ag^+ in media were lower than concentrations of ionic silver sufficient to evoke chronic toxic effects (units of $\mu\text{g/L}$) we concluded that Ag^+ ions are not directly responsible for the observed toxic effects^{313,314}.

Particles' toxicity is generally inversely correlated to their size. Thus, the stability of AgNPs plays important roles in their toxic effects, for two main reasons: small particles can penetrate into organisms' bodies more easily than large particles, and they more readily release Ag^+ ^{296,302}. In addition to capping agents, the stability of AgNPs strongly depends on environmental factors, such as pH and ionic strength^{252,253}. When concentrations of electrolytes are decreased by diluting media colloidal stability should increase, according to Derjagin, Landau, Verwey and Overbeek (DLVO) theory²⁷. Thus, a few studies have addressed effects of diluting medium on the stability and acute toxicity of AgNPs to *D. magna*. Notably, Römer et al.²⁵⁶ found that: standard OECD medium must be reduced at least 10-fold to reduce aggregation of citrate-stabilized AgNPs significantly, such dilution does not affect the test organisms' mobility or fecundity in the absence of toxins but reduces the lowest observed adverse effect concentration of citrate-stabilized AgNPs from 11.25 to 2.5 $\mu\text{g/L}$ ²⁵⁸. Similarly, 10-fold dilution of standard OECD medium (with chlorides) reportedly stabilises PVP-AgNPs²⁵⁷.

In present study, we used gelatin at a concentration of just 0.0001% to minimize its toxicity and influence on AgNP toxicity. For this purpose, culture medium was diluted 2-fold to keep the AgNPs stable. As expected, the aggregation of non-stabilized AgNPs was slower in 2-fold diluted medium, and small AgNPs were present in the medium for a longer time, as manifested by a more gradual decrease in the UV/Vis absorption maximum of fresh AgNPs (Fig. 2a). Consequently, non-stabilized AgNPs were more toxic in 2-fold diluted medium (Fig. 6a and 6b) than in undiluted medium (Fig. 4a and 4b) in terms of both mortality and reproduction endpoints (e.g. EC50 values calculated from reproduction data were 0.32 and 1 mg/L, respectively, in these media). The viability and reproduction of parents in AgNP-free controls group were not affected by the dilution.

Adding just 0.0001% gelatin to AgNPs in 2-fold diluted medium further increased their stability (Fig. 2b). Considerable proportions of small AgNPs remained stable for three days. Moreover, stabilized AgNPs were more toxic to adults and more strongly impaired reproduction than non-stabilized AgNPs in diluted medium, as shown in Figs. 6 and 7. Interestingly, hormetic responses were observed to both stabilized and non-stabilized AgNPs, as more offspring were produced at the lowest concentrations used in 2-fold diluted medium than in controls. Similarly, Pokhrel and Dubey found that reproduction was 2-fold higher than control rates in 21-d tests when *D. magna* were treated with 2 $\mu\text{g/L}$ AgNPs²⁹⁷. However, variations in tolerance to AgNPs among generations of *D. pulex* and *D. galeata* have been observed in multi-generation experiments²⁸⁸.

Calculated EC50 values for stabilized and non-stabilized AgNPs were 0.16 and 0.32 mg/L, respectively, indicating that stabilized AgNPs are more toxic than non-stabilized AgNPs in diluted media. A particularly interesting finding in the context of present study is that gelatin was also slightly toxic, according to measurements at the end of 21 days exposure (Fig. 7a and 7b), despite the low concentration (0.0001%) used. However, gelatin toxicity was not reflected in AgNPs' toxicity at the lowest concentration used. When a higher gelatin concentration (0.005%) was used for stabilization, AgNPs retained their initial characteristics more strongly in undiluted medium (Fig. 1b), and the particles with the original small size (28 nm) were much more toxic than their non-stabilized counterparts. At all concentrations $\geq 1 \mu\text{g/L}$ AgNPs induced rapid mortality of adults and only 16 neonates were produced in medium with gelatin (Fig. 5). Dispersions of nanoparticles have various components: in addition to core particles there may be (*inter alia*) dissolved ions released from nanoparticle surfaces, capping agents, antifouling molecules and chemicals remaining from synthesis. Any of these components could contribute to the toxicity of dispersions, so all of them should be evaluated to assess sources of toxicity rigorously. In present study, gelatin at a concentration of 0.005% exhibited chronic toxicity (Fig. 5) but not acute toxicity (Fig. S3) in standard tests. Thus, changing of the gelatin every three days apparently affected *D. magna* adversely in the chronic tests. The dependence of nanoparticles' toxicity on capping agents has been previously noted²⁴⁶. Indeed, the toxicity of nanomaterial solutions may apparently arise solely from free capping agent²⁹⁸. The cited authors observed that free cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) used as a structure-directing agent for gold nanorods was cytotoxic, but not the gold nanorod solution. Capping agents can also change particles' surface charges, thereby reducing the electrostatic barrier between cells and particles²⁹⁹. Therefore, the amount and type of stabilizing agent should be carefully considered when assessing results of toxicity tests.

Conclusion

The results of present study clearly show that toxicological effects of AgNPs depend on the concentrations of medium constituents and stabilizing agent(s). Presumably due to its relatively high ionic strength, undiluted medium promoted aggregation and re-crystallization of non-stabilized AgNPs and reduction of their toxicity. The toxicity of AgNPs was markedly higher in 2-fold diluted medium, but the dilution did not affect the test organisms' viability in the absence of contaminants. Concentration of free Ag^+ released from AgNPs was considerably low in all performed experiments proving that toxicity is not driven only by ionic silver but it is also particle-specific. Overall, the results highlight the necessity of rigorously defining conditions, and assessing effects of all potentially relevant factors, in toxicity tests.

Acknowledgement

This work was supported by grant no. LO1305 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, provided through the Operational Programme Education for Competitiveness – European Social Fund (project no. CZ.1.07/2.3.00/20.0056 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic), the Czech Science Foundation (grant no. 15-22248S), the Ministry of Health of the Czech Republic (AZV VES 15-27726A) and Internal Grant of Palacký University, Olomouc (IGA_PrF_2015_022).

Data availability statement

The raw/processed data required to reproduce these findings cannot be shared at this time due to technical or time limitations.

References

- [1] A. Panáček, L. Kvítek, R. Prucek, M. Kolář, R. Večeřová, N. Pizúrova, V.K. Sharma, T. Nevěčná, R. Zbořil, Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 16248–16253. doi:10.1021/jp063826h.
- [2] A. Panáček, M. Kolář, R. Večeřová, R. Prucek, J. Soukupová, V. Kryštof, P. Hamal, R. Zbořil, L. Kvítek, Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp., *Biomaterials* 30 (2009) 6333–6340. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.065.
- [3] M.L.W. Knetsch, L.H. Koole, New strategies in the development of antimicrobial coatings: The example of increasing usage of silver and silver nanoparticles, *Polymers (Basel)*. 3 (2011) 340–366. doi:10.3390/polym3010340.
- [4] M.E. Vance, T. Kuiken, E.P. Vejerano, S.P. McGinnis, M.F. Hochella, D.R. Hull, Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory, *Beilstein J. Nanotechnol.* 6 (2015) 1769–1780. doi:10.3762/bjnano.6.181.
- [5] E. Navarro, F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, L. Sigg, R. Behra, Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 8959–64. doi: 10.1021/es801785m
- [6] A.D. Burchardt, R.N. Carvalho, A. Valente, P. Nativo, D. Gilliland, C.P. Garc, R. Passarella, V. Pedroni, T. Lettieri, Effects of Silver Nanoparticles in Diatom *Thalassiosira pseudonana* and Cyanobacterium *Synechococcus* sp., *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 11336–11344. doi:10.1021/es300989e.
- [7] J.E. Choi, S. Kim, J.H. Ahn, P. Youn, J.S. Kang, K. Park, J. Yi, D.-Y. Ryu, Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish, *Aquat. Toxicol.* 100 (2010) 151–9. doi:10.1016/j.aquatox.2009.12.012.
- [8] A. Oukarroum, L. Barhoumi, L. Pirastru, D. Dewez, Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*, *Environ. Toxicol. Chem.* 32 (2013) 902–7. doi:10.1002/etc.2131.
- [9] H.S. Jiang, X.N. Qiu, G.B. Li, W. Li, L.Y. Yin, Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*, *Environ. Toxicol. Chem.* 33 (2014) 1398–1405. doi:10.1002/etc.2577.
- [10] C.Y.S. Chan, J.M.Y. Chiu, Chronic effects of coated silver nanoparticles on marine invertebrate larvae: A proof of concept study, *PLoS One*. 10 (2015) doi:10.1371/journal.pone.0132457.
- [11] H. Salari Joo, M.R. Kalbassi, I.J. Yu, J.H. Lee, S.A. Johari, Bioaccumulation of silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): influence of concentration and salinity, *Aquat. Toxicol.* 140–141 (2013) 398–406. doi:10.1016/j.aquatox.2013.07.003.

- [12] K.S. Rajkumar, N. Kanipandian, R. Thirumurugan, Toxicity assessment on haematology, biochemical and histopathological alterations of silver nanoparticles-exposed freshwater fish *Labeo rohita*, *Appl. Nanosci.* (2015) 19–29. doi:10.1007/s13204-015-0417-7.
- [13] J.-G. Cho, K.-T. Kim, T.-K. Ryu, J. Lee, J.-E. Kim, J. Kim, B.-C. Lee, E.-H. Jo, J. Yoon, I. Eom, K. Choi, P. Kim, Stepwise embryonic toxicity of silver nanoparticles on *Oryzias latipes*, *Biomed Res. Int.* 2013 (2013) 494671. doi:10.1155/2013/494671.
- [14] E. Muth-Köhne, L. Sonnack, K. Schlich, F. Hischen, W. Baumgartner, K. Hund-Rinke, C. Schäfers, M. Fenske, The toxicity of silver nanoparticles to zebrafish embryos increases through sewage treatment processes, *Ecotoxicology* 22 (2013) 1264–77. doi:10.1007/s10646-013-1114-5.
- [15] C.-M. Zhao, W.-X. Wang, Size-dependent uptake of silver nanoparticles in *Daphnia magna*, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 11345–51. doi:10.1021/es3014375.
- [16] H.J. Jo, J.W. Choi, S.H. Lee, S.W. Hong, Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions against *Daphnia magna*: the importance of their dissolved fraction varying with preparation methods, *J. Hazard. Mater.* 227–228 (2012) 301–8. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.05.066.
- [17] J.W. Park, J.H. Oh, W.K. Kim, S.K. Lee, Toxicity of citrate-coated silver nanoparticles differs according to method of suspension preparation, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 93 (2014) 53–59. doi:10.1007/s00128-014-1296-4.
- [18] T. Silva, L.R. Pokhrel, B. Dubey, T.M. Tolaymat, K.J. Maier, X. Liu, Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: comparison between general linear model-predicted and observed toxicity, *Sci. Total Environ.* 468–469 (2014) 968–76. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.09.006.
- [19] C.-M. Zhao, W.-X. Wang, Biokinetic uptake and efflux of silver nanoparticles in *Daphnia magna*, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 7699–704. doi:10.1021/es101484s.
- [20] H.J. Allen, C.A. Impellitteri, D.A. Macke, J.L. Heckman, H.C. Poynton, J.M. Lazorchak, S. Govindaswamy, D.L. Roose, M.N. Nadagouda, Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*, *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (2010) 2742–50. doi:10.1002/etc.329.
- [21] C. Völker, C. Boedicker, J. Daubenthaler, M. Oetken, J. Oehlmann, Comparative toxicity assessment of nanosilver on three *Daphnia* species in acute, chronic and multi-generation experiments, *PLoS One.* 8 (2013) e75026. doi:10.1371/journal.pone.0075026.
- [22] B.K. Gaiser, A. Biswas, P. Rosenkranz, M.A. Jepson, J.R. Lead, V. Stone, C.R. Tyler, T.F. Fernandes, Effects of silver and cerium dioxide micro- and nano-sized particles on *Daphnia magna*, *J. Environ. Monit.* 13 (2011) 1227–35. doi:10.1039/c1em10060b.

- [23] S. Asghari, S.A. Johari, J.H. Lee, Y.S. Kim, Y.B. Jeon, H.J. Choi, M.C. Moon, I.J. Yu, Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*, *J. Nanobiotechnology* 10 (2012) 14. doi:10.1186/1477-3155-10-14.
- [24] S.-Y. Park, J.-H. Choi, Geno- and Ecotoxicity Evaluation of Silver Nanoparticles in Freshwater Crustacean *Daphnia magna*, *Environ. Eng. Res.* 15 (2010) 23–27. doi:10.4491/eer.2010.15.1.428.
- [25] H.C. Poynton, J.M. Lazorchak, C.A. Impellitteri, B.J. Blalock, K. Rogers, H.J. Allen, A. Loguinov, J.L. Heckman, S. Govindasmaw, Toxicogenomic responses of nanotoxicity in *Daphnia magna* exposed to silver nitrate and coated silver nanoparticles, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 6288–96. doi:10.1021/es3001618.
- [26] J. Yang, Q. Zhang, J.Y. Lee, H.P. Too, Dissolution-recrystallization mechanism for the conversion of silver nanospheres to triangular nanoplates, *J. Colloid Interface Sci.* 308 (2007) 157–161. doi:10.1016/j.jcis.2006.12.081.
- [27] A.M. El Badawy, T.P. Luxton, R.G. Silva, K.G. Scheckel, M.T. Suidan, T.M. Tolaymat, Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticle suspensions, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 1260–1266. doi:10.1021/es902240k.
- [28] L. V. Stebounova, E. Guio, V.H. Grassian, Silver nanoparticles in simulated biological media: A study of aggregation, sedimentation, and dissolution, *J. Nanoparticle Res.* 13 (2011) 233–244. doi:10.1007/s11051-010-0022-3.
- [29] Y. Yue, R. Behra, L. Sigg, P.F. Freire, S. Pillai, K. Schirmer, P. Fernández Freire, S. Pillai, K. Schirmer, Toxicity of silver nanoparticles to a fish gill cell line: Role of medium composition., *Nanotoxicology* 5390 (2015) 15–16. doi:10.3109/17435390.2014.889236.
- [30] R.J. Erickson, L.T. Brooke, M.D. Kahl, F. Vende Venter, S.L. Harting, T.P. Markee, R.L. Spehar, Effects of Laboratory Test Conditions on the Toxicity of Silver To Aquatic Organisms, *Environmental Toxicol. Chem.* 17 (1998) 572–578. doi:10.1002/etc.5620170407.
- [31] I. Römer, T.A. White, M. Baalousha, K. Chipman, M.R. Viant, J.R. Lead, Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4226–4233. doi:10.1016/j.chroma.2011.03.034.
- [32] M. Tejamaya, I. Römer, R.C. Merrifield, J.R. Lead, Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 7011–7017. doi:10.1021/es2038596.
- [33] I. Römer, A.J. Gavin, T.A. White, R.C. Merrifield, J.K. Chipman, M.R. Viant, J.R. Lead, The critical importance of defined media conditions in *Daphnia magna* nanotoxicity studies, *Toxicol. Lett.* 223 (2013) 103–108. doi:10.1016/j.toxlet.2013.08.026.

- [34] L. Kvítek, R. Pucek, A. Panáček, R. Novotný, J. Hrbáč, The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 1099–1105. doi:10.1039/B417007E.
- [35] OECD, Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, OECD Guidelines for the Testing Chemicals, Section 2: Effect on Biotic System, (2012). doi:10.1787/9789264070127-en.
- [36] L. Kvítek, J. Soukupová, R. Večeřová, R. Pucek, M. Holecová, R. Zbořil, Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs), *J. Phys. Chem. C.* 112 (2008) 5825–5834. doi:10.1021/jp711616v.
- [37] R. Pucek, A. Panáček, A. Fargašová, V. Ranc, V. Mašek, L. Kvítek, R. Zbořil, Re-crystallization of silver nanoparticles in a highly concentrated NaCl environment – a new substrate for surface enhanced IR-visible Raman spectroscopy, *CrystEngComm* 13 (2011) 2242. doi:10.1039/c0ce00776e.
- [38] C.-M. Zhao, W.-X. Wang, Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*, *Environ. Toxicol. Chem.* 30 (2011) 885–92. doi:10.1002/etc.451.
- [39] K. Park, G. Tuttle, F. Sinche, S.L. Harper, Stability of citrate-capped silver nanoparticles in exposure media and their effects on the development of embryonic zebrafish (*Danio rerio*), *Arch. Pharm. Res.* 36 (2013) 125–133. doi:10.1007/s12272-013-0005-x.
- [40] A. Ivask, I. Kurvet, K. Kasemets, I. Blinova, V. Aruoja, S. Suppi, H. Vija, K. Aleksandr, T. Titma, M. Heinlaan, M. Visnapuu, D. Koller, V. Kisand, A. Kahru, Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro, *PLoS One.* 9 (2014) e102108. doi:10.1371/journal.pone.0102108.
- [41] D.D. Evanoff, G. Chumanov, Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays, *ChemPhysChem* 6 (2005) 1221–1231. doi:10.1002/cphc.200500113.
- [42] R. Long, S. Zhou, B.J. Wiley, Y. Xiong, Oxidative etching for controlled synthesis of metal nanocrystals: atomic addition and subtraction., *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 6288–310. doi:10.1039/c4cs00136b.
- [43] K.M. Newton, H.L. Puppala, C.L. Kitchens, V.L. Colvin, S.J. Klaine, Silver nanoparticle toxicity to *Daphnia magna* is a function of dissolved silver concentration, *Environ. Toxicol. Chem.* 32 (2013) 2356–64. doi:10.1002/etc.2300.
- [44] I. Blinova, J. Niskanen, P. Kajankari, L. Kanarbik, A. Kähkönen, H. Tenhu, O.-P. Penttinen, A. Kahru, Toxicity of two types of silver nanoparticles to aquatic crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20 (2013) 3456–63. doi:10.1007/s11356-012-1290-5.

- [45] F. Seitz, R.R. Rosenfeldt, K. Storm, G. Metreveli, G.E. Schaumann, R. Schulz, M. Bundschuh, Effects of silver nanoparticle properties, media pH and dissolved organic matter on toxicity to *Daphnia magna*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111 (2015) 263–70. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.09.031.
- [46] M. Sakamoto, J. Ha, S. Yoneshima, C. Kataoka, H. Tatsuta, S. Kashiwada, Free Silver Ion as the Main Cause of Acute and Chronic Toxicity of Silver Nanoparticles to Cladocerans, *Arch. Environ. Contam. Tox.* 68 (2015) 500–509. doi:10.1007/s00244-014-0091-x.
- [47] B. Koukal, P. Rossé, A. Reinhardt, B. Ferrari, K.J. Wilkinson, J.L. Loizeau, J. Dominik, Effect of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae) exudates on metal toxicity and colloid aggregation, *Water Res.* 41 (2007) 63–70. doi:10.1016/j.watres.2006.09.014.
- [48] A. Bianchini, C.M. Wood, Physiological effects of chronic silver exposure in *Daphnia magna*, *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 133 (2002) 137–145. doi:10.1016/S1532-0456(02)00088-1.
- [49] R.B. Naddy, J.W. Gorsuch, A.B. Rehner, G.R. Mc Nerney, R.A. Bell, J.R. Kramer, Chronic toxicity of silver nitrate to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*, and potential mitigating factors, *Aquat. Toxicol.* 84 (2007) 1–10. doi:10.1016/j.aquatox.2007.03.022.
- [50] J. Dobias, R. Bernier-Latmani, Silver release from silver nanoparticles in natural waters, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 4140–4146. doi:10.1021/es304023p.
- [51] E.J.W. Verwey, J.T.G. Overbeek, Theory of the stability of lyophobic colloids, *J. Phys. Colloid Chem.* 51 (1947) 631–636. doi:10.1038/162315b0.
- [52] L.R. Pokhrel, B. Dubey, Potential Impact of Low-Concentration Silver Nanoparticles on Predator-Prey Interactions between Predatory Dragonfly Nymphs and *Daphnia magna* as a Prey, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 7755–7762.
- [53] A.M. Alkilany, P.K. Nalaria, C.R. Hexel, T.J. Shaw, C.J. Murphy, M.D. Wyatt, Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: Molecular origin of cytotoxicity and surface effects, *Small.* 5 (2009) 701–708. doi:10.1002/sml.200801546.
- [54] A.M. El Badawy, R.G. Silva, B. Morris, K.G. Scheckel, M.T. Suidan, T.M. Tolaymat, Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 283–287. doi:10.1021/es1034188.

Figures

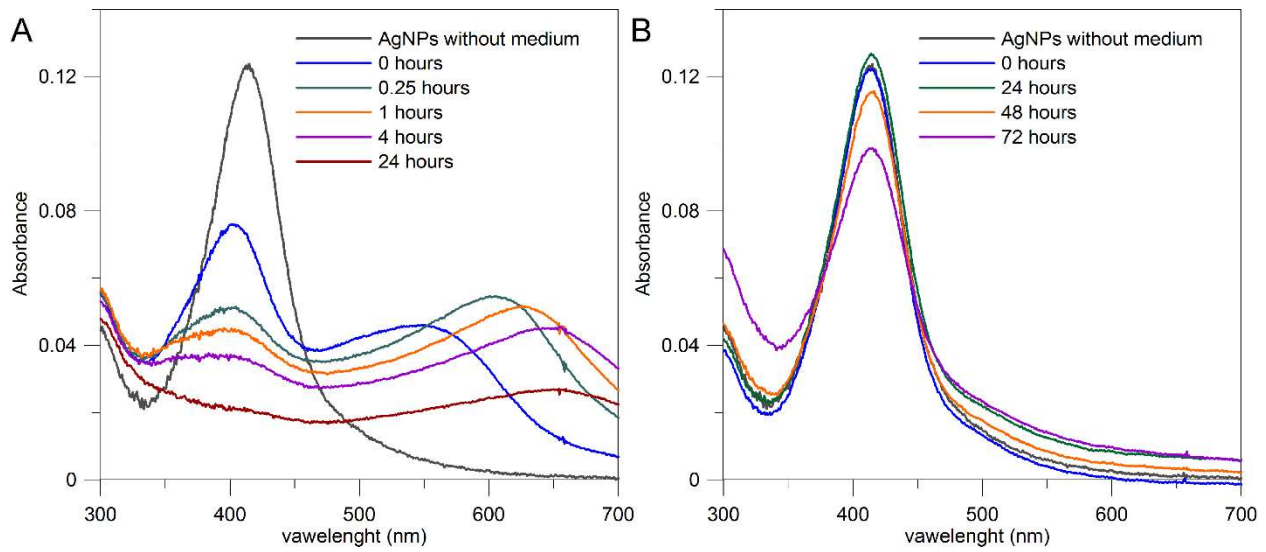


Fig. 1 UV/Vis absorption spectra of (a) non-stabilized silver nanoparticles (AgNPs, 10 mg/L) in undiluted M4 medium recorded during 24 h and (b) AgNPs stabilized with 0.005% of gelatin in undiluted M4 medium recorded during 72 h.

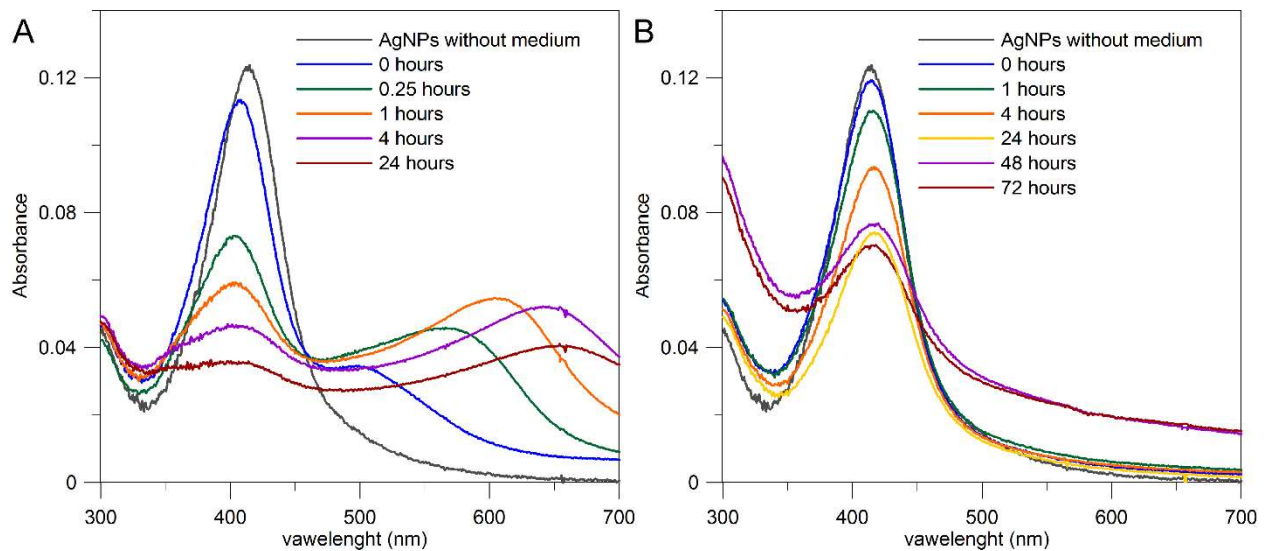


Fig. 2 UV/Vis absorption spectra of (a) non-stabilized silver nanoparticles (AgNPs, 10 mg/L) in 2-fold diluted M4 medium recorded during 24 h and (b) AgNPs stabilized with 0.0001% of gelatin in 2-fold diluted M4 medium recorded during 72 h.

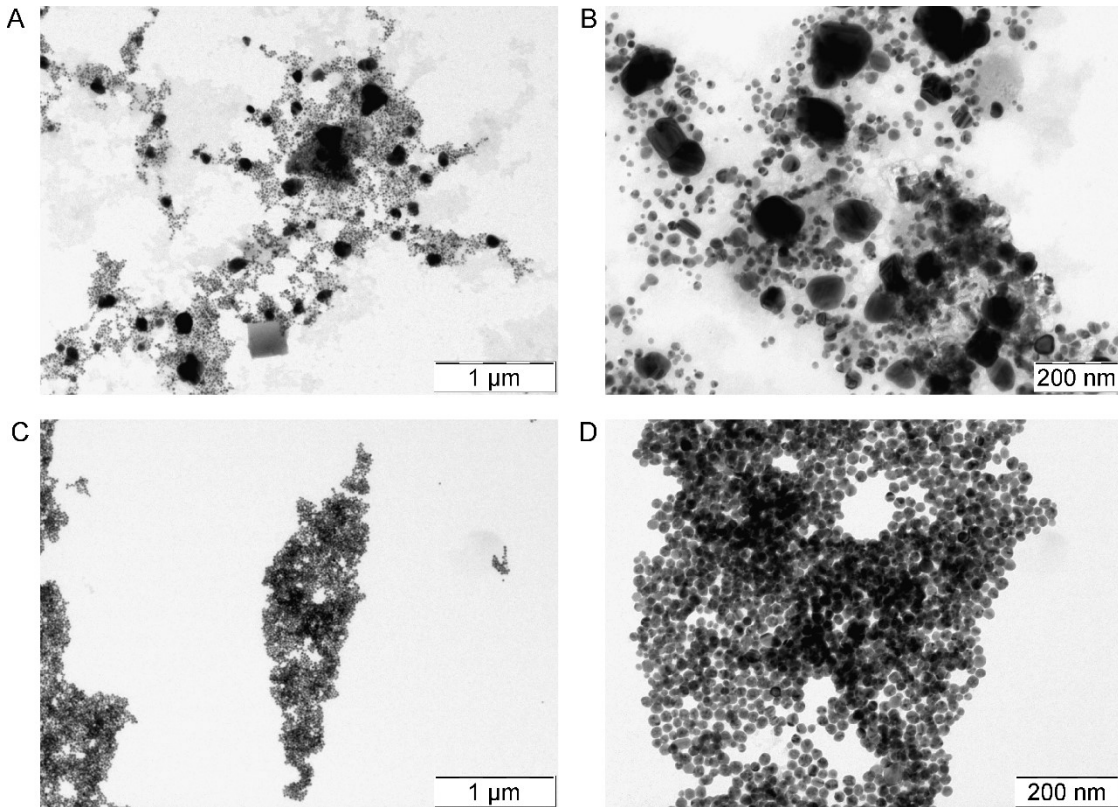


Fig. 3 TEM images of large silver agglomerates formed by re-crystallization and aggregation recorded 24 h after mixing with undiluted (a, b) and diluted (c, d) culture media.

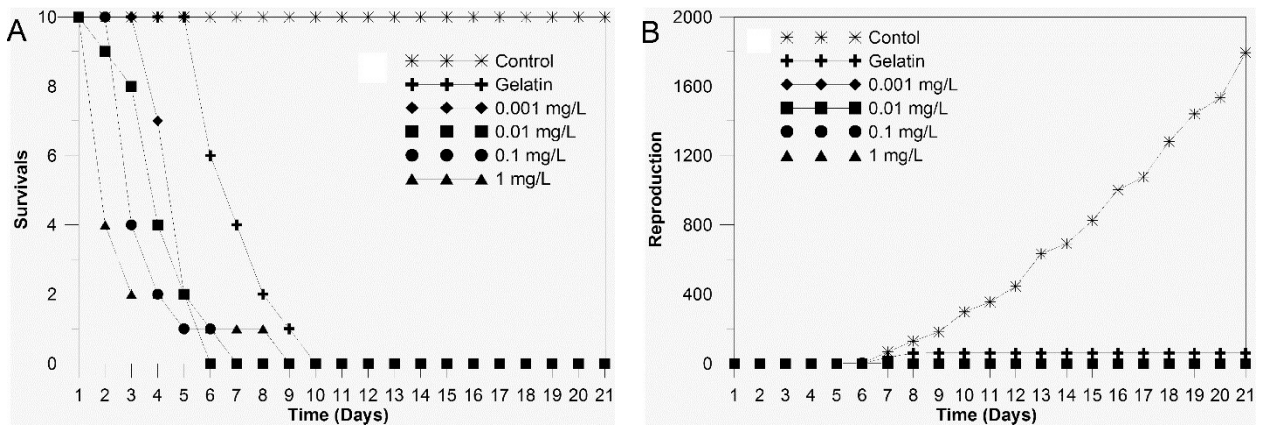


Fig. 4 Numbers of (a) surviving adults and (b) offspring of *Daphnia magna* exposed to non-stabilized AgNPs in undiluted M4 medium during 21 days.

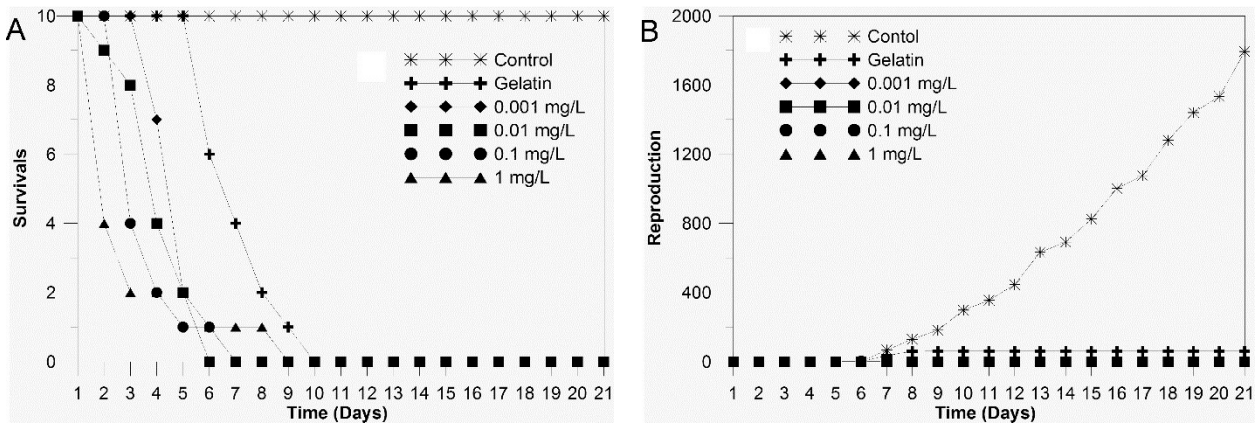


Fig. 5 Numbers of (a) surviving adults and (b) offspring of *Daphnia magna* exposed to AgNPs stabilized with 0.005% of gelatin in undiluted M4 medium during 21 days.

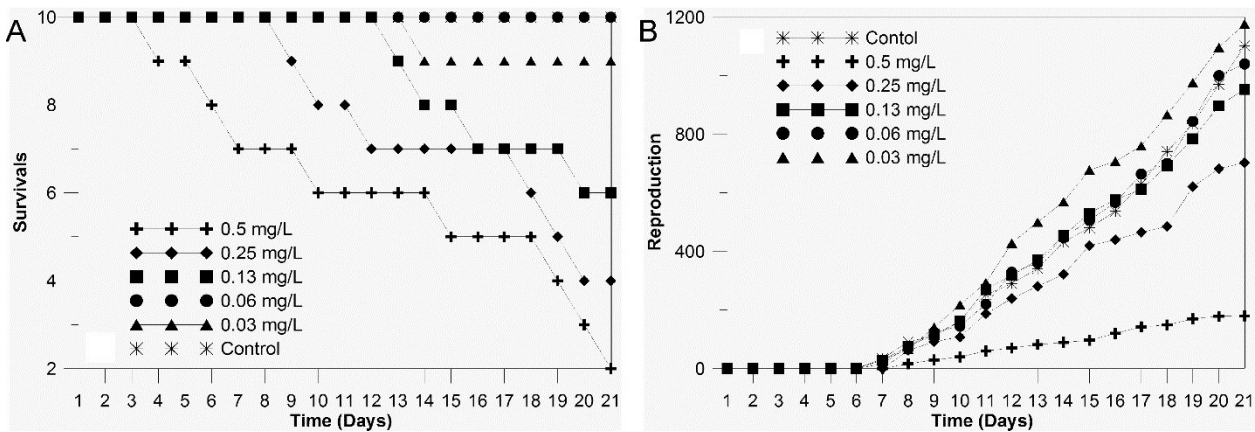


Fig. 6 Numbers of (a) surviving adults and (b) offspring of *Daphnia magna* exposed to non-stabilized AgNPs in 2-fold diluted M4 medium during 21 days.

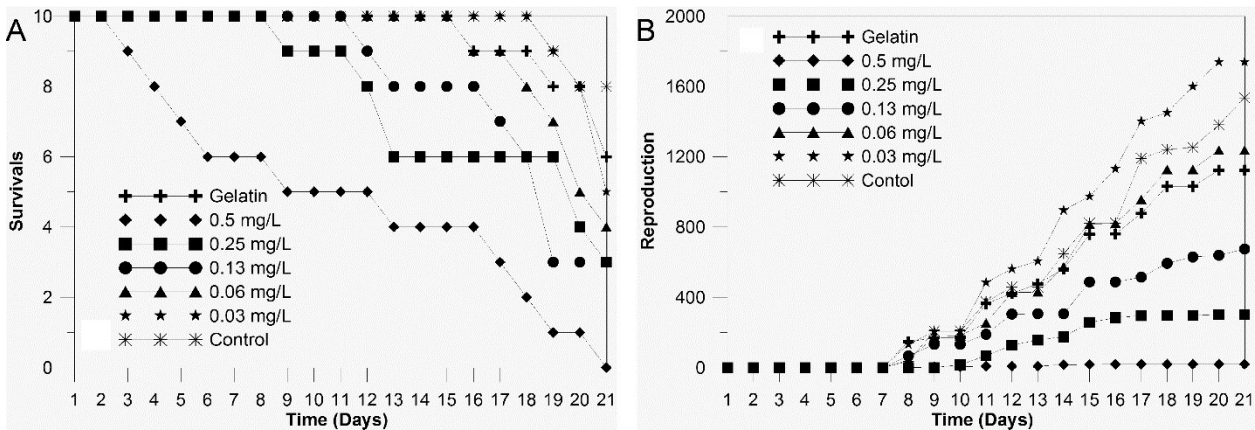


Fig. 7 Numbers of (a) surviving adults and (b) offspring of *Daphnia magna* exposed to stabilized AgNPs with 0.0001% gelatin in 2-fold diluted M4 medium during 21 days.

Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it

Aleš Panáček¹, Libor Kvítek^{1*}, Monika Smékalová¹, Renata Večeřová², Milan Kolář²,
Magdalena Röderová², Filip Dyčka³, Marek Šebela³, Robert Pucek¹, Ondřej Tomanec⁴ and Radek Zbořil^{1*}

Silver nanoparticles have already been successfully applied in various biomedical and antimicrobial technologies and products used in everyday life. Although bacterial resistance to antibiotics has been extensively discussed in the literature, the possible development of resistance to silver nanoparticles has not been fully explored. We report that the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* O13, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 and *E. coli* CCM 3954 can develop resistance to silver nanoparticles after repeated exposure. The resistance stems from the production of the adhesive flagellum protein flagellin, which triggers the aggregation of the nanoparticles. This resistance evolves without any genetic changes; only phenotypic change is needed to reduce the nanoparticles' colloidal stability and thus eliminate their antibacterial activity. The resistance mechanism cannot be overcome by additional stabilization of silver nanoparticles using surfactants or polymers. It is, however, strongly suppressed by inhibiting flagellin production with pomegranate rind extract.

Silver nanoparticles (NPs) and nanocomposites are considered promising nanomaterials in medical applications and biotechnology because of their high antimicrobial efficiency¹. There is great interest in medical applications of silver NPs because of the development and spread of bacterial resistance to antibiotics, which limits the effectiveness of antibiotic treatments for infectious diseases^{2–4}. Silver NPs exhibit high bactericidal activity at concentrations that are not cytotoxic to human cells, and they also strongly enhance the antibacterial activity of conventional antibiotics even against multiresistant bacteria through synergistic effects^{5–15}. It is currently too early to say whether silver NPs could be used in medicine to enhance the effectiveness of antibiotics or fully replace them in the treatment of local and systemic infections. It is, however, the right time to start considering the potential development of bacterial resistance to silver NPs.

Silver in various forms (metallic silver, silver salts and colloidal silver) has been used as an effective antibacterial agent for many centuries and has retained effective antibacterial activity throughout that period. As yet, there have been no conclusive reports on the development of bacterial resistance to silver NPs. There have, however, been some reports of bacterial resistance to ionic silver^{16–23}. Such resistance may involve reducing Ag⁺ to the less toxic neutral oxidation state or active efflux of Ag⁺ from the cell by P-type adenosine triphosphatases or chemiosmotic Ag⁺/H⁺ antiporters^{17–21}. In addition, a few recent studies have provided tentative evidence of bacterial resistance or reduced susceptibility to silver NPs. Most of these studies invoked resistance mechanisms based on the elimination of ionic forms of silver^{22–24}. On the other hand, in contrast to the intensive, long-term and repeated administration of classical antibiotics or ionic forms of silver (for example silver sulfadiazine), silver NPs have not been commonly used in medical practice, excluding a brief period at the start of the twentieth century when colloidal silver was used to treat some conditions. Therefore, it is not clear

whether bacteria may develop resistance to silver NPs. The only research to have studied bacterial behaviour in response to repeated long-term exposure to silver NPs²⁴ found that among many bacterial strains, only *Bacillus subtilis* has a natural ability to adapt to cellular oxidative stress induced by Ag⁺ leaching upon prolonged exposure to nanosilver particles supported on crystalline TiO₂. Despite these efforts, there is ongoing debate about whether bacteria may develop resistance to the antibacterial effect of silver NPs upon long-term exposure to subinhibitory silver concentrations.

Here, we describe a new mechanism by which bacteria originally susceptible to silver NPs can become resistant to their toxic effects after repeated long-term exposure to subinhibitory concentrations. The mechanism is based on the production of the bacterial flagellum protein flagellin, which causes the aggregation of silver NPs and thereby suppresses their antibacterial effect against Gram-negative bacteria.

Development of bacterial resistance to silver NPs

Gradual increases in the minimal inhibitory concentrations of silver NPs. For the purposes of this study, the well-known and reliable modified Tollens process⁹ was used to prepare silver NPs with a diameter of 28 nm and concentration of 108 mg l⁻¹. The narrow size distribution of the prepared NPs was confirmed by transmission electron microscopy (TEM) and the presence of a narrow surface plasmon absorption peak at 405 nm in their ultraviolet/visible (UV/Vis) spectrum (Supplementary Fig. 1). Silver NPs synthesized in this way exhibit high antibacterial activity, as demonstrated by their low minimum inhibitory concentrations (MICs) towards non-adapted bacteria, which range from 1.69 to 13.5 mg l⁻¹ (Table 1). With the NPs in hand, we performed 20 successive bacterial cultivation steps with each tested bacterial strain in cultivation media containing subinhibitory silver concentrations, and we determined the MICs of the silver NPs after each cultivation step (Table 1). The first

¹Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Palacký University Olomouc, Olomouc, Czech Republic.

²Department of Microbiology, Palacký University Olomouc, Olomouc, Czech Republic. ³Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University Olomouc, Olomouc, Czech Republic. ⁴Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Palacký University Olomouc, Olomouc, Czech Republic. *e-mail: libor.kvitek@upol.cz; radek.zboril@upol.cz

Table 1 | Minimum inhibitory concentrations of silver NPs as determined for various Gram-negative bacteria after each of 20 consequent culture steps

Bacteria	MIC (mg l ⁻¹)																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>E. coli</i> CCM 3954	3.38	6.75	3.38	6.75	6.75	13.5	13.5	54	>54	>54	>54	>54	>54	>54	>54	>54	>54	>54	>54	>54
<i>P. aeruginosa</i> CCM 3955	1.69	3.38	0.89	1.69	3.38	3.38	1.69	1.69	3.38	3.38	6.75	27	54	>54	54	54	>54	54	>54	54
<i>E. coli</i> 013	13.5	27	13.5	27	13.5	13.5	13.5	13.5	13.5	27	27	54	>54	>54	>54	>54	54	>54	>54	>54

The increasing MIC values show the gradual development of bacterial resistance against silver NPs.

bacterium to develop appreciable resistance to the silver NPs was *E. coli* CCM 3954. After the sixth cultivation step, the MIC for this strain (13.5 mg l⁻¹) was significantly greater than that for the corresponding reference strain (3.38 mg l⁻¹). By the eighth step, the strain's MIC had risen to 54 mg l⁻¹. Similarly, *P. aeruginosa* CCM 3955 and *E. coli* 013 became resistant to the silver NPs by the 11th and 13th steps, respectively. All of the tested bacterial strains maintained their resistance to the silver NPs between the 13th and 20th steps (Table 1). These results clearly show that all the tested bacterial strains developed resistance to silver NPs after repeated exposure. We determined the final MICs of silver NPs against these 'Ag-resistant' strains using silver dispersion with concentrations as high as 432 mg l⁻¹ prepared by a very similar procedure to that used to synthesize the primary NPs. Importantly, all the 'Ag-resistant' bacteria had substantially higher MIC values than their 'Ag-susceptible' parent strains. For example, the MIC for *E. coli* CCM 3954 rose from 3.38 to 108 mg l⁻¹, that for *P. aeruginosa* CCM 3955 went from 1.69 to 54 mg l⁻¹, and that for *E. coli* 013 (Supplementary Table 1) went from 13.5 to 108 mg l⁻¹.

Interestingly, no increase in MICs was observed during a parallel set of experiments in which ionic silver was added to the culture medium in place of Ag NPs. That is, no bacterial resistance to ionic silver developed under the tested conditions. In addition, the MICs for ionic silver towards the silver NP-resistant bacteria were identical to those for their non-resistant parent strains, confirming that the resistance mechanism that protects against silver NPs is ineffective against ionic silver. The induced bacterial resistance to silver NPs thus seems to be specific to nanoparticulate silver.

Aggregation and precipitation of silver NPs. The bacterial resistance to silver NPs was accompanied by a gradual aggregation and precipitation of silver at the bottom of microplate wells containing the 'Ag-resistant' bacterial strains. As shown in Fig. 1, this is readily detectable because it changes the well's colour from light yellow at the start of the experiment to grey-black after 24 hours' cultivation with the 'Ag-resistant' bacterial strain (Fig. 1). Conversely, wells containing 'Ag-susceptible' bacterial strains and silver NPs retain their yellow colour (Supplementary Fig. 2), which is indicative of a stable and well-dispersed NP suspension because it originates from the NPs' surface plasmon absorption.

The high aggregation stability of silver NPs after culturing with 'Ag-susceptible' bacteria was clearly demonstrated by TEM (Fig. 2a,b). Conversely, large aggregates of silver NPs with sizes ranging from several hundred nanometres to micrometres were observed after culturing with 'Ag-resistant' *E. coli* CCM 3954 (Fig. 2c,d). This clearly shows that 'Ag-resistant' *E. coli* CCM 3954 induces the aggregation of silver NPs (see also Fig. 2e,f) and thereby suppresses their antibacterial effect. It is well established that large silver particles and aggregates have considerably lower antibacterial activity than pristine well-dispersed silver NPs^{25,26}. The bacteria were thus able to induce aggregation of silver NPs after repeated culturing, leading to suppression or even total elimination of their antibacterial effects. The aggregation and sedimentation stability of colloid

particles plays a key role in maintaining their unique properties, including biological activity, so any process that disrupts their colloidal stability can profoundly change their behaviour. It seems that the tested bacteria developed a way to exploit this vulnerability.

Mechanism of silver NPs aggregation induced by bacteria

To explore the mechanism of aggregation, we attempted to reduce the resistance of the cultured bacteria and restore the antibacterial activity of silver NPs through surface stabilization with commonly used non-toxic stabilizers such as polymers (polyethylene glycol and polyacrylic acid), the protein gelatin and the surfactant Tween 80. Bacterial growth curves and viability tests indicated that none of these stabilizers had any appreciable effect on bacterial growth and metabolism (for detailed information, see the Supplementary experimental section, Supplementary Fig. 3 and Supplementary Table 2). Most importantly, cultivation experiments using these stabilizers (for MICs, see Supplementary Table 3) unambiguously demonstrated that 'Ag-resistant' *E. coli* CCM 3954 retains its resistance even when exposed to surface-stabilized silver NPs. Indeed, none of the tested stabilizers restored the antibacterial activity of the silver NPs in the presence of the 'Ag-resistant' strain. This is important because polymers/surfactants have been repeatedly identified as efficient stabilizers that can ensure the colloidal stability of water dispersions of silver nanoparticles²⁵. However, the 'Ag-resistant' bacteria can clearly overcome this barrier.

The ability of silver NPs to inhibit the growth of 'Ag-susceptible' *E. coli* CCM 3954 and 'Ag-resistant' *E. coli* CCM 3954 strains was further investigated by culturing on agar plates containing NPs at concentrations of 20 mg l⁻¹ and 40 mg l⁻¹. 'Silver-resistant' bacterial strains cultured on plates containing silver NPs at either concentration were not inhibited, whereas the growth of susceptible strains was completely inhibited (Supplementary Fig. 4). Moreover, NP aggregation was clearly observed during and after the culture of the resistant strain on the agar plates (Supplementary Fig. 5): the agar gel containing the silver NPs was originally yellow but gradually became grey around and beneath the 'Ag-resistant' bacteria.

It is worth noting that the aggregation stability of colloidal particles in liquids is determined by (among other things) competition between van der Waals attraction and electrostatic repulsion forces between colloidal particles with the same surface charge. The zeta potential of the silver NPs used in this study was -28 mV, which is nominally sufficient to ensure long-term aggregation stability. According to the DLVO theory (named for Derjaguin, Landau, Verwey and Overbeek), which quantitatively describes the aggregation of charged colloidal particles by combining the effects of van der Waals attraction and electrostatic repulsion (Coulombic forces)²⁷, aggregation can be induced by adding appropriate counterions that eliminate the particles' surface charges. Induced aggregation of silver NPs by this mechanism using a cationic polyelectrolyte has been demonstrated²⁵. The aggregation of silver NPs is readily monitored by UV/Vis spectrophotometry. The absorption spectra of silver NPs diluted in Mueller-Hinton broth at a ratio of 1:1 (V/V) before and after culturing with 'Ag-susceptible'

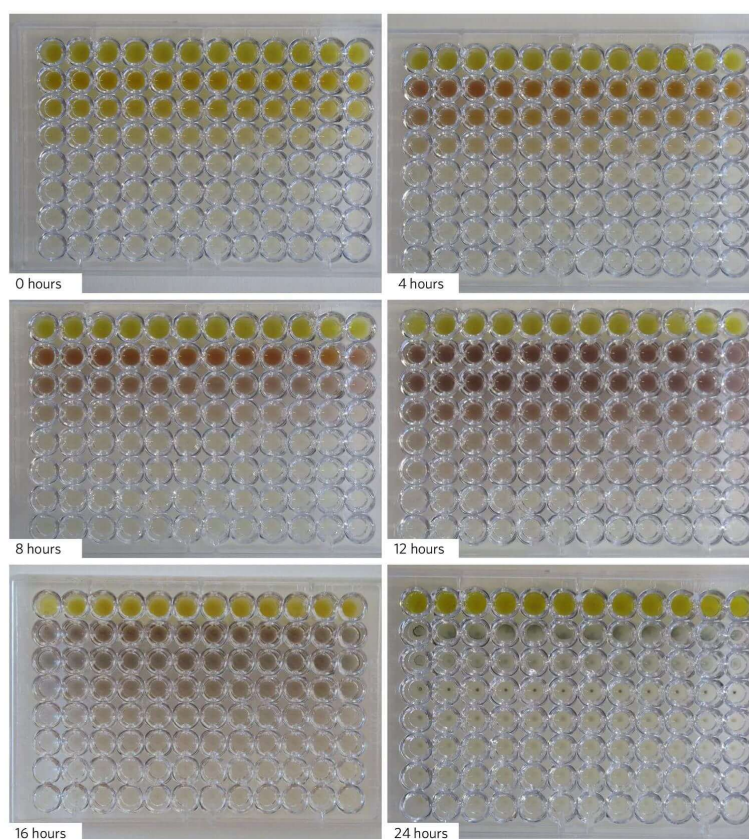


Fig. 1 | Gradual aggregation and precipitation of silver NPs in microplates containing 'Ag-resistant' *E. coli* CCM 3954 after 0, 4, 8, 12, 16 and 24 hours of cultivation. The concentration of silver NPs decreases gradually from 54 mg l^{-1} to 0.84 mg l^{-1} on going from the second to the eighth row. The upper row contains pristine dispersions of silver NPs (108 mg l^{-1}) without any bacteria or culture media.

and 'Ag-resistant' *E. coli* CCM 3954 are presented in Fig. 3a. The characteristic surface plasmon band of well-dispersed colloidal silver NPs gradually disappears in the presence of 'Ag-resistant' *E. coli* CCM 3954 owing to the aggregation of silver NPs. Conversely, in the presence of the 'Ag-susceptible' strain, the intensity of the surface plasmon band remains unchanged even after 24 hours of cultivation (Fig. 3a). This suggests that 'Ag-resistant' bacteria induce aggregation of silver NPs by extracellular secretion of an agent that remains adsorbed on the aggregates' surfaces. This agent is likely to be a high-molecular-mass substance such as a protein. Therefore, protein extracts prepared using various solvents were subjected to proteomic mass spectrometry (MS) and tandem mass spectrometry (MS/MS) analysis to identify proteins that might be responsible for the observed NP aggregation. Several proteins were detected in all the extracts except those prepared using 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (see Supplementary datasets 1, 2 and 3). These proteins included 30S and 50S ribosomal proteins and enzymes involved in cellular metabolism in *E. coli*, indicating that some degree of cell lysis occurred before or during the extraction process.

The most abundant proteins in the extract prepared with 2.5% TFA were flagellin followed by type-1 fimbrial protein. Flagellin was also one of the most abundant proteins in the extracts prepared

with diluted NH_4OH . Table 2 summarizes peptides, which were sequenced by collision-induced MS/MS and unambiguously matched to flagellin sequences. Flagellin is a bacterial protein that forms the extracellular flagellar filaments that enable bacterial motility^{28,29} and elicits immune responses via toll-like receptor 5 (ref. 30). It is also an adhesive protein that (together with the flagellum) is crucial for biofilm formation due to its role in the initial stages of surface adhesion^{31–33}. However, its potential effects on the aggregation stability of silver NPs have not previously been studied. To investigate the proposed role of flagellin in triggering the aggregation process, we conducted a simple experiment with a commercially available flagellin solution, which we added to a diluted dispersion of silver NPs in Mueller–Hinton broth under conditions similar to those used in the culture experiments. The mixture was then heated to 37°C for 24 hours. The initially yellow dispersion of silver NPs immediately became grey upon adding flagellin (Fig. 4a), and a black silver precipitate was observed at the bottom of the Eppendorf tube after 24 hours at 37°C (Fig. 4b), conclusively demonstrating that flagellin induces aggregation of silver NPs.

The induction of aggregation upon adding flagellin to dispersions of silver NPs was confirmed by particle size and zeta potential measurements, and UV/Vis spectroscopy. As shown in Fig. 3b, the

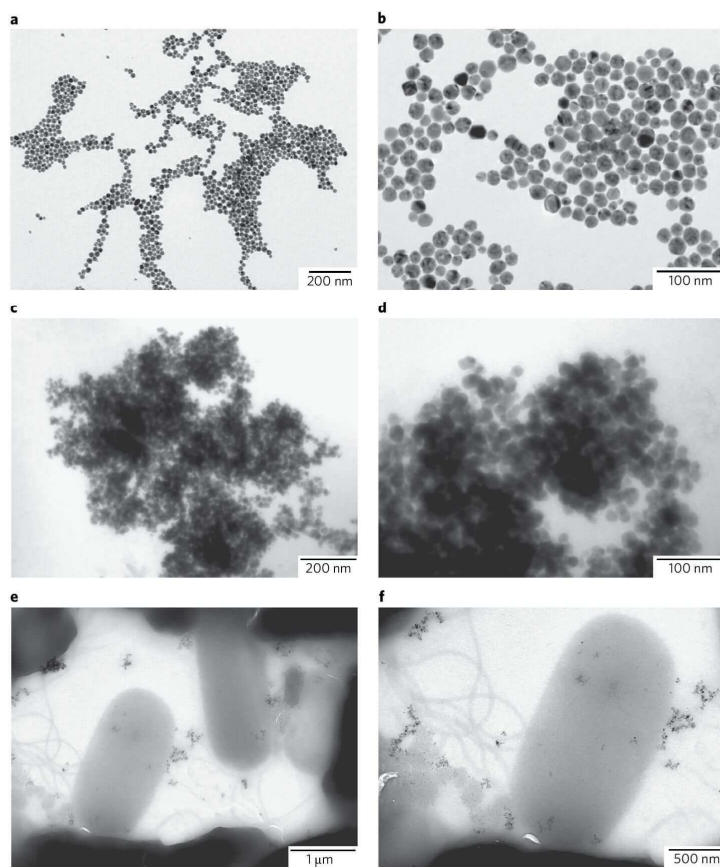


Fig. 2 | High aggregation stability of silver NPs after culturing with 'Ag-susceptible' bacteria demonstrated by TEM images. a, b, Pristine non-aggregated silver NPs; **c, d,** aggregated silver NPs after culturing for 24 hours with 'Ag-resistant' *E. coli* CCM 3954. **e, f,** Aggregation of silver NPs induced by resistant *E. coli* CCM 3954.

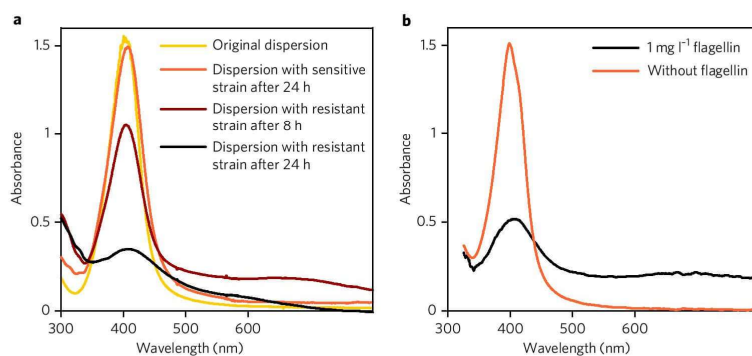


Fig. 3 | UV/Vis absorption spectra. a, Spectra are shown for silver NPs diluted in Mueller-Hinton broth before (original dispersion) and after culturing with 'Ag-susceptible' and 'Ag-resistant' *E. coli* CCM 3954. **b,** UV/Vis spectra of silver NPs diluted in Mueller-Hinton broth before and after addition of commercial flagellin, showing its strong effect on aggregation stability.

Table 2 | Peptides identified to match flagellin sequences in the Swiss-Prot database

Peptide number	Accession number	Protein: organism	Measured m/Z value	Calculated mass	Charge (Z+)	Δ m/Z (ppm)	Retention time (min)	Score value	Sequence
1	FLIC_SHIFL	Flagellin: <i>Shigella flexneri</i>	596.288	1190.5891	2	-23.21	12.93	62.8	K.NQSALSSSIER.L
2	FLIC_SHIFL	Flagellin: <i>Shigella flexneri</i>	572.812	1143.6248	2	-13.39	13.73	55.3	L.SLITQNNINK.N
3	FLIC_SHIFL	Flagellin: <i>Shigella flexneri</i>	720.909	1439.8096	2	-4.29	16.77	121.7	K.AQIIQQAGNSVLAK.A
4	FLIC_SHIFL	Flagellin: <i>Shigella flexneri</i>	581.295	1160.5925	2	-14.65	17.15	79.8	K.ALDEAISSIDK.F
5	FLIC_SHIFL	Flagellin: <i>Shigella flexneri</i>	672.872	1343.7409	2	-8.49	17.57	74.5	N.SLSLITQNNINK.N
6	FLIC_SHIFL	Flagellin: <i>Shigella flexneri</i>	750.357	2248.0931	3	-19.53	17.74	23.2	R.LDSAVTNLNNTTTNLSEAQSR.I
7	FLIC_SHIFL	Flagellin: <i>Shigella flexneri</i>	488.923	1463.762	3	-10.12	19.91	20.0	K.ALDEAISSIDKFR.S
8	FLIC_SHIFL	Flagellin: <i>Shigella flexneri</i>	843.451	1684.8996	2	-7.18	20.54	105.2	K.IQVGVANDGQTITIDLK.K
9	FLIC_SHIFL	Flagellin: <i>Shigella flexneri</i>	640.315	1278.6456	2	-23.53	21.55	21.1	K.KIDSDTLGLNGF.N
10	FLIC_ECOLI	Flagellin: <i>Escherichia coli</i> K12	596.288	1190.5891	2	-23.21	12.93	62.8	K.NQSALSSSIER.L
11	FLIC_ECOLI	Flagellin: <i>Escherichia coli</i> K12	572.812	1143.6248	2	-13.39	13.73	55.3	L.SLITQNNINK.N
12	FLIC_ECOLI	Flagellin: <i>Escherichia coli</i> K12	720.909	1439.8096	2	-4.29	16.77	121.7	K.AQIIQQAGNSVLAK.A
13	FLIC_ECOLI	Flagellin: <i>Escherichia coli</i> K12	672.872	1343.7409	2	-8.49	17.57	74.5	N.SLSLITQNNINK.N
14	FLIC_ECOLI	Flagellin: <i>Escherichia coli</i> K12	750.357	2248.0931	3	-19.53	17.74	23.2	R.LDSAVTNLNNTTTNLSEAQSR.I

Using no taxonomic restriction ("all organisms"), the peptides were matched to flagellin from *Shigella flexneri* (accession number FLIC_SHIFL), whereas the *E. coli* flagellin (accession number FLIC_ECOLI) was returned from the database search when the taxonomy was restricted to *E. coli* only. Semitypsin with two missed cleavages was set as protease cleavage rule. Both proteins are largely homologous to each other with an identity value of 94% as calculated by Align Sequences Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Amino acid substitutions appear only at the C-terminus.

UV/Vis spectra of NP suspensions before and after treatment with flagellin are very similar to those obtained before and after cultivation with 'Ag-resistant' *E. coli* CCM 3954. The decrease in the intensity of the surface plasmon peak after adding flagellin is consistent with an aggregation process. Moreover, dynamic light scattering measurements revealed that the average size of the silver NPs increased from 28 nm to 480 nm immediately after the addition of flagellin because of silver aggregate formation. Similarly, the zeta potential of the NP suspensions decreased (in absolute value) from -28 mV to -6.2 mV, indicating that the repulsive forces between NPs became too weak to maintain them in a well-dispersed colloidal form.

To further demonstrate the crucial role of flagellin in the aggregation of silver NPs, an elemental mapping of silver aggregates attached to bacterial cells was performed using a high-resolution transmission electron microscope (HRTEM) equipped with a high-angle annular dark-field (HAADF) detector. Figure 5a,b clearly shows aggregates of silver NPs anchored on the surface of a bacterial cell. Chemical mapping analysis revealed the presence of typical

protein elements such as carbon, oxygen, nitrogen and sulfur on the surfaces of silver aggregates (Fig. 5). The absence of visible NPs inside the cell shown in Fig. 5c and d indicates that aggregates of silver NPs do not enter the bacterial cells. The HRTEM images also reveal the presence of a thin organic layer that probably consists of flagellin adsorbed on the surfaces of the silver aggregates (Fig. 5i,j and Supplementary Fig. 6). The elemental mapping confirmed the presence of the expected organic elements of flagellin (C, O, N and S) in this surface layer (Fig. 5k and Supplementary Fig. 6).

We then investigated whether the induced bacterial resistance to silver NPs is associated with genotypic or phenotypic changes. For this purpose, total genomic DNA from resistant and susceptible *E. coli* strains was analysed by whole-genome sequencing. Sequence alignments of susceptible and resistant strains did not reveal any statistically relevant nucleotide changes in the DNA for either flagellar gene that specify proteins forming the filament (*fliC*), the hook (*flgE*) and the capping protein (*fliD*), or in genes encoding the master transcriptional regulator FlhDC and the flagellar regulator FliA in the resistant strain. As an example that no statistically significant changes were observed between the genome sequences of *E. coli* strains susceptible and resistant to silver NPs, see Supplementary Fig. 7. For illustration purposes, a part of the *fliC* gene including the first 428 base pairs (bp) of the gene sequence (coordinates for reference sequence were 2,001,202–2,001,630 bp on the horizontal axis) was selected. No nucleotide differences between *E. coli* strains susceptible and resistant to silver NPs were observed. Coloured bands indicate only the changes of tested strains when compared with the reference sequence.

It therefore seems that the mechanism of silver NP resistance by flagellin secretion to induce aggregation developed without requiring any genetic change. This being the case, we considered ways of suppressing the developed resistance. It was concluded that an inhibitor of bacterial flagellin might inhibit the protein's production and thus prevent the aggregation process. Pomegranate rind extract (PGRE)

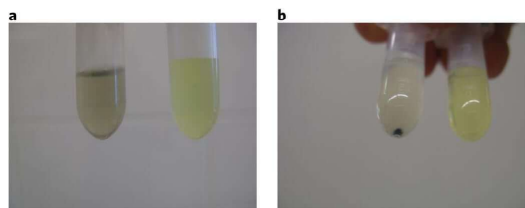


Fig. 4 | Effect of adding flagellin. The images demonstrate the immediate aggregation of silver NPs after adding commercial flagellin (a, left) and after 24 hours of interaction with silver NPs (b, left). The Eppendorf tube on the right side of each picture contains a stable colloidal dispersion of silver NPs with no added flagellin.

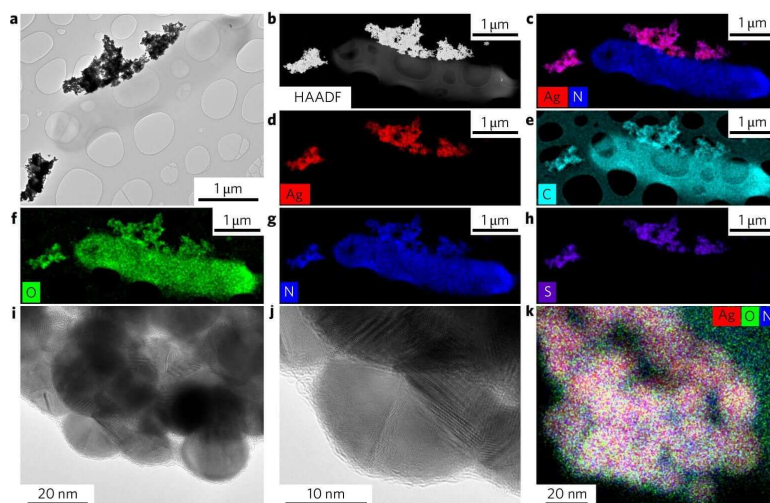


Fig. 5 | Chemical mapping analysis of silver aggregates in presence of bacteria. **a**, HRTEM image; **b**, HAADF image of silver aggregates on the surface of a bacterial cell. **c**, Combined chemical mapping of silver and nitrogen; **d–h**, single-element mapping of silver (**d**), carbon (**e**), oxygen (**f**), nitrogen (**g**) and sulfur (**h**). **i, j**, HRTEM images of silver aggregates showing the compact organic layer on the surface of the NPs. **k**, Combined chemical mapping of silver, oxygen and nitrogen.

is known to inhibit the production of bacterial flagellin³⁴, so we performed a final experiment in which the ‘Ag-resistant’ *E. coli* CCM 3954 and ‘Ag-resistant’ *E. coli* 013 strains were cultivated in the presence of silver NPs and a subinhibitory PGRE concentration of 0.6% (w/w) (the MIC of PGRE was determined to be 2.5% (w/w)). This eliminated the bacterial resistance to the silver NPs and restored the antibiotic activity of the NPs. More specifically, the MIC values for silver NPs towards ‘Ag-resistant’ *E. coli* CCM 3954 and ‘Ag-resistant’ *E. coli* 013 decreased from 54 mg l⁻¹ to 6.75 mg l⁻¹ and 13.5 mg l⁻¹, respectively. The value determined for ‘Ag-resistant’ *E. coli* CCM 3954 strain is close to the MIC for the original susceptible strain (3.38 mg l⁻¹) and for ‘Ag-resistant’ *E. coli* 013 is even the same.

The observed resistance to silver NPs is stable because the MIC for ‘Ag-resistant’ bacteria towards silver NPs remained steady at 108 mg l⁻¹ over six cultivation cycles (for more details on this experiment, see the procedure presented in the Supplementary Information). The bacteria thus retained their resistance to the NPs rather than reverting to a sensitive state over time. We therefore consider it reasonable to say they are resistant to silver NPs.

The stability of their resistance was further supported by a pomegranate extract test (for details, see the experimental procedure presented in the Supplementary Information). After incubating the resistant strain with a subinhibitory concentration of the extract, the MIC of silver NPs remained at 108 mg l⁻¹, suggesting that a restoration of susceptibility upon treatment with the extract can be ruled out. These two observations confirmed the resistance-like mechanism of ‘Ag-resistant’ strain to silver NPs.

A third line of evidence supporting a resistance-like mechanism was obtained by measuring the MIC of silver NPs and the minimum duration for killing of 99% (MDK99) for ‘Ag-susceptible’ *E. coli* CCM 3954 bacterial cells as described in ref.³⁵ (for information on the experimental protocol, see the Supplementary Information). Importantly, the ‘Ag-resistant’ strain’s MIC was substantially higher (with a stable value of 108 mg l⁻¹) than that for the ‘Ag-susceptible’ strain (3.38 mg l⁻¹). The MDK99 measurements (see Supplementary Fig. 8) indicate that there was no resistant subpopulation within

the tested ‘Ag-susceptible’ strain of *E. coli*. Moreover, the time–kill curves for different concentrations of silver NPs (prepared by serial dilution) clearly show that the killing effect is dose-dependent up to at least ten times the susceptible strain’s MIC. We can thus exclude the possibility of persistence or tolerance for the reference *E. coli* CCM 3954 upon treatment with silver NPs. In summary, our results clearly confirmed a resistance-like mechanism which is specific to one class of antibiotic—silver NPs and not silver ions—whereas tolerance often confers an advantage to several classes of antibiotic.

Conclusion

In summary, we have demonstrated that bacteria repeatedly exposed to subinhibitory concentrations of silver NPs can rapidly develop resistance to their antibiotic activity. This resistance is due to the production of flagellin, an adhesive protein of the bacterial flagellum, which causes the aggregation of silver NPs and thereby eliminates their antibacterial effect against Gram-negative bacteria. Importantly, the developed bacterial resistance can be suppressed by treatment with inhibitors of flagellin production such as PGRE. These findings clarify a mechanism that can drive bacterial resistance to antibacterial agents and will be useful in preventing bacterial drug resistance and the fight against infectious bacteria.

Methods

Methods, including statements of data availability and any associated accession codes and references, are available at <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0013-y>.

Received: 27 June 2016; Accepted: 4 October 2017;

Published online: 04 December 2017

References

1. Wong, K. K. Y. & Liu, X. L. Silver nanoparticles—the real ‘silver bullet’ in clinical medicine? *MedChemComm* **1**, 125–131 (2010).
2. Livermore, D. M. Fourteen years in resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **39**, 283–294 (2012).
3. May, M. Antibiotics. *Nature* **509**, S1 (2014).

4. Hede, K. An infectious arms race. *Nature* **509**, S2–S3 (2014).
5. Cui, L. et al. In situ study of the antibacterial activity and mechanism of action of silver nanoparticles by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* **85**, 5436–5443 (2013).
6. Lara, H. H., Ayala-Núñez, N. V., Ixtapan Turrent, L. del C. & Rodríguez Padilla, C. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 615–621 (2010).
7. Li, W.-R. et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *BioMetals* **24**, 135–141 (2011).
8. Morones, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **16**, 2346–2353 (2005).
9. Panáček, A. et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem. B* **110**, 16248–16253 (2006).
10. Panáček, A. et al. Strong and nonspecific synergistic antibacterial efficiency of antibiotics combined with silver nanoparticles at very low concentrations showing no cytotoxic effect. *Molecules* **21**, 26 (2016).
11. Panáček, A. et al. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **142**, 392–399 (2016).
12. Brown, A. N. et al. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 2768–2774 (2012).
13. Sharma, V. K., Yngard, R. A. & Lin, Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv. Colloid Interface Sci.* **145**, 83–96 (2009).
14. Morones-Ramirez, J. R., Winkler, J. A., Spina, C. S. & Collins, J. J. Silver enhances antibiotic activity against Gram-negative bacteria. *Sci. Transl. Med.* **5**, 190ra81 (2013).
15. Lemire, J. A., Harrison, J. J. & Turner, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 371–384 (2013).
16. Haefeli, C., Franklin, C. & Hardy, K. Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from a silver mine. *J. Bacteriol.* **158**, 389–392 (1984).
17. Li, X. Z., Nikaido, H. & Williams, K. E. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J. Bacteriol.* **179**, 6127–6132 (1997).
18. Gupta, A., Matsui, K., Lo, J.-F. & Silver, S. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat. Med.* **5**, 183–188 (1999).
19. Nies, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 313–339 (2003).
20. Silver, S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 341–353 (2003).
21. Silver, S., Phung, L. T. & Silver, G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 627–634 (2006).
22. Graves, J. L. Jr et al. Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. *Front. Genet.* **6**, 42 (2015).
23. Losasso, C. et al. Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different *Salmonella* serovars. *Front. Microbiol.* **5**, 227 (2014).
24. Gunawan, C., Teoh, W. Y., Marquis, C. P. & Amal, R. Induced adaptation of *Bacillus* sp. to antimicrobial nanosilver. *Small* **9**, 3554–3560 (2013).
25. Kvitěk, L. et al. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *J. Phys. Chem. C* **112**, 5825–5834 (2008).
26. Sivera, M. et al. Silver nanoparticles modified by gelatin with extraordinary pH stability and long-term antibacterial activity. *PLoS One* **9**, e103675 (2014).
27. Hunter, R. J. in *Foundations of Colloid Science* 2nd edn, 601–603 (Oxford Univ. Press, New York, 2001).
28. Bardy, S. L., Ng, S. Y. M. & Jarrell, K. F. Prokaryotic motility structures. *Microbiology* **149**, 295–304 (2003).
29. Metlina, A. L. Bacterial and archaeal flagella as prokaryotic motility organelles. *Biochemistry (Moscow)* **69**, 1203–1212 (2004).
30. Hayashi, F. et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099–1103 (2001).
31. Friedlander, R. S. et al. Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 5624–5629 (2013).
32. Haiko, J. & Westerlund-Wikström, B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology* **2**, 1242–1267 (2013).
33. Pratt, L. A. & Kolter, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* **30**, 285–293 (1998).
34. Asadishad, B., Hidalgo, G. & Tufenkji, N. Pomegranate materials inhibit flagellin gene expression and flagellar-propelled motility of uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073. *FEMS Microbiol. Lett.* **334**, 87–94 (2012).
35. Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. & Balaban, N. O. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 320–330 (2016).

Acknowledgements

We acknowledge the support provided by projects LO1305 and LM201507/3 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, the Czech Science Foundation (project no.15-22248S), the Ministry of Health of the Czech Republic (AZV VES 15-27726A) and the Internal Grants of Palacký University in Olomouc (IGA_Pf_2015_022 and IGA_LF_2016_022).

Author contributions

A.P. and L.K. conceived the project and designed the experiments dealing with synthesis of silver NPs. M.S. and R.P. carried out the experiments dealing with synthesis and stabilizations of silver NPs including their characterizations. R.V. and M.K. designed and carried out the microbiological experiments. M.R. carried out the experiments dealing with genomic analysis. F.D. and M.S. carried out the experiments dealing with proteomic analysis and viability tests. O.T. was responsible for HRTEM characterizations. R.Z. contributed clarifications and guidance on the manuscript. A.P. and R.Z. wrote the paper with input from all co-authors.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0013-y>.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Correspondence and requests for materials should be addressed to L.K. or R.Z.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Methods

Chemicals and biological material. Silver NPs were synthesized using silver nitrate (p.a., Fagron), ammonia (28–30% w/w, p.a., Sigma-Aldrich), sodium hydroxide (p.a., Lach-Ner) and D-maltose (p.a., Sigma-Aldrich). The following substances were used to stabilize the silver NPs: the sodium salt of polyacrylic acid (molecular weight 1,200 g mol⁻¹, Sigma-Aldrich), polyethylene glycol (molecular weight 35,000 g mol⁻¹, Sigma-Aldrich), gelatin (p.a., Sigma-Aldrich) and polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80; >98%, Sigma-Aldrich).

The bacterial strains used in this work were *E. coli* CCM 3954 and *P. aeruginosa* CCM 3955 obtained from the Czech Collection of Microorganisms (Masaryk University, Brno) and *E. coli* 013 obtained from the culture collection of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc. All microorganisms were stored in cryotubes (ITEST plus, Czech Republic) at -80 °C.

Synthesis and stabilization of silver NPs. The modified Tollens process involving reduction of the complex cation [Ag(NH₃)₂]⁺ by D-maltose was used to synthesize dispersions of silver NPs with a diameter of 28 nm and silver concentrations of 108 mg l⁻¹ or 432 mg l⁻¹. The concentrations of all the reaction components were as follows: silver nitrate 1 × 10⁻³ mol dm⁻³; ammonia 5 × 10⁻³ mol dm⁻³; sodium hydroxide 9.6 × 10⁻³ mol dm⁻³, and D-maltose (as a reducing agent) 1 × 10⁻³ mol dm⁻³. To prepare silver NP dispersions at a concentration of 432 mg l⁻¹, the concentrations of all the reaction components were increased fourfold except for that of sodium hydroxide, which was not changed. The reaction system was stirred continuously with a magnetic stirrer, and the reduction was initiated by injecting the reducing agent. After 5 minutes, the reaction was deemed complete, as indicated by the development of the dark yellow colour characteristic of silver NP dispersions. All syntheses were conducted at room temperature (approximately 23 °C). We initially performed antibacterial experiments using as-prepared dispersions of silver NPs synthesized by the modified Tollens process with a silver concentration of 108 mg l⁻¹. In a subsequent round of experiments, the dispersions were stabilized to increase the aggregation stability of silver NPs, enhancing their antibacterial effects against the tested bacterial strains. The dispersions were stabilized after synthesis by adding stock solutions of a sodium salt of polyacrylic acid, polyethylene glycol, gelatin or polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80) at final concentrations of 1% (w/w).

Characterization. The average size and zeta potential of the synthesized silver NPs were determined by the dynamic light scattering and electrophoretic mobility methods, respectively, using a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, UK). TEM measurements were conducted using a JEM 2010 instrument (JEOL, Japan). HRTEM images were obtained with a TITAN 60–300 (FEI, USA) with an X-FEG type emission gun, operating at 80 kV. This microscope was equipped with a Cs image corrector and HAADF scanning transmission electron microscopy (STEM). Elemental mappings were obtained by STEM energy-dispersive X-ray spectroscopy with an acquisition time of 20 min. Absorption spectra showing the surface plasmon peak of silver NPs were recorded using a Specord S 600 spectrophotometer (Analytik Jena, Germany).

Culture of bacteria in the presence of silver NPs. Bacteria were repeatedly exposed to subinhibitory concentrations of silver NPs by subjecting them to 20 successive culture steps in microplates. Repeated bacterial cultivations in the presence of silver NPs were done in triplicate. A dispersion of silver NPs or a solution of AgNO₃ with a silver concentration of 1 mmol l⁻¹ (108 mg l⁻¹ of silver) were diluted in a geometric progression with Mueller–Hinton broth (Becton, Dickinson and Company) and inoculated with a bacterial strain at a concentration of 10⁶ CFU ml⁻¹ (where CFU is colony-forming unit). The final tested silver concentrations were 54, 27, 13.5, 6.75, 3.38, 1.69 and 0.89 mg l⁻¹ for both silver NPs and AgNO₃. In each step, the bacteria were incubated with the silver salt or NPs at 37 °C for 24 hours. After each incubation, the MICs of the silver salt and NPs were determined as the lowest silver concentration that inhibited visible growth of the tested microorganisms. Immediately after each 24-hour cultivation period, 10 μl of Mueller–Hinton broth containing surviving bacteria was taken from the first three wells (if available) containing subinhibitory concentrations of silver (that is, concentrations below the MIC). Surviving bacteria from these wells were mixed and then subcultured on blood agar (TRIOS) at 37 °C for 24 hours. The bacteria thus grown were used for inoculum preparation at a density of 10⁶ CFU ml⁻¹ in the next culture step. The entire procedure described above, from the initial inoculation to the preparation of the new inoculum, was considered to constitute one culture step for the development of bacterial resistance. The final MICs of silver NPs against silver-resistant bacteria (after the 20th culture step) were determined by the same microdilution method using a dispersion of silver NPs with a silver concentration of 432 mg l⁻¹.

Growth inhibition of both 'Ag-susceptible' *E. coli* CCM 3954 and 'Ag-resistant' *E. coli* CCM 3954 strains by silver NPs was verified by culturing bacteria on an agar plate containing silver NPs at 35 °C for 24 hours. Dispersions of silver NPs were added to agar medium after autoclaving to achieve final silver concentrations of 20 and 40 mg l⁻¹ in 200 ml of agar medium, and the resulting agar was distributed into Petri dishes for bacterial cultivation.

Extraction and identification of proteins from precipitated nanoparticles. Silver aggregates were separated from 500 ml (10 × 50 ml) of bacterial suspension containing 27 mg of silver by centrifugation at 100g for 2 minutes. The pellet was washed once with distilled water and then suspended in 6 ml of distilled water to get a final silver concentration of 4.5 mg ml⁻¹. The suspension of precipitated silver aggregates was divided into four aliquots in 1.5-ml test tubes and centrifuged to allow removal of the liquid by aspiration. The pelleted aliquots were each individually incubated with 1 ml of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), 2.5% TFA, 2% NH₄OH or 5% NH₄OH for protein extraction. Extracts obtained after overnight incubation at 37 °C with shaking at 800 r.p.m., and the subsequent pelleting of the solid particles by a centrifugation at 20,000g for 20 min, were vacuum-dried and the recovered proteins were dissolved in 50 μl of 50 mM NH₄HCO₃ (facilitated by a 5-min sonication). Then, 1.5 μl of 200 μM modified trypsin was added for in-solution protein digestion, and the mixture was again incubated at 37 °C overnight. After vacuum drying, peptides from the digests were purified using ZipTip-C18 pipette tips (Merck-Millipore, Tullagreen-Carrigtwohill, Ireland) according to the manufacturer's instructions. Vacuum-dried peptide samples were dissolved in 10 μl of 0.1% TFA and separated using a Dionex UltiMate3000 RSLCnano liquid chromatograph (Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany)³⁶, coupled to an amaZon speed ETD ion trap equipped with a CaptiveSpray ion source (Bruker, Bremen, Germany). The scan speed was 8,100 u s⁻¹ for both MS and MS/MS, which means that the instrument provides a peak width of 0.3 u (where u stands for unified atomic mass unit) full width at half maximum (FWHM) and enhanced resolution. For comparison, a FWHM of 0.1 u would provide maximum resolution for 4+ ions. Acquisition was performed by collision-induced fragmentation using helium as the collision gas. MGF-formatted MS/MS data files were used to perform database searches with Mascot Server 2.4 (Matrix Science, London, UK) and the Swiss-Prot database. All parameters used in these searches are available in XLS-formatted Supplementary files containing the search results.

Bioinformatic and genomic analysis. Total genomic DNA from NP-susceptible and NP-resistant *E. coli* strains was isolated using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Germany) according to the manufacturer's recommendations. The concentration of DNA was measured by Qubit 3.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific). Samples of bacterial DNA (20 ng μl⁻¹) were sent to the laboratories of the Institute of Applied Biotechnologies (Prague, Czech Republic) for whole-genome sequencing. DNA libraries were constructed using the Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, USA). Whole-genome sequencing was performed on the MiSeq platform (Illumina).

All bioinformatic analyses were performed using the operating system Linux (Ubuntu 14.04 LTS) and the programming language Python. A quality control check of paired-end FASTQ files was performed as the first step. Bases with Phred quality scores below a pre-defined threshold (28) were filtered out. The quality control process also included a check for possible adapter contamination. The reference FASTA file was downloaded from the Illumina iGenomes and indexed by the Burrows–Wheeler Aligner (BWA; version 0.7.13; Li and Durbin, 2010). Paired-end FASTQ files were aligned against all indexed reference FASTA files using the BWA-MEM algorithm with minimum seed length 19, matching score 1, mismatch penalty 4, gap open penalty 6, and gap extension penalty 1. The generated sequence alignment/map (SAM) format was converted into binary form (BAM format) and sorted by coordinates. All corresponding samples were merged into one BAM file. Unmapped sequences reads and secondary mapping reads were filtered out from BAM files. The minimum and maximum read depths for a single base were 0 and 859, respectively. The mean read depth was 387,985. The algorithms SAMtools (version 0.1.18) and VarScan³⁷ were used for variant calling with the following parameters: minimum coverage 30, minimum mapping quality 10, minimum reads 4, minimum variant frequency 0.1 and *p*-value 0.05. In order to visualize a part of the genetic results, the data from next-generation sequencing (BAM files) were evaluated using the Integrative Genomics Viewer IGV version 2.3 (Broad Institute, Cambridge, UK). The genome sequence *E. coli* K12 MG 1655 (NC_000962) was selected as a reference sequence for alignment.

Pomegranate rind extract. Pomegranate extract was prepared as described in ref.³⁴. Briefly, pomegranate rind was cut into small pieces and dried at 50 °C for 24 h. Dry rind (15 g) was added to 200 ml of distilled water and placed in a shaker (at 80 r.p.m.) at laboratory temperature for 24 h. The crude extract was then filter-sterilized using Whatman No. 1 filter paper. A sample of the PGRE was freeze-dried to determine its dry weight content (20 g l⁻¹).

Life Sciences Reporting Summary. Further information on experimental design is available in the Life Sciences Reporting Summary.

Data availability. The data supporting the findings of this study are available within the article and its Supplementary Information files.

References

- Petrovská, B. et al. Proteomic analysis of barley cell nuclei purified by flow sorting. *Cytogenet. Genome Res.* **143**, 78–86 (2014).
- Koboldt, D. C. et al. VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics* **25**, 2283–2285 (2009).

Article

Strong and Nonspecific Synergistic Antibacterial Efficiency of Antibiotics Combined with Silver Nanoparticles at Very Low Concentrations Showing No Cytotoxic Effect

Aleš Panáček^{1,*}, Monika Smékalová¹, Martina Kílianová¹, Robert Pucek¹, Kateřina Bogdanová², Renata Večeřová², Milan Kolář², Markéta Havrdová³, Gražyna Anna Płaza⁴, Joanna Chojniak⁴, Radek Zbořil¹ and Libor Kvítek¹

Received: 1 October 2015 ; Accepted: 17 December 2015 ; Published: 28 December 2015

Academic Editor: Peter J. Rutledge

- ¹ Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, 17 listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic; monika.smekalova@centrum.cz (M.S.); KilianovaMartina@seznam.cz (M.K.); robert.pucek@upol.cz (R.P.); radek.zboril@upol.cz (R.Z.); libor.kvitek@upol.cz (L.K.)
 - ² Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University in Olomouc, Hněvotínská 5, 775 15 Olomouc, Czech Republic; katerina.bogdanova@upol.cz (K.B.); renata.vecerova@fnol.cz (R.V.); milan.kolar@fnol.cz (M.K.)
 - ³ Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Experimental Physics and Physical Chemistry, faculty of Science, Palacký University in Olomouc, 17 listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic; marketa.havrdova@upol.cz
 - ⁴ Department of Environmental Microbiology, Institute for Ecology of Industrial Areas, Kossutha 6, 40-844 Katowice, Poland; pla@ietu.katowice.pl (G.A.P.); chojniak.joanna@gmail.com (J.C.)
- * Correspondence: ales.panacek@upol.cz; Tel.: +42-058-563-4427; Fax: +42-058-563-4761

Abstract: The resistance of bacteria towards traditional antibiotics currently constitutes one of the most important health care issues with serious negative impacts in practice. Overcoming this issue can be achieved by using antibacterial agents with multimode antibacterial action. Silver nano-particles (AgNPs) are one of the well-known antibacterial substances showing such multimode antibacterial action. Therefore, AgNPs are suitable candidates for use in combinations with traditional antibiotics in order to improve their antibacterial action. In this work, a systematic study quantifying the synergistic effects of antibiotics with different modes of action and different chemical structures in combination with AgNPs against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* was performed. Employing the microdilution method as more suitable and reliable than the disc diffusion method, strong synergistic effects were shown for all tested antibiotics combined with AgNPs at very low concentrations of both antibiotics and AgNPs. No trends were observed for synergistic effects of antibiotics with different modes of action and different chemical structures in combination with AgNPs, indicating non-specific synergistic effects. Moreover, a very low amount of silver is needed for effective antibacterial action of the antibiotics, which represents an important finding for potential medical applications due to the negligible cytotoxic effect of AgNPs towards human cells at these concentration levels.

Keywords: silver nanoparticle; antibiotics; antibacterial; resistant bacteria; synergism; cytotoxicity

1. Introduction

An ever-increasing resistance of bacteria to the effects of existing antimicrobial agents is currently one of the most important health care issues with serious negative impacts such as higher morbidity

and mortality rates in patients with infections caused by multi-resistant bacteria [1,2]. Moreover, the development and spread of bacterial resistance through a mechanism based on transfer of genetic material from resistant bacterial cells via recombination processes (extra-chromosomal resistance) result in relentless spread of resistance to antibiotics independent of the consumption of antibiotics [3]. Given the fact that even rational antibiotic therapy cannot stop the growth and spread of bacterial resistance and can only slow and delay it, we are likely to witness the end of the antibiotic era in medicine.

An option to overcome bacterial resistance is the combination of selected penicillin antibiotics (e.g., ampicillin, amoxicillin or piperacillin) with bacterial β -lactamase inhibitors (clavulanic acid, sulbactam or tazobactam) [4–6]. However, such combinations of antibiotics and other substances blocking the defined bacterial mechanism of resistance are currently confronted with a marked increase in the resistance of numerous bacterial species, according to the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) [7]. Thus, if a novel antimicrobial drug under development is to be effective and free from bacterial resistance it must act at several cellular levels and not specifically like “traditional antibiotics”. The effect of silver, either as a metal (nanoparticles) or in compounds, is known to be not specific at a single level but to influence many bacterial structures and metabolic processes at the same time. Silver nanoparticles (AgNPs) were shown to inactivate bacterial enzymes [8,9], disrupt bacterial metabolic processes [10–12] and the bacterial cell wall, accumulate in the cytoplasmic membrane, increase its permeability [9,13,14], collapse the plasma membrane potential [12], interact with DNA [8], and generate reactive oxygen species [15–17], which damage biomacromolecules [18]. Thanks to their multi-level mode of action, AgNPs destroy or inhibit the growth of pathogenic microorganisms, including highly resistant bacterial strains (from units to several tens of mg/L) [13,14,19–22]. Therefore, AgNPs can be considered as a suitable candidate for combinations with antibiotics, posing no risk of bacterial resistance. No relevant data describing bacterial resistance to AgNPs or inactivation of antibacterial action of AgNPs have been published. Bacterial resistance to silver is observed only with ionic forms of silver and was disclosed in the works of Silver [23,24]. Bacteria resistant to ionic silver originated from clinical environments [25] and also naturally occurring strains [26]. Besides reduction of Ag^+ to a less toxic oxidation state, the probable Ag^+ resistance mechanism involves an active efflux from the cell by either P-type ATPases or chemiosmotic Ag^+/H^+ antiporters [27–29]. However, bacterial resistance to AgNPs has not been proven yet.

The synergy between AgNP and various antibacterial agents has been already studied in several works. Potara *et al.*, investigated the antimicrobial activity of chitosan-coated nanoparticles [30]. This combination of antimicrobials showed synergistic effects against two strains of *S. aureus*. MICs of the composites were approximately ten times lower than those of AgNP and chitosan alone. Another capping agent, myramistine, increased the activity of AgNP against *E. coli* up to 20-fold [31]. A combined treatment of lactoferrin/xylitol hydrogel and silver-based wound dressings acts synergistically against biofilms of clinical wound isolates of MRSA and *P. aeruginosa* [32]. Synergy evaluated with the help of fractional inhibitory concentration (FIC) index was observed against different Gram-negative bacteria when AgNPs were mixed with the membrane-permeabilizing antimicrobial peptides polymyxin B and gramicidin S [33].

Recently, several studies have indicated that AgNPs may strengthen the antibacterial effects of antibiotics against both susceptible and resistant bacteria, either additively or synergistically. The additive effect was shown in antibiotics of different mode of action against various bacterial strains [34–40]. However, this is only true if the concentrations of antibiotics and AgNPs reach their own minimum inhibitory concentrations (MICs), that is concentrations at which antimicrobial activity is achieved by the tested antibiotics or AgNPs alone, without being combined. So far, the actual synergistic effect of antibiotics and AgNPs at concentrations below their own effectiveness (*i.e.*, below MICs) has only been shown in a few studies on antibiotics combined with AgNPs [36,41–44]. Brown *et al.*, showed a synergistic effect of not only AgNPs, but also gold nanoparticles functionalized with ampicillin, even against multi-resistant strains such as multiple-antibiotic-resistant isolates

of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [45]. Nevertheless these findings clearly suggest that it would be feasible to find an effective combination of an antibiotic and another antimicrobial with a multi-level mode of action, resulting in a synergistic antimicrobial effect allowing efficient inhibition of bacterial pathogens using significantly lower doses as compared with an antibiotic alone.

Consistent with that finding, this study is the first to provide a systematic analysis quantifying the synergistic effects of antibiotics classified into groups according to their mechanism of action in combination with AgNPs against numerous pathogenic microorganisms such as Gram-negative or Gram-positive bacteria, representing some of the most important pathogens currently encountered in medical practice. Moreover, the synergistic effect was confirmed for all antibiotics tested in this study, irrespective of their mode of action. Relative to higher concentrations of antibiotics equal to units of mg/L needed in the absence of AgNP in treatment of infections, the achieved MICs for such combinations of antibiotics (as low as 10^{-4} mg/L) and AgNPs (up to several mg/L) may decrease the toxic burden for patients if applied in clinical practice.

2. Results and Discussion

2.1. Synthesis of Silver Nanoparticles

The modified Tollens process involving reduction of the $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ cation by D-maltose was used as a well-known, reliable and reproducible procedure for the preparation of AgNPs with a diameter of 26 nm and a narrow size distribution [46]. The size of 26 nm and narrow size distribution of the AgNPs documented by the lognormal size distribution curve obtained from DLS measurements were confirmed employing TEM (Figure 1a). In the UV-Vis absorption spectra of the synthesized AgNPs, a narrow surface plasmon absorption peak located at a wavelength of 410 nm also indicated the presence of nanometer-sized AgNPs (Figure 1c). Zeta potential value of -28 mV ensures high aggregation stability of such prepared AgNPs in aqueous dispersion. Non-aggregated and well separated AgNPs are seen in the TEM image (Figure 1b).

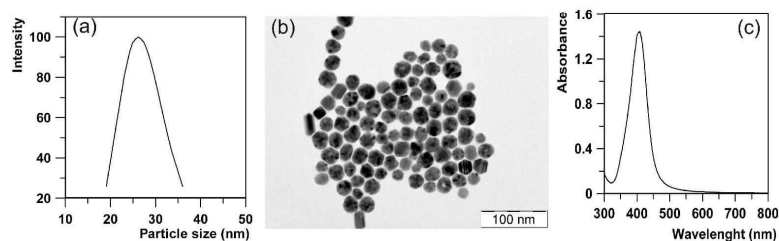


Figure 1. (a) Lognormal size distribution obtained from DLS measurements; (b) TEM image and (c) UV-Vis absorption spectra of AgNPs with diameter of 26 nm and narrow size distribution.

2.2. Synergistic Effect of Antibiotics and Silver Nanoparticles

The synergistic effect of AgNPs combined with antibiotics against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, namely *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, was evaluated using the standard microdilution method to determine the MICs of the used antibiotics combined with AgNPs at different silver concentrations. For determination of the synergistic effects, AgNPs at very low concentrations of silver (under their MICs, *i.e.*, concentrations for which AgNPs did not exhibit antibacterial activity) were used against the tested bacteria to exclude any growth inhibitory effect of the AgNPs against the bacteria. The concentrations of silver used for the tests were 5, 2.5, 1.25 and 0.6 mg/L depending on the bacterial strain used. A broad spectrum of antibiotics was used in this study to observe whether the synergistic effect is specific or non-specific for antibiotics with

different modes of action and different chemical structures. Therefore, in total more than 20 different antimicrobial substances of different modes of action and chemical structures were used (Table 1).

Table 1. The used antibiotics and their abbreviations divided into four groups based on their mode of action.

Inhibition of Cell Wall Synthesis	Inhibition of Protein Synthesis	Inhibition of Nucleic Acid Synthesis	Alteration in Cytoplasmic Membrane
Ampicillin (AMP) ^a	Gentamicin (GEN) ^f	Oxolinic acid (OXO) ^k	Colistin (COL) ^m
Ampicillin/sulbactam (AMS) ^a	Tetracycline (TET) ^g	Ofloxacin (OFL) ^k	
Piperacillin (PIP) ^a	Amikacin (AMI) ^f	Ciprofloxacin (CIP) ^k	
Piperacillin/tazobactam (PPT) ^a	Chloramphenicol (CMP) ^h	Co-trimoxazole (COT) ^l	
Penicillin (PEN) ^a	Erythromycin (ERY) ⁱ		
Oxacillin (OXA) ^a	Clindamycin (CLI) ^j		
Cefazolin (CZL) ^b			
Cefuroxime (CRX) ^b			
Cefoxitin (CXT) ^b			
Cefepime (CPM) ^b			
Cefoperazone (CPR) ^b			
Ceftazidime (CTZ) ^b			
Meropenem (MER) ^c			
Teicoplanin (TEI) ^d			
Vancomycin (VAN) ^d			
Aztreonam (AZT) ^e			

Antibiotic categories based on their chemical structure: ^(a) penicillins; ^(b) cephalosporins; ^(c) carbapenems; ^(d) glycopeptides; ^(e) monobactams; ^(f) aminoglycosides; ^(g) tetracyclines; ^(h) amphenicols; ⁽ⁱ⁾ macrolides; ^(l) lincosamides; ^(k) quinolones; ^(j) sulfonamides; ^(m) polypeptides.

As seen from Tables 2–4 summarizing MICs of the used antibiotics alone and in combination with AgNPs, synergistic effects of antibiotics and AgNPs were shown for all antibiotics used and all bacterial strains. Strong synergistic effects of antibiotics and AgNPs against *Escherichia coli* were proven for silver concentrations of 5 and 2.5 mg/L. At these silver concentrations, the MICs of antibiotics were mostly two and three orders of magnitude lower than those of the non-combined (pure) antibiotics. For lower silver concentrations, the synergistic effect was observable for GEN, COL and OFL, with MICs more than twice as low as the MICs of the antibiotics alone. The fact that GEN, COL and OFL showed synergistic activity at the lowest silver concentration was apparently because of high susceptibility of *Escherichia coli* to these antibiotics. MICs of pure GEN, COL and OFL antibiotics against *Escherichia coli* were very low, under 1 mg/L. On the other hand, OXO and AZT also had MICs against *Escherichia coli* under 1 mg/L. However, the synergistic effects of these antibiotics were not observed at the lowest silver concentration. A very surprising and unexpected finding was observed in the case of the synergistic effect of AMP combined with AgNPs. AMP alone showed no antibacterial activity against *Escherichia coli*, even at the highest concentration equal to 32 mg/L, due to the resistance of *Escherichia coli* to this antibiotic. According to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing database, the AMP breakpoint against *Escherichia coli* is 8 mg/L and MICs higher than the breakpoint imply bacterial resistance [47]. It is evident from the obtained results that combination of AMP with AgNPs restores its antibacterial activity. A low concentration of silver is sufficient to restore the susceptibility of *Escherichia coli* to AMP.

The synergistic efficiency of antibiotics and AgNPs against *Pseudomonas aeruginosa* was similar to that against *Escherichia coli*. The MICs of antibiotics combined with AgNPs were two to three orders of magnitude lower for the highest silver concentrations (5 mg/L and 2.5 mg/L). In case of lower silver concentrations, the synergistic effect was observed for MER, GEN and COL (MIC more than twice as low when combined with AgNPs). The explanation is similar to that in the case of *Escherichia coli*; MER, GEN and COL are also antibiotics with high antibacterial activity showing low MICs against *Pseudomonas aeruginosa*.

Table 2. MICs of antibiotics (mg/L) in combination with AgNPs at different silver concentrations below the MIC of AgNPs (7.5 mg/L) against *Escherichia coli* CCM 4225.

	AMP	AMS	CZL	CRX	CXT	GEN	COT	COL	O XO	OFL	TEI	AZT
ATB + 0 mg/L AgNPs	-	8	2	1	1	0.5	4	0.5	0.5	0.03	4	0.03
ATB + 0.6 mg/L AgNPs	-	8	2	1	1	0.03	2	0.125	0.5	0.015	4	0.03
ATB + 1.25 mg/L AgNPs	-	8	2	1	1	0.06	2	0.125	0.5	0.015	2	0.03
ATB + 2.5 mg/L AgNPs	0.03	0.03	0.0019	0.00097	0.00097	0.00048	2	0.00097	0.5	0.00024	1	0.0078
ATB + 5 mg/L AgNPs	0.00097	0.00097	0.00097	0.00097	0.00097	0.00048	0.0019	0.00048	0.00097	0.00024	0.00048	0.0019

Table 3. MICs of antibiotics (mg/L) in combination with AgNPs at different silver concentrations below the MIC of AgNPs (7.5 mg/L) against *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955.

	PIP	PPT	AZT	MER	CTZ	CPR	CPM	GEN	AMI	COL	OFL	CIP
ATB + 0 mg/L AgNPs	4	4	4	1	1	4	2	0.25	1	0.5	1	0.125
ATB + 0.6 mg/L AgNPs	4	4	4	1	1	4	1	0.03	0.25	0.125	1	0.03
ATB + 1.25 mg/L AgNPs	2	4	4	0.5	1	4	1	0.015	0.25	0.06	1	0.03
ATB + 2.5 mg/L AgNPs	0.015	0.0039	0.00097	0.0019	0.00024	0.00048	0.00024	0.00048	0.00048	0.00048	0.00024	0.00024
ATB + 5 mg/L AgNPs	0.0078	0.0039	0.00097	0.0019	0.00024	0.00048	0.00024	0.00048	0.00048	0.00048	0.00024	0.00024

Table 4. MICs of antibiotics (mg/L) in combination with AgNPs at different silver concentrations below the MIC of AgNPs (5 mg/L) against *Staphylococcus aureus* CCM 4223.

	PEN	OXA	AMS	CMP	TEI	COT	ERY	CLI	CIP	GEN	TEI	VAN
ATB + 0 mg/L AgNPs	0.125	0.25	0.5	4	0.25	1	0.125	0.125	0.25	0.25	0.25	1
ATB + 0.6 mg/L AgNPs	0.015	0.25	0.125	4	0.015	0.03	0.06	0.015	0.03	0.25	0.03	0.03
ATB + 1.25 mg/L AgNPs	0.015	0.03	0.06	2	0.015	0.0078	0.06	0.015	0.015	0.06	0.015	0.00097
ATB + 2.5 mg/L AgNPs	0.00006	0.00048	0.00048	0.00048	0.00012	0.0019	0.00012	0.00012	0.00012	0.00048	0.00097	0.00048

Staphylococcus aureus was more susceptible to AgNPs than the other bacteria used in this work, with the MIC of AgNPs being 5 mg/L. The higher sensitivity of *Staphylococcus aureus* to AgNPs translated into stronger synergistic effects. The highest used silver concentrations (2.5 mg/L of silver) lead to the highest decrease of the MICs of the antibiotics, again of two to three orders of magnitude. With a silver concentration of 1.25 mg/L, synergistic effects, albeit not strong, were observed for nearly all tested antibiotics, with their MICs being decreased by approximately one order of magnitude. Indeed, unlike in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* bacterial strains, the synergistic effect was more frequently observable at the lowest used silver concentration (0.6 mg/L). While the synergistic effects at the lowest used silver concentration were observable for only three antibiotics (GEN, COL and OFL and MER, GEN and COL) in case of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, there were synergistic effects for nine antibiotics in the case of *Staphylococcus aureus* (PEN, AMS, TET, COT, ERY, CLI, CIP, TEI and VAN), with their MICs being more than twice as low as MICs of the antibiotics alone. The reason for most tested antibiotics showing synergistic effects at the lowest silver concentrations is the low MICs of these antibiotics in the tested *Staphylococcus aureus* strain.

2.3. Cytotoxicity of Silver Antibiotics, Nanoparticles and Their Combinations

Cytotoxicity was evaluated for antibiotics selected from groups representing antibiotics with different modes of action. Overall ten antibiotics were tested separately and in combination with AgNPs to determine their LD₅₀ toxicity index. Cytotoxicity of antibiotics and AgNPs was also determined at concentrations equal to their original MIC value obtained in the antibacterial assay (Table 5).

Table 5. Concentrations of silver NPs and antibiotics used in cytotoxicity determination.

AgNPs/ATB	Corresponding to MIC (mg/L)	Below MIC (mg/L)
Ag NPs	7.5	2.5
AMS	8	0.003
CZL	2	0.0019
MER	1	0.0019
CMP	4	0.00048
GEN	0.5	-
VAN	1	-
TET	4	-
CIP	0.25	-
COT	4	-
COL	0.5	-

The LD₅₀ values of the antibiotics themselves varied from 120 to 250 mg/L depending on the tested antibiotic (Table 6). When combined with AgNPs at concentrations of 7.5 mg/L and 15 mg/L respectively, the LD₅₀ toxicity index of the antibiotics decreased and ranged from 90 mg/L to 180 mg/L and 80 mg/L to 150 mg/L, respectively. In the case of cytotoxicity evaluation at concentrations equal to MIC values, the antibiotics themselves only slightly inhibited the viability of cells; in most cases, the viability of cells treated with antibiotics decreased slightly to 90%–80% compared to that shown by untreated control cells (Figure 2). In the case of AMS and MER, the viability of cells was 78% and 77%, which still represents only a slight decrease in viability. Moreover, AgNPs themselves at the concentration corresponding to MIC only slightly inhibited the viability of cells down to 82% in comparison with control cells. The LD₅₀ toxicity index of AgNPs was determined at the concentration of 30 mg/L. When antibiotics were combined with AgNPs, the viability of cells decreased from 85% to 71% compared to the control cells. The cytotoxic effect was higher as a result of the additive cytotoxic effects of the antibiotics and AgNPs. The highest cytotoxic effect was detected for the antibiotics AMS, CZL, MER and CMP combined with AgNPs; for those, the viability of cells decreased down to 71%, 73%, 72% and 73%, respectively. Combinations of antibiotics and AgNPs showing the highest

inhibition of cell's viability at concentrations equal to their MIC were used in further cytotoxicity tests at lower concentrations below their MIC, but still showing high antibacterial activity. Using these low concentrations of AMS, MER, CZL and CMP antibiotics and AgNPs themselves (not in combination), no inhibition of cell viability was observed in comparison with the control cells. When antibiotics were combined with silver NPs, the viability of cells only decreased to 90%–95% in comparison with the control cells depending on the antibiotics used (Figure 3).

Table 6. LD₅₀ toxicity index (mg/L) of antibiotics alone and in combination with AgNPs at concentration of 7.5 mg/L and 15 mg/L respectively.

	AMS	CZL	MER	CMP	GEN	VAN	TET	CIP	COT	COL
ATB + 0 mg/L AgNPs	160	200	250	200	250	200	200	120	120	120
ATB + 7.5 mg/L AgNPs	100	130	180	150	180	150	180	100	100	100
ATB + 15 mg/L AgNPs	80	90	130	100	150	100	150	90	90	80

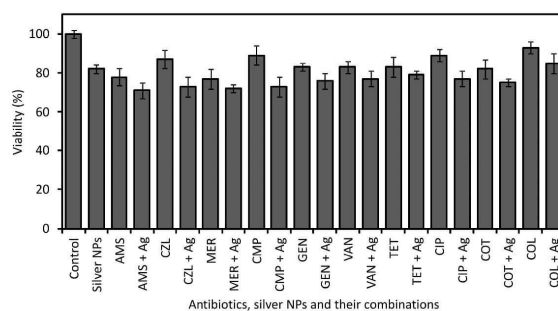


Figure 2. Viability of cells treated with antibiotics, silver NPs and their combinations using concentrations corresponding to the MIC value.

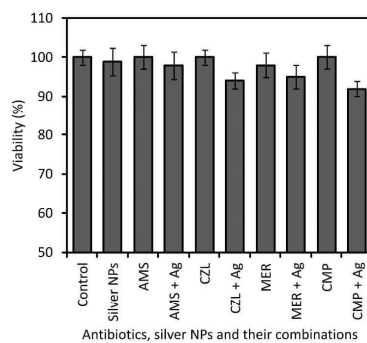


Figure 3. Viability of cells treated with antibiotics, silver NPs and their combinations using concentrations below the MIC value.

2.4. Discussion

AgNPs prepared using the modified Tollen's process show a high aggregation and sedimentation stability themselves in aqueous dispersion (for up to several years) because of their high zeta potential

value of -28 mV, ensuring sufficient repulsion between AgNPs. On the other hand, the prepared AgNPs had to be stabilized prior to the determination of synergistic effects with antibiotics because when non-stabilized AgNPs were added to the used culture media at a ratio of 1:1 (final silver concentration of 54 mg/L), partial aggregation was observed and monitored by DLS measurements and UV-Vis spectra. Aggregation of AgNPs and presence of aggregates lead to an increase in the average particle size from 28 to 85 nm. Also changes in absorption spectra typical for partial aggregation process of AgNPs such as a decrease in the absorption peak located at a wavelength of 410 nm (primary maximum) and emergence of a secondary absorption peak at 550 nm [19] were observed (Figure 4a). As well, the original negative zeta potential value of -28 mV decreased to -13 mV when AgNPs were mixed with the culture media. The decreases in the zeta potential value and subsequent partial aggregation process of AgNPs were induced by cations present in the culture media. Generally, AgNPs aggregate easily in environments with a high ionic strength, particularly when multivalent cations are presented. Oppositely charged cations are attracted to the AgNPs surface having negative surface charge and consequently decrease or eliminate completely their negative zeta potential. AgNPs with decreased or eliminated surface charge are not able to sufficiently repulse each other which lead to their approach, attachment, and consequently aggregation and sedimentation in media with a high ionic strength. The absorbance decrease of the primary maximum is viewed as a consequence of particle approach followed by their close joining and partial aggregation (Figure 4b). At the same time, a new secondary maximum peak emerged at a wavelength of 550 nm as a consequence of partial particle aggregation.

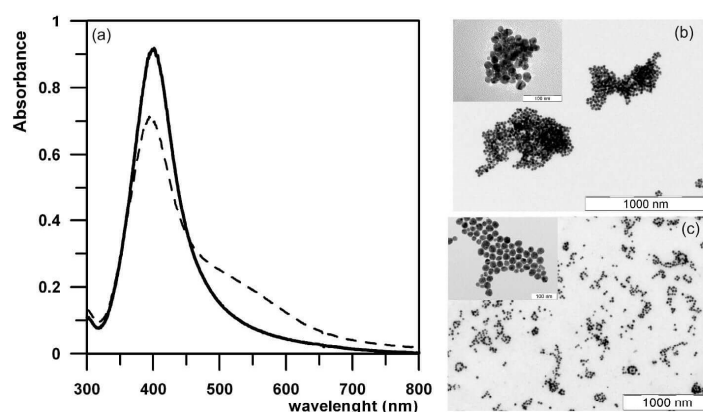


Figure 4. (a) UV-Vis absorption spectra of gelatin-stabilized (full line) and non-stabilized (dashed line) AgNPs dispersed in a culture medium at a ratio of 1:1; (b) TEM images of non-stabilized and (c) gelatin stabilized AgNPs.

Therefore, AgNPs were stabilized with gelatin added at a very low concentration of 0.05% as an effective and non-toxic (natural) stabilizing substance. The gelatin was added after the synthesis of AgNPs (after the reduction process) so that gelatin did not affect this process and the particle characteristics of AgNPs such as size and size distribution. Such a low gelatin concentration added after the synthesis of AgNPs has no effect on particle size as well as particle size distribution as confirmed by DLS and TEM measurements. The diameter of gelatin-stabilized AgNPs and their particle size distribution was unchanged compared to as-prepared non-stabilized AgNPs. No aggregation process occurred based on the results from DLS measurements, TEM characterization, and UV-Vis absorption spectrometry measurements when gelatin-stabilized AgNPs were mixed with culture media. The particle diameter of 26 nm and the location of the surface plasmon peak at a wavelength of 410 nm were

unchanged when gelatin-stabilized AgNPs were added to the used culture media with no evidence of particle aggregation in the TEM images. TEM images of aggregated (non-stabilized) as well as non-aggregated AgNPs stabilized by 0.05% gelatin are shown in Figure 4. Non-stabilized AgNPs formed larger aggregates of several hundreds of nanometers in diameter as documented by the TEM images (Figure 4b). On the other hand, gelatin-stabilized AgNPs did not form any larger aggregates and they were still separated (Figure 4c). A control sample containing only 0.05% gelatin did not reveal antibacterial activity and the addition of the same amount of gelatin had no effect on the antibacterial efficiency of the antibiotics used.

No data have been previously published concerning such a strong synergistic effect of a broad spectrum of antibiotics and well characterized AgNPs at such low concentrations below their own MICs explored by the microdilution method. Most studies on the synergistic effects of antibiotics and AgNPs have been done using silver and/or antibiotic concentrations equal to or higher than their individual MICs. Moreover, this combined antibacterial effect was more additive than synergistic (multiple) and was not proved for all antibiotics involved in the studies [35,37–40]. The inhibition zone areas of the tested bacteria around discs containing particular antibiotics and AgNPs were in most cases only few millimeters larger. Moreover, the used disk diffusion method based on diffusion of antibiotic-AgNPs combinations in Muller-Hinton agar is not suitable and optimal given the lower diffusion ability of AgNPs which can result in a limitation of the synergistic effect. Only Gosh *et al.*, used AgNPs in concentrations lower than their own MICs in some cases combined with antibiotics at concentrations higher than their MIC and observed enhanced antibacterial activity for several combinations using the disc diffusion method [36].

In this work, the microdilution method was used for evaluation of synergistic effects of antibiotics and AgNPs as it is more suitable and reliable, especially with respect to specific properties of colloids and nanoscale materials such as diffusion and aggregation stability in dispersion media. The microdilution method is not limited by the diffusion ability of the tested compounds to the extent that the disk diffusion method is. Moreover, gelatin-stabilized AgNPs were stable and did not aggregate. Therefore, using this microdilution method, strong synergistic effects were shown for all tested antibiotics combined with AgNPs at very low concentrations of both antibiotics and AgNPs. On contrary, in the disk diffusion test, the aggregation stability of AgNPs can be affected after disk impregnation and also certain amounts of AgNPs may stay adsorbed on the paper disk. This can result in a lower antibacterial effect of the AgNPs and, given the limited diffusion of AgNPs, the final synergistic effect of antibiotics and AgNPs could be lower or non-existent.

Works using the microdilution method to prove the synergistic effects of antibiotics combined with AgNPs at concentrations under their own MICs were published by Li, Markowska and Singh [42–44]. Li reported preliminary results concerning the synergistic effect of amoxicillin and AgNPs against *Escherichia coli*. Although amoxicillin was not included in this study, the synergistic effect can be compared to that of ampicillin which is closely related to amoxicillin based on their similar chemical structure, mode of action and use for treatment of infections. Li *et al.*, reported high synergistic effects of amoxicillin combined with AgNPs at concentrations of 0.15 g/L of amoxicillin and 5 mg/L of AgNPs. In this study we report stronger synergistic effects of the related antibiotic ampicillin combined with AgNPs at lower concentrations of 0.03 mg/L of ampicillin and 2.5 mg/L of silver [42]. In the work by Singh, the enhancement of antibiotics' efficiency combined with AgNPs was also proved only for β -lactam antibiotics [44]. In the work by Markowska, the synergetic effect was proved for ampicillin, streptomycin, rifampicin, and tetracycline [43]. Combinations of AgNPs with oxacillin, ciprofloxacin, meropenem, and ceftazidime showed no synergetic effect. In our study we proved a synergistic effect of a broader spectrum of antibiotics with different modes of action and chemical structures against bacterial strains used for microdilution tests. Moreover, our results clearly demonstrate that antibiotic-resistant bacteria become susceptible again when an antibiotic is combined with AgNPs as proved in case of the synergistic effect of ampicillin with AgNPs against *Escherichia coli*. This phenomenon was also recently published in articles by Singh and

Brown [44,45]. Brown *et al.*, reported that AgNPs functionalized with ampicillin were effective against ampicillin-resistant *Escherichia coli* [45].

The mechanisms leading to enhancement in bacteria sensitivity towards antibiotics combined with AgNPs or even to restoration of sensitivity of bacteria originally resistant to antibiotics can be of various nature taking into account the multiple mode of action of AgNPs (AgNPs destroy bacteria by several mechanisms). AgNPs and antibiotics inhibiting synthesis of a cell wall can cooperate together promoting disturbance of the cell wall or direct damage of the cell wall. AgNPs could facilitate transport of hydrophilic antibiotics to the cell surface; increase in permeability of the membrane by AgNPs would help antibiotics to enter into the cells more easily. Inhibition of the activity of bacterial enzymes responsible for bacterial resistance could be another possible mechanism responsible for restoring of antibacterial activity of antibiotics. Enzymes produced by resistant bacteria such as β -lactamase, carbapenemase and others can be coated or bind on nanoparticle surfaces resulting in a change/modification of their structure. After that, enzymes become inactivated and enzymatic mediated hydrolysis of antibiotics cannot proceed. Enzymatic activity can be also inhibited by ionic silver released from AgNPs.

Another interesting and important fact observed in this work was that the synergistic effects of all used antibiotics in combination with AgNPs against both Gram-negative and Gram-positive bacteria were similar. Significantly higher or lower antibacterial effects against bacteria were observed for none of the used antibiotics and for none of the tested bacterial strains. Therefore, the difference in cell wall composition between Gram-negative and Gram-positive bacteria has no influence on the synergistic efficiency. No trends were observed for the synergistic effects of antibiotics with different modes of action and different chemical structures in combination with AgNPs against the tested bacteria, indicating non-specific synergistic effects of antibiotics in combination with AgNPs. It may be concluded that AgNPs do not affect bacteria by one specific mode of action such as damaging the bacterial cell wall or inhibiting proteosynthesis and nucleic acid synthesis which should result in stronger synergistic effects for antibiotics with certain modes of action. It is known that AgNPs change membrane permeability [48], collapse the plasma membrane potential [12], accumulate in the membrane and leads to formation of "pits" in the cell wall [14]. Furthermore, AgNPs influence the metabolic processes of purine and inhibit enzymes such as tryptophanase or respiratory chain dehydrogenase thereby destroying important metabolic pathways of the bacteria [8–10,48]. Under aerobic conditions, silver ions are released from nanoparticles, they enter into the cells and subsequently generate reactive oxygen species (ROS), which damage DNA, RNA, proteins and lipids [18]. Zhang *et al.*, exploited this property and they developed nanostructured Ag/Cu composite with superior antibacterial activity. Metal oxides created in the thermal oxidation process on surface release silver ions more readily than zerovalent silver because of higher solubility of the oxides in water [49]. Due to their multiple modes of action, AgNPs attack bacteria by several mechanisms which lead to overall attenuation of the bacteria which cannot be so resistant to antibiotics. The non-specific antibacterial activity of AgNPs is important and significant for preventing the development of bacterial resistance to both AgNPs and preparations combining antibiotics and AgNPs.

It is known that the antibacterial activity of AgNPs strongly depends on their size, shape and surface modification by various capping agents [13,19,21,49–53]. The antibacterial activity of AgNPs increases with decreasing nanoparticle diameter [13,21,49]; anisotropic AgNPs such as triangular or hexagonal AgNPs show better antibacterial effect than spherical and rod-shaped AgNPs [51–53]. Surface modification of AgNPs by various capping agents such as polymer substances or surface active agents is generally used to enhance their aggregation stability or biological interactions with bacteria which consequently leads to enhancement of antibacterial activity of capped AgNPs. [19]. If these three key parameters (size, shape, and surface modification) directly influence the antibacterial activity of AgNPs themselves, they also similarly influence the synergistic effects of AgNPs combined with antibiotics. The role of size in synergistic effect of AgNPs combined with antibiotics was described in the works by Habash *et al.*, and Kareem *et al.* [54,55]. Habash *et al.*, evaluated synergistic effect

using fractional inhibitory concentration index for 10 nm and 20 nm sized AgNPs combined with aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* where 40 nm, 60 nm, and 100 nm sized AgNPs showed no interaction when combined with antibiotic against the tested bacteria [54]. Kareem *et al.*, also proved a better synergic antibacterial effect for 10 nm sized AgNPs compared to 20 nm sized ones combined with various antibiotics against *Staphylococcus aureus*. [55]. The effect of capping agents such as citrate, sodium dodecyl sulfate (SDS), and polyvinylpyrrolidone (PVP) on the synergistic effect of AgNPs combined with antibiotics was investigated in the work by Kora *et al.* [56]. Their results proved a synergistic effect for all the stabilized AgNPs combined with streptomycin, ampicillin, and tetracycline against Gram-negative and Gram-positive bacteria. The combined effect of capped AgNPs and antibiotics was more prominent with PVP-capped AgNPs as compared to citrate- and SDS-capped ones. Experimental data related to synergistic effects of AgNPs with various shapes combined with antibiotics have not been reported yet in the scientific literature, however, it can be presumed, based on the different antibacterial efficiency of AgNPs with various shapes that synergistic effect will also vary with AgNPs of different shapes.

The absence of adverse cytotoxic effects is important for potential medical applications of preparations or medical devices comprising combinations of antibiotics and AgNPs which could be used in treatment of local infections or production of antibacterial catheters, prostheses, vascular grafts *etc.* It may be assumed that prevention or treatment of infections would be more effective as strong synergistic antibacterial effects of antibiotics combined with AgNPs occurred at very low concentrations of both antimicrobial substances, minimizing the risk of side toxic effects. In this work, a very low concentration, equal to units or tenths of mg/L of both AgNPs and antibiotics themselves and in combinations, is needed for sufficient antibacterial effect; such low concentrations do not show cytotoxic effect to the NIH/3T3 cells. None of the tested antibiotics at concentrations corresponding to their MIC showed toxic effects. A toxicity index, LD₅₀, was not proven for any of the tested antibiotics at a concentration equal to their MIC, and only a slight decrease of the viability in the range from 90% to 77% depending on the antibiotic used was observed. The LD₅₀ toxicity index of antibiotics was determined at high concentrations ranging from 120 to 250 mg/L depending on the tested antibiotic. In addition, AgNPs themselves did not show cytotoxic effects to the tested cells at concentrations equal to their MIC (7.5 mg/L). The LD₅₀ toxicity index of AgNPs was determined at the concentration of 30 mg/L. When antibiotics were combined with AgNPs and applied at concentrations equal to their MIC, the viability of the cells decreased from 85% to 75% compared to the control cells, except for the antibiotics AMS, MER, CZL, and CMP combined with AgNPs, for which the viability of the cells decreased down to 71%, 73%, 72% and 73%, respectively. In the case of AMS combined with AgNPs, the highest decrease in the viability to 71% do not reach the LD₅₀ index and, thus, such a combination revealing the highest decrease in the viability does not show a cytotoxic effect. The LD₅₀ toxicity indexes of antibiotics combined with 7.5 mg/L and 15 mg/L of AgNPs was determined at high concentrations ranging from 90 mg/L to 180 mg/L and 80 mg/L to 150 mg/L, respectively. When antibiotics were combined with AgNPs at concentrations below their MIC, which is still sufficient for strong antibacterial effect, the viability of the cells decreased very slightly to 90%–95% in comparison with the control cells, depending on the antibiotics used. Such a negligible inhibition of the cell's viability is not regarded to have any cytotoxic effect.

AgNPs themselves at concentrations below 30 mg/L do not also display a cytotoxic effect to human cells or blood as well as to environmentally important organisms as was proved in earlier studies [20,57–59]. Moreover, Richter *et al.*, came up with a solution to the persistence of AgNPs in the environment and created nanoparticles with biodegradable lignin cores loaded with silver ions and coated with a cationic polyelectrolyte layer. Such nanoparticles lose their post-utilization antibacterial activity because of depletion of the silver ions, thereby minimizing their environmental impact [60]. In other study by Munger *et al.*, no *in vivo* toxicity effects of commercial AgNP to humans were observed. No clinically important changes in metabolic, urine, hematologic, physical findings or imaging morphology were noted after 14 days of exposure to 10 and 32 ppm of AgNPs, indicating that

exposure to low doses of AgNPs has no adverse or toxic effects to humans [61]. Recently, several papers focusing on *in vivo* experiments evaluating toxicity and adverse effects of AgNPs using experimental animals have been published [62–68]. The obtained data related to the adverse and toxic effects of AgNPs vary strongly in each scientific paper and the final conclusions are still controversial. Generally, oral exposures to AgNP cause weight loss, inflammatory and immune responses, hepatic changes, increase neurotransmitter levels and changed blood values [62,63,66–68] in animal model experiments at concentrations of units or tens of mg/kg. Out of all the reports, the lowest observed adverse effect level expressed by increased cytokines concentration is 0.5 mg/kg of bw/day in mice following 28-day oral Ag NP exposure [68]. On the other hand, Kim *et al.*, observed only slight liver damage when rats were exposed to over more than 300 mg/kg of Ag [62]. Dermal toxicity studies indicate that exposure to >0.1 mg/kg of AgNPs results in slight spleen, liver, and skin damage in guinea pigs [69]. Tang *et al.*, examined the distribution and toxicity of AgNP in rats administered subcutaneous injections of silver at 62.8 mg/kg [70]. AgNPs were translocated to the blood circulation and distributed to kidney, liver, spleen, brain, and lung. Moreover, AgNP caused blood-brain barrier destruction and neuronal degeneration [71]. On the other hand, such an amount (62.8 mg/kg) of Ag in the case of subcutaneous injection or 300 mg/kg in the case of oral administration or even higher amounts represent extremely high doses which do not need to be administrated to treat bacterial infections, especially when AgNPs are combined with antibiotics. Unfortunately, the issue of the relevant dose of AgNPs required for system or local elimination of infection has not been addressed, verified or published yet. Similarly, pharmacological and pharmacokinetic data on AgNPs have not been described yet. Thus, it is not possible to predict in advance the doses of AgNPs and their eventual adverse effects. This is still an open field which requires further exploration in order to determine if AgNPs combined with antibiotics can be effective for the local and systematic therapy of infectious diseases without showing any side or adverse effects.

3. Experimental Section

3.1. Chemicals and Biological Materials

For the synthesis of AgNPs, silver nitrate (99.9%, Fagron, Olomouc, Czech Republic), ammonia (p.a., 25% w/w) aqueous solution, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), sodium hydroxide (p.a., Lach-Ner, Neratovice, Czech Republic) and D-maltose monohydrate (p.a., Sigma-Aldrich) were used. The prepared AgNPs were stabilized by gelatin (p.a., Lach-Ner).

For the determination of MICs of tested antibiotics, AgNPs and their combinations, Mueller-Hinton broth (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) was used. The following standard reference strains (labeling according to Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Brno, Czech Republic) were used: *Escherichia coli* CCM 4225, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 and *Staphylococcus aureus* CCM 4223. Antibiotics involved in the study are summarized in Table 1.

3.2. Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles

For the purpose of this study, AgNPs with an average size of 28 nm and a very narrow size distribution were prepared by the well-established modified Tollens process involving reduction of the complex cation $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ by D-maltose in alkaline media (pH = 11.5) [46]. The initial concentrations of the reagents in the reaction system were as follows: silver nitrate 1×10^{-3} mol/L; ammonia 5×10^{-3} mol/L; sodium hydroxide $1 \cdot 10^{-2}$ mol/L and D-maltose as a reducing agent 1×10^{-2} mol/L. The reaction system was stirred continuously with a magnetic stirrer and the entire experiment was carried out at the laboratory temperature (approx. 21 °C). The prepared AgNPs were additionally stabilized by gelatin added to the prepared dispersion of AgNPs at a final concentration of 0.05% in order to prevent partial aggregation caused by the culture medium.

The diameter of the prepared AgNPs was measured by the dynamic light scattering (DLS) method with the 90 Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Co., Holtsville, NY, USA). The same instrument was used for zeta potential measurements. The nanodimensions of the synthesized AgNPs were confirmed using transmission electron microscopy (TEM) with the JEM 2010 (Jeol, Tokyo, Japan) instrument. UV-Vis spectra of ten-fold diluted dispersions of AgNPs were recorded with a Specord S 600 spectrophotometer (Analytik Jena, Jena, Germany).

3.3. Determination of the Synergistic Effect of Antibiotics and Silver Nanoparticles

MICs of antibiotics and AgNPs were separately determined by the standard microdilution method. The same approach was used to determine the synergistic effect of the tested antibiotics combined with AgNPs. The used antibiotics were diluted in geometric progression and combined with AgNPs at silver concentrations under the MICs of AgNPs against the tested bacterial strain. The used silver concentrations ranged from 0.6 to 5 mg/L according to the bacterial strain used. Disposable microtitration plates were used for the tests. A total of 100 μ L of Mueller-Hinton broth with defined concentrations of an antibiotic and AgNPs was inoculated with the tested bacteria at a concentration of 10^5 to 10^6 CFU/mL. The MIC was read after 24 h of incubation at 37 °C as the MIC of the tested substance that inhibited the growth of the bacterial strain. Simultaneously, MICs of antibiotics and AgNPs were separately determined using the same microdilution method.

3.4. Cytotoxicity Evaluation of Antibiotics, Silver Nanoparticles and Their Combinations

Cytotoxicity was determined for AgNPs and selected antibiotics themselves and also for their combinations at concentrations showing antibacterial effect (equal to and under the MIC values). Also the toxicity index (LD_{50}) of selected antibiotics and AgNPs themselves and for their combinations was evaluated. Procedure of cytotoxicity evaluation was slightly modified in order to exclude potential additive effect of antibiotics applied in standard procedure. Therefore the cells NIH/3T3 were cultivated in medium (DMEM, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) without supplemented antibiotics for three passages in order to obtain antibiotic-free cells. Subsequently, cells were seeded into 96-well plate (TPP, Biotech, Trasadingen, Switzerland) at a density of 2×10^4 cells per well. After spreading (4 h), the cells were treated with the samples (antibiotics, AgNPs and their combination) and incubated in a fully-humidified incubator with 37 °C and 5% CO_2 atmosphere. Following the treatment (24 h), the MTT solution (at concentration 5 mg/mL) was added (20 μ L) into the each well. MTT solution was gently removed after 4 h and dimethyl sulfoxide (100 μ L) was added to dissolve formazan crystals. Absorbance was read at 570 nm by multiplate reader Infinite PRO M200 (Tecan, Männedorf, Switzerland). Survival rate of cells was calculated from relation of absorbance: $(A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$ and plotted as percentage of viability. Each tested concentration was repeated three times and all experiments were carried out in duplicate.

4. Conclusions

In conclusion, we report a strong synergistic efficiency of a broad spectrum of antibiotics with different chemical structures and modes of action in combination with AgNPs against *Escherichia coli* CCM 4225, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 and *Staphylococcus aureus* CCM 4223. AgNPs of an average size of 28 nm with a narrow size distribution were synthesized by the modified Tollens process and stabilized by gelatin to achieve high antibacterial efficiency by preventing particle aggregation in culture media. The microdilution method of determining the MICs of antibiotics was used as a method that is more suitable and reliable than the disc diffusion method. The antibacterial activity of the tested antibiotics increased markedly when combined with AgNPs as was proved by the significantly decreased MICs of the antibiotics against the tested bacteria. The synergistic effect of antibiotics combined with AgNPs was proved at very low concentrations showing no cytotoxic effect on mammalian cells. Moreover, restoration of the susceptibility of a resistant *Escherichia coli* strain to ampicillin was observed when ampicillin was combined with AgNPs. Because of a lack of data

concerning this phenomenon in the literature it is necessary to perform larger studies to investigate the possible restoration of susceptibility of resistant bacteria to antibiotics when combined with AgNPs.

Acknowledgments: This paper was prepared in connection with the work done under the project No. 417 2013/09/B/NZ9/01759 (decision No. 2013/09/B/NZ9/01759) sponsored by the National Science Center (Poland) and the projects of the bilateral cooperation between Poland and Czech Republic (No. projects 9005/2014-2015 and 7AMB14 PL025). Authors also gratefully acknowledge the support by the project LO1305 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, by Czech Science Foundation (project No.15-22248S) and by Internal Grants of Palacký University in Olomouc (PrF_2015_022 and IGA_LF_2015_035).

Author Contributions: A.P. and L.K. conceived the project and designed the experiments dealing with synthesis of silver NPs. M.S., R.P. and M. Kilianová carried out the experiments dealing with synthesis and stabilizations of silver NPs including their characterizations. K.B., R.V. and M. Kolář designed and carried out the microbiological experiments. G.A.P. and J.C. carried out the microbiological experiments and interpreted obtained results. M.H. carried out the cytotoxic experiments. A.P. and M. Kilianová wrote the paper. R.Z. contributed clarifications and guidance on the manuscript. All authors were involved in editing the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Walsh, T.R.; Toleman, M.A. The emergence of pan-resistant Gram-negative pathogens merits a rapid global political response. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 1–3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Theuretzbacher, U. Accelerating resistance, inadequate antibacterial drug pipelines and international responses. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2012**, *39*, 295–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Barbosa, T.M.; Levy, S.B. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist. Update* **2000**, *3*, 303–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Mokaddas, E.; Rotimi, V.O.; Sanyal, S.C. *In vitro* activity of piperacillin/tazobactam versus other broad-spectrum antibiotics against nosocomial gram-negative pathogens isolated from burn patients. *J. Chemother.* **1998**, *10*, 208–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Retsema, J.A.; English, A.R.; Girard, A.; Lynch, J.E.; Anderson, M.; Brennan, L.; Cimochoowski, C.; Faiella, J.; Norcia, W.; Sawyer, P. Sulbactam ampicillin—*In vitro* spectrum, potency, and activity in models of acute infection. *Rev. Infect. Dis.* **1986**, *8*, S528–S534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Todd, P.A.; Benfield, P. Amoxicillin clavulanic acid—An update of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* **1990**, *39*, 264–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (Ears-Net). 978-92-9193-603-8. Stockholm, 2014. Available online: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf> (accessed on 17 November 2014).
8. Li, W.R.; Xie, X.B.; Shi, Q.S.; Duan, S.S.; Ouyang, Y.S.; Chen, Y.B. Antibacterial effect of silver nanoparticles on staphylococcus aureus. *Biomaterials* **2011**, *24*, 135–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Li, W.R.; Xie, X.B.; Shi, Q.S.; Zeng, H.Y.; Ou-Yang, Y.S.; Chen, Y.B. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on escherichia coli. *Appl. Microbiol. Biot.* **2010**, *85*, 1115–1122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Cui, L.; Chen, P.Y.; Chen, S.D.; Yuan, Z.H.; Yu, C.P.; Ren, B.; Zhang, K.S. In situ study of the antibacterial activity and mechanism of action of silver nanoparticles by surface-enhanced raman spectroscopy. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 5436–5443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Lara, H.H.; Ayala-Nunez, N.V.; Turrent, L.D.I.; Padilla, C.R. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J. Microb. Biot.* **2010**, *26*, 615–621. [[CrossRef](#)]
12. Lok, C.N.; Ho, C.M.; Chen, R.; He, Q.Y.; Yu, W.Y.; Sun, H.Z.; Tam, P.K.H.; Chiu, J.F.; Che, C.M. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 916–924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Morones, J.R.; Elechiguerra, J.L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J.B.; Ramirez, J.T.; Yacaman, M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2346–2353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sondi, I.; Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on e-coli as a model for gram-negative bacteria. *J. Colloid Interf. Sci.* **2004**, *275*, 177–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Choi, O.; Hu, Z.Q. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 4583–4588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Kim, J.S.; Kuk, E.; Yu, K.N.; Kim, J.H.; Park, S.J.; Lee, H.J.; Kim, S.H.; Park, Y.K.; Park, Y.H.; Hwang, C.Y.; *et al.* Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol.* **2007**, *3*, 95–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Xu, H.Y.; Qu, F.; Xu, H.; Lai, W.H.; Wang, Y.A.; Aguilar, Z.P.; Wei, H. Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on escherichia coli o157:H7. *Biometals* **2012**, *25*, 45–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Cabiscol, E.; Tamarit, J.; Ros, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* **2000**, *3*, 3–8. [[PubMed](#)]
19. Kvitek, L.; Panacek, A.; Soukupova, J.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Prucek, R.; Holecova, M.; Zboril, R. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (nps). *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 5825–5834. [[CrossRef](#)]
20. Panacek, A.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Prucek, R.; Soukupova, J.; Krystof, V.; Hamal, P.; Zboril, R.; Kvitek, L. Antifungal activity of silver nanoparticles against candida spp. *Biomaterials* **2009**, *30*, 6333–6340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Panacek, A.; Kvitek, L.; Prucek, R.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pizurova, N.; Sharma, V.K.; Nevecna, T.; Zboril, R. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16248–16253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Shrivastava, S.; Bera, T.; Roy, A.; Singh, G.; Ramachandrarao, P.; Dash, D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 225103. [[CrossRef](#)]
23. Silver, S. Bacterial silver resistance: Molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 341–353. [[CrossRef](#)]
24. Silver, S.; Phung, L.T.; Silver, G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 627–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kremer, A.N.; Hoffmann, H. Subtractive hybridization yields a silver resistance determinant unique to nosocomial pathogens in the enterobacter cloacae complex. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 3249–3257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Haefeli, C.; Franklin, C.; Hardy, K. Plasmid-determined silver resistance in pseudomonas-stutzeri isolated from a silver mine. *J. Bacteriol.* **1984**, *158*, 389–392. [[PubMed](#)]
27. Gupta, A.; Matsui, K.; Lo, J.F.; Silver, S. Molecular basis for resistance to silver cations in salmonella. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 183–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Li, X.Z.; Nikaido, H.; Williams, K.E. Silver-resistant mutants of escherichia coli display active efflux of ag+ and are deficient in porins. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6127–6132. [[PubMed](#)]
29. Nies, D.H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 313–339. [[CrossRef](#)]
30. Potara, M.; Jakab, E.; Damert, A.; Popescu, O.; Canpean, V.; Astilean, S. Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on staphylococcus aureus. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 135101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Vertelov, G.K.; Krutyakov, Y.A.; Efremenkova, O.V.; Olenin, A.Y.; Lisichkin, G.V. A versatile synthesis of highly bactericidal myramistin (r) stabilized silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2008**, *19*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ammons, M.C.B.; Ward, L.S.; James, G.A. Anti-biofilm efficacy of a lactoferrin/xylitol wound hydrogel used in combination with silver wound dressings. *Int. Wound. J.* **2011**, *8*, 268–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ruden, S.; Hilpert, K.; Berditsch, M.; Wadhvani, P.; Ulrich, A.S. Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3538–3540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Birla, S.S.; Tiwari, V.V.; Gade, A.K.; Ingle, A.P.; Yadav, A.P.; Rai, M.K. Fabrication of silver nanoparticles by phoma glomerata and its combined effect against escherichia coli, pseudomonas aeruginosa and staphylococcus aureus. *Lett. Appl. Microbiol.* **2009**, *48*, 173–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Fayaz, A.M.; Balaji, K.; Girilal, M.; Yadav, R.; Kalaichelvan, P.T.; Venketesan, R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: A study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomed. Nanotechnol.* **2010**, *6*, 103–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ghosh, S.; Patil, S.; Ahire, M.; Kitture, R.; Kale, S.; Pardesi, K.; Cameotra, S.S.; Bellare, J.; Dhavale, D.D.; Jabgunde, A.; *et al.* Synthesis of silver nanoparticles using dioscorea bulbifera tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 483–496.

37. Muhsin, T.M.; Hachim, A.K. Mycosynthesis and characterization of silver nanoparticles and their activity against some human pathogenic bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 2081–2090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Naqvi, S.Z.H.; Kiran, U.; Ali, M.I.; Jamal, A.; Hameed, A.; Ahmed, S.; Ali, N. Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 187–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Sathiyarayanan, G.; Kiran, G.S.; Selvin, J. Synthesis of silver nanoparticles by polysaccharide bioflocculant produced from marine bacillus subtilis msnb17. *Colloid. Surf. B* **2013**, *102*, 13–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Shahverdi, A.R.; Fakhimi, A.; Shahverdi, H.R.; Minaian, S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomed. Nanotechnol.* **2007**, *3*, 168–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Hwang, I.S.; Hwang, J.H.; Choi, H.; Kim, K.J.; Lee, D.G. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *J. Med. Microbiol.* **2012**, *61*, 1719–1726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Li, P.; Li, J.; Wu, C.Z.; Wu, Q.S.; Li, J. Synergistic antibacterial effects of beta-lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 1912–1917. [[CrossRef](#)]
43. Markowska, K.; Grudniak, A.M.; Krawczyk, K.; Wrobel, I.; Wolska, K.I. Modulation of antibiotic resistance and induction of a stress response in *Pseudomonas aeruginosa* by silver nanoparticles. *J. Med. Microbiol.* **2014**, *63*, 849–854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Singh, R.; Wagh, P.; Wadhvani, S.; Gaidhani, S.; Kumbhar, A.; Bellare, J.; Chopade, B.A. Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 4277–4289.
45. Brown, A.N.; Smith, K.; Samuels, T.A.; Lu, J.R.; Obare, S.O.; Scott, M.E. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 2768–2774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Kvitek, L.; Prucek, R.; Panacek, A.; Novotny, R.; Hrbac, J.; Zboril, R. The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of silver active silver colloid synthesis. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 1099–1105. [[CrossRef](#)]
47. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 5.0. Available online: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (accessed on 1 January 2015).
48. Krishnaraj, C.; Jagan, E.G.; Rajasekar, S.; Selvakumar, P.; Kalaichelvan, P.T.; Mohan, N. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloid. Surf. B* **2010**, *76*, 50–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Zhang, M.; Wang, P.; Sun, H.; Wang, Z. Superhydrophobic Surface with Hierarchical Architecture and Bimetallic Composition for Enhanced Antibacterial Activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 22108–22115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Agnihotri, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 3974–3983. [[CrossRef](#)]
51. El-Zahry, M.R.; Mahmoud, A.; Refaat, I.H.; Mohamed, H.A.; Bohlmann, H.; Lendl, B. Antibacterial effect of various shapes of silver nanoparticles monitored by SEM. *Talanta* **2015**, *138*, 183–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Pal, S.; Tak, Y.K.; Song, J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1712–1720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Singh, S.; Bharti, A.; Meena, V.K. Green synthesis of multi-shaped silver nanoparticles: Optical, morphological and antibacterial properties. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **2015**, *26*, 3638–3648. [[CrossRef](#)]
54. Habash, M.B.; Park, A.J.; Vis, E.C.; Harris, R.J.; Khursigara, C.M. Synergy of silver nanoparticles and aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* pao1 biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 5818–5830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kareem, P.A.; Alsammak, E.G. The Effect of Silver and Zinc Oxide Nanoparticles on Multi Drug Resistance *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Adv. Res.* **2014**, *12*, 405–417.

56. Kora, A.J.; Rastogi, L. Enhancement of antibacterial activity of capped silver nanoparticles in combination with antibiotics, on model gram-negative and gram-positive bacteria. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2013**, *2013*, 871097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Krajewski, S.; Prucek, R.; Panacek, A.; Avci-Adali, M.; Nolte, A.; Straub, A.; Zboril, R.; Wendel, H.P.; Kvitek, L. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified chandler-loop *in vitro* assay on human blood. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 7460–7468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Kvitek, L.; Vanickova, M.; Panacek, A.; Soukupova, J.; Dittrich, M.; Valentova, E.; Prucek, R.; Bancirova, M.; Milde, D.; Zboril, R. Initial study on the toxicity of silver nanoparticles (nps) against paramecium caudatum. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 4296–4300. [[CrossRef](#)]
59. Panacek, A.; Prucek, R.; Safarova, D.; Dittrich, M.; Richtrova, J.; Benickova, K.; Zboril, R.; Kvitek, L. Acute and chronic toxicity effects of silver nanoparticles (nps) on drosophila melanogaster. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 4974–4979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Richter, A.P.; Brown, J.S.; Bharti, B.; Wang, A.; Gangwal, S.; Houck, K.; Hubal, E.A.C.; Paunov, V.N.; Stoyanov, S.D.; Velev, O.D. An environmentally benign antimicrobial nanoparticle based on a silver-infused lignin core. *Nat. Nanotechnol.* **2015**, *10*, 817–823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Munger, M.A.; Radwanski, P.; Hadlock, G.C.; Stoddard, G.; Shaaban, A.; Falconer, J.; Grainger, D.W.; Deering-Rice, C.E. *In vivo* human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Kim, Y.S.; Kim, J.S.; Cho, H.S.; Rha, D.S.; Kim, J.M.; Park, J.D.; Choi, B.S.; Lim, R.; Chang, H.K.; Chung, Y.H.; *et al.* Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in sprague-dawley rats. *Inhal. Toxicol.* **2008**, *20*, 575–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Kim, Y.S.; Song, M.Y.; Park, J.D.; Song, K.S.; Ryu, H.R.; Chung, Y.H.; Chang, H.K.; Lee, J.H.; Oh, K.H.; Kelman, B.J.; *et al.* Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* **2010**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Loeschner, K.; Hadrup, N.; Qvortrup, K.; Larsen, A.; Gao, X.Y.; Vogel, U.; Mortensen, A.; Lam, H.R.; Larsen, E.H. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part. Fibre Toxicol.* **2011**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Van der Zande, M.; Vandebriel, R.J.; van Doren, E.; Kramer, E.; Rivera, Z.H.; Serrano-Rojero, C.S.; Gremmer, E.R.; Mast, J.; Peters, R.J.B.; Hollman, P.C.H.; *et al.* Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano* **2012**, *6*, 7427–7442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Hadrup, N.; Loeschner, K.; Mortensen, A.; Sharma, A.K.; Qvortrup, K.; Larsen, E.H.; Lam, H.R. The similar neurotoxic effects of nanoparticulate and ionic silver *in vivo* and *in vitro*. *Neurotoxicology* **2012**, *33*, 416–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Cha, K.; Hong, H.W.; Choi, Y.G.; Lee, M.J.; Park, J.H.; Chae, H.K.; Ryu, G.; Myung, H. Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 1893–1899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Park, E.J.; Bae, E.; Yi, J.; Kim, Y.; Choi, K.; Lee, S.H.; Yoon, J.; Lee, B.C.; Park, K. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2010**, *30*, 162–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Korani, M.; Rezayat, S.M.; Gilani, K.; Bidgoli, S.A.; Adeli, S. Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig. *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 855–862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Tang, J.L.; Xiong, L.; Wang, S.; Wang, J.Y.; Liu, L.; Li, J.A.; Wan, Z.Y.; Xi, T.F. Influence of silver nanoparticles on neurons and blood-brain barrier via subcutaneous injection in rats. *Appl. Surf. Sci.* **2008**, *255*, 502–504. [[CrossRef](#)]
71. Tang, J.L.; Xiong, L.; Wang, S.; Wang, J.Y.; Liu, L.; Li, J.G.; Yuan, F.Q.; Xi, T.F. Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, *9*, 4924–4932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.



© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant *Enterobacteriaceae*



Aleš Panáček^{a,*}, Monika Smékalová^a, Renata Večeřová^b, Kateřina Bogdanová^b,
Magdaléna Röderová^b, Milan Kolář^b, Martina Kilianová^a, Šárka Hradilová^a,
Jens P. Froning^a, Markéta Havrdová^c, Robert Pucek^a, Radek Zbořil^a, Libor Kvítek^a

^a Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

^b Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University in Olomouc, Hněvotínská 5, 775 15 Olomouc, Czech Republic

^c Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Experimental Physics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 October 2015

Received in revised form 1 March 2016

Accepted 2 March 2016

Available online 4 March 2016

Keywords:

Silver nanoparticle

Antibiotic

Resistant bacteria

Synergism

Cytotoxicity

ABSTRACT

Bacterial resistance to conventional antibiotics is currently one of the most important healthcare issues, and has serious negative impacts on medical practice. This study presents a potential solution to this problem, using the strong synergistic effects of antibiotics combined with silver nanoparticles (NPs). Silver NPs inhibit bacterial growth via a multilevel mode of antibacterial action at concentrations ranging from a few ppm to tens of ppm. Silver NPs strongly enhanced antibacterial activity against multiresistant, β -lactamase and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* when combined with the following antibiotics: cefotaxime, ceftazidime, meropenem, ciprofloxacin and gentamicin. All the antibiotics, when combined with silver NPs, showed enhanced antibacterial activity at concentrations far below the minimum inhibitory concentrations (tenths to hundredths of one ppm) of individual antibiotics and silver NPs. The enhanced activity of antibiotics combined with silver NPs, especially meropenem, was weaker against non-resistant bacteria than against resistant bacteria. The double disk synergy test showed that bacteria produced no β -lactamase when treated with antibiotics combined with silver NPs. Low silver concentrations were required for effective enhancement of antibacterial activity against multiresistant bacteria. These low silver concentrations showed no cytotoxic effect towards mammalian cells, an important feature for potential medical applications.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bacterial resistance to the effects of antimicrobial agents is currently a serious concern for medical care, and this is exacerbated by an increasing frequency of bacterial diseases. Application of antimicrobials is an integral part of the therapeutic approach to patient with bacterial infections. However, the mounting resistance of pathogenic bacteria increasingly limits antibiotic effectiveness, thus significantly increasing the likelihood of failure of antibiotic therapy and the related morbidity and mortality of patients [1]. For example, initial antibiotic therapy may be effective in patients with hematological malignancies, reducing mortality from febrile

neutropenia to 2–10%. However, cases of bacteremia caused by extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase production led to mortality rates of up to 25% and 69%, respectively [2–4].

The range of treatment options for infections caused by Gram-negative bacteria is diminishing, and the potential threat of an infectious pandemic caused by multi- and pan-resistant strains is increasingly more likely to ensue. Moreover, development and spread of bacterial resistance are based on a mechanism that involves hijacking genetic material from resistant bacterial cells using recombinant processes. Given this mechanism, antibiotic resistance spreads inexorably, independent of their consumption [5].

Since bacterial resistance is a multifactorial problem, it requires an interdisciplinary approach. An integral, albeit increasingly difficult, aspect of the solution is the development of novel antimicrobial agents. One option for overcoming bacterial resistance is

* Corresponding author.

E-mail address: ales.panacek@upol.cz (A. Panáček).

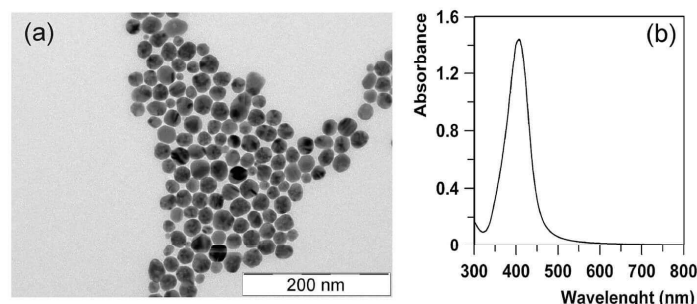


Fig. 1. TEM image (a) and UV-vis absorption spectra (b) of AgNPs, indicating a narrow particle size distribution.

Table 1

MICs (mg/L)^a, average FIC^b and resulting effect (Eff) of antibiotics in combination with AgNPs at different silver concentrations below MICs of AgNPs^c against ESBL-positive *Escherichia coli* strains.

antibiotic/AgNPs	COX			CZD			MER			CIP			GEN		
	MIC	FIC	Eff	MIC	FIC	Eff	MIC	FIC	Eff	MIC	FIC	Eff	MIC	FIC	Eff
antibiotic alone	4	0.4 (0.1)	S	16	0.36 (0.13)	S	0.06	1.23 (0.19)	I	>32	0.22 (0.16)	S	0.5	0.5 (0.17)	S
antibiotic + AgNPs 0.4 mg/L	0.03			0.125			0.06			0.125			0.125		
antibiotic + AgNPs 0.2 mg/L	0.125			0.125			0.06			0.125			0.125		
antibiotic + AgNPs 0.1 mg/L	1			2			0.06			0.5			0.125		
antibiotic + AgNPs 0.05 mg/L	1			16			0.06			2			0.125		

^a The MIC determination is a qualitative assay and the estimated error is of the order of magnitude of the value; (n = 3).

^b average value (SD); (n = 3).

^c MIC of AgNPs alone against ESBL-positive *Escherichia coli* = 0.8 mg/L.

the combination of selected penicillin antibiotics (e.g., ampicillin, amoxicillin or piperacillin) with bacterial β -lactamase inhibitors (clavulanic acid, sulbactam or tazobactam) [6–8]. However, numerous bacterial species exhibit markedly increased resistance against such combinations of antibiotics with other substances that block the defined bacterial resistance mechanism [9]. Thus, if a novel, developmental, antimicrobial drug is to be effective at conquering bacterial resistance, it must act at several cellular levels and not at a specific level, like traditional antibiotics.

An apparent, promising approach to dealing with bacterial resistance is the combination of a traditional antibiotic with silver nanoparticles (AgNPs). These combinations inhibit growth of pathogenic microorganisms, including highly resistant bacterial strains, at very low concentrations of 1–10 mg/L [10–12]. The effects of silver, either as a metal (nanoparticles) or in compounds, are not specific to a single cellular level, but influence many bacterial structures and metabolic processes concurrently [13–24]. As such, the AgNPs poses low risk of bacterial resistance development. Therefore, it is a suitable candidate for combinations with antibiotics that are insusceptible to bacterial resistance.

Bacterial resistance to silver is conducted mainly with ionic form of silver and, beside others, it was described in 1960s [25] and further in works of Silver [26,27]. Bacteria that were resistant to ionic silver originated from clinical environments [28] and naturally-occurring strains [29]. Besides Ag^+ reduction to its less toxic oxidation state, the Ag^+ resistance mechanism involves an active efflux from the cell by either P-type adenosine triphosphatases (ATPases) or chemiosmotic Ag^+/H^+ antiporters [26,27,30–32].

However, a few studies demonstrating eventual resistance or lowered susceptibility to AgNPs emerged recently [33,34]. One study found that the plasmidic silver resistance determinant described above (based on an energy-dependent Ag^+ efflux from the cell by membrane proteins), was expressed by *Salmonella* Senftenberg in the presence of both ionic silver and AgNPs [34].

Therefore, AgNPs should be used sparingly for treating bacterial infections.

Since AgNPs antibacterial activity is nonspecific and dependent on shape, size, charge, etc., the AgNPs resistance mechanism should not be generalized. The mechanism should be evaluated for whether the bacteria can develop resistance to AgNPs when it is combined with antibiotic. In summary, if the bacterial resistance to AgNPs has appeared, it was related to ionic form of silver. However, bacterial resistance to purely metallic AgNPs has not yet been proven.

Several recent studies indicated that AgNPs may strengthen the antibacterial effects of antibiotics, either additively or synergistically. Unfortunately, the synergistic effects of AgNPs–antibiotics combinations were proven mostly for susceptible bacteria [35–46]. Only a few studies confirmed a successful synergistic effect of AgNPs–antibiotics combinations in resistant bacteria. Furthermore, the concentrations of AgNPs were high enough to inhibit bacterial growth [45,46]. Such high AgNP concentrations (tens of mg/L) may be cytotoxic to mammalian cells.

One study, by Brown et al., showed a successful synergistic effect of noble metal nanoparticles functionalized with ampicillin, even against multiresistant strains such as multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [47]. However, so far, no study characterizes the effects of antibiotics combined with AgNPs on multiresistant bacteria that produce broad-spectrum β -lactamases of the ESBL, AmpC and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) types [48]. Current antibiotics are no longer effective for these multiresistant bacteria.

The present study aimed to determine the bactericidal effect of selected antibiotics combined with AgNPs against multiresistant *Enterobacteriaceae* that produce broad-spectrum β -lactamases or carbapenemase.

Table 2
MICs (mg/L)^a, average FIC^b and resulting effect of antibiotics in combination with AgNPs at different silver concentrations below MICs of AgNPs^c against AmpC-positive *Escherichia coli* strains.

antibiotic/AgNPs	COX			CZD			MER			CIP			GEN		
	MIC	FIC	Eff	MIC	FIC	Eff	MIC	FIC	Eff	MIC	FIC	Eff	MIC	FIC	Eff
antibiotic alone	8	0.28 (0.1)	S	32	0.28 (0.1)	S	0.06	1.23 (0.2)	I	32	0.34 (0.11)	S	0.5	0.48 (0.2)	S
antibiotic + AgNPs 1.7 mg/L	0.03			0.125			0.06			0.125			0.125		
antibiotic + AgNPs 0.8 mg/L	0.03			0.125			0.06			0.125			0.125		
antibiotic + AgNPs 0.4 mg/L	1			2			0.06			8			0.125		
antibiotic + AgNPs 0.2 mg/L	1			8			0.06			16			0.125		

^a The MIC determination is a qualitative assay and the estimated error is of the order of magnitude of the value; (n = 3).

^b average value (SD); (n = 3).

^c MIC of AgNPs alone against AmpC-positive *Escherichia coli* = 3.4 mg/L.

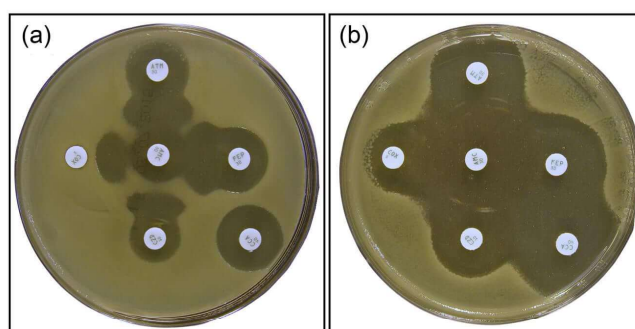


Fig. 2. Positive (a) and negative (b) detection of ESBL production by ESBL-positive *Escherichia coli* exposed to antibiotics alone (a) and antibiotics combined with AgNPs (b).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and biological materials

AgNPs were synthesized using silver nitrate (p.a., Fagron), ammonia (28–30% [w/w], p.a., Sigma–Aldrich), sodium hydroxide (p.a., Lach–Ner) and D-maltose (p.a., Sigma–Aldrich). The synergistic effects of AgNPs combined with each of the antibiotics cefotaxime (COX), ceftazidime (CZD), meropenem (MER), ciprofloxacin (CIP) and gentamicin (GEN) were evaluated against selected multiresistant bacterial strains (see below). Mueller–Hinton Broth (Becton, Dickinson and Company) was used as a culture medium. Antibiotic disks of cefotaxime (COX), aztreonam (ATM), cefepime (FEP), ceftazidime (CZD), ceftazidime + clavulanate (CCA) and amoxicillin + clavulanate (AMC) for the double disk synergy test were supplied by Bio Rad (France).

2.2. Synthesis and characterization of AgNPs

For this study, AgNPs were synthesized according to the previously published Tollens process that involves reduction of the complex cation $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ by D-maltose in alkaline media [49]. The concentrations of all the reaction components were as follows: silver nitrate, $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ (mass concentration corresponded to 108 mg/L of Ag); ammonia, $5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; sodium hydroxide, $9.6 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, and D-maltose as a reducing agent, $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$.

The reaction mixture was continuously stirred with a magnetic stirrer. Synthesis of AgNPs was carried out at the laboratory temperature (approx. 21 °C). In addition, AgNPs were stabilized during preparation by adding gelatin to the dispersion at a final concentration of 0.05%, in order to prevent partial aggregation caused by introduction to the culture medium.

The particle diameter of prepared AgNPs was measured by dynamic light scattering using the 90 Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instr. Co.). The nanodimensions of the AgNPs were confirmed by transmission electron microscopy (TEM) using the JEM 2010 instrument (Jeol, Japan). Ultraviolet–visible (UV–vis) light spectra and surface plasmon resonance of AgNP dispersions diluted 10-fold were recorded with the Specord S 600 spectrophotometer (Analytik Jena, Germany).

2.3. Multiresistant bacterial strains

The following multiresistant strains were used for testing: ESBL-positive *Escherichia coli*, ESBL-positive *K. pneumoniae*, AmpC-positive *E. coli* and KPC-positive *K. pneumoniae* (Table S1). Mueller–Hinton Broth (Becton, Dickinson and Company) was used as a culture medium. Each strain was identified with standard microbiology methods using the Phoenix automated system (Becton Dickinson) and the MALDI–TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight) Biotyper (Bruker Daltonics). All strains had been tested for the presence of β -lactamase genes that encode production of ESBL and AmpC enzymes, using a specific set of primers [50]. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of carbapenemase genes was performed according to the method by Monteiro et al. [51]. Selected samples were sequenced.

2.4. Determination of the synergistic effect of antibiotics and AgNPs

A standard checkboard microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of each AgNPs–antibiotic combination, each individual antibiotic, and AgNPs. The antibiotics and AgNPs were separately diluted in Mueller–Hinton broth in geometric progression to determine their

MICs. Using AgNP dispersions with a silver mass concentration of 108 mg/L, the final silver concentrations, after dilution in geometric progression, were: 54, 27, 13.5, 6.8, 3.4, 1.7, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 and 0.05 mg/L.

In order to determine the synergistic effect of AgNPs–antibiotics combinations, we observed the MICs of each antibiotic when combined with four different AgNP concentrations that fell below the MIC_{Ag} values, i.e., $MIC_{Ag}/2$, $MIC_{Ag}/4$, $MIC_{Ag}/8$ and $MIC_{Ag}/16$.

Fresh bacterial suspension was prepared for each antibacterial assay. Bacteria were grown for 24 h at 35 °C on blood agar and then used to prepare bacterial inoculum which density was determined by measuring optical density with a densitometer (Densi-La-Meter; LACHEMA, Czech Republic). The direct colony suspension method was used to make a suspension of the bacteria in saline to the density of a McFarland 0.5 turbidity standard, approximately corresponding to $1-2 \times 10^8$ CFU/mL for *E. coli*. Dilution in Mueller Hinton broth was the next step to obtain recommended starting concentration of 10^6 CFU/mL.

Assessing of antimicrobial activity was performed according to standard testing protocols (CLSI, EUCAST) and minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest concentration of the tested substance that visibly inhibits the growth of the bacterial strain (absence of clouding) after 24 h of incubation at 35 °C and confirmed by subsequent plating on agar medium (MH agar, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

The fractional inhibitory concentration (FIC) index was calculated according to a document by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [52] using the following formula:

$$FIC = \frac{MIC_{Ag\text{ in combination}}}{MIC_{Ag\text{ alone}}} + \frac{MIC_{ATB\text{ in combination}}}{MIC_{ATB\text{ alone}}}$$

Since the checkboard dilution method resulted in a certain number of FICs (Fig. S1), an average \overline{FIC} was calculated in order to classify the combined antibacterial effect of antibiotics and AgNPs as synergistic ($\overline{FIC} \leq 0.5$), additive ($0.5 < \overline{FIC} \leq 1$), indifferent ($1 < \overline{FIC} < 2$), and antagonistic ($\overline{FIC} \geq 2$).

2.5. Detection of ESBL production by double disk synergy test

We used the double disk synergy test (DDST) to detect β -lactamase production by bacteria exposed to antibiotics alone and AgNP–antibiotics combinations. The DDST was performed according to the disk diffusion methodology developed by the EUCAST [53]. DDST involves inhibition of β -lactamase activity by the β -lactamase inhibitor clavulanic acid, subsequently causing an enlarged growth inhibition zone around the disk, or an extension of this zone towards the disk containing the inhibitor, forming a characteristic pattern between the substrate disks that do or do not contain the inhibitor (Fig. S2) [54].

DDSTs in this study were performed by placing disks of cefotaxime (COX), aztreonam (ATM), cefepime (FEP), and ceftazidime (CZD) on agar plates at a required distance from a disk containing amoxicilline + clavulanate (AMC) and concurrently by placing a disk of ceftazidime (CZD) at a required distance from a disk containing ceftazidime + clavulanate (CCA; Fig. S2). The test was considered ESBL positive when the cephalosporin or aztreonam inhibition zone extended towards the disk containing amoxicilline + clavulanate, and when the inhibition zone of ceftazidime + clavulanate was larger than that of ceftazidime alone. All tests were interpreted after incubation of the DDST agar plates at 37 °C for 24 h.

The synergistic effect of AgNPs–antibiotics combinations was evaluated by DDST as follows. The AgNP dispersion was added to liquid agar to achieve a final silver concentration equal to $MIC_{Ag}/2$, which is sufficient for a strong, apparent synergistic effect—namely

3 mg/L for ESBL-positive *K. pneumoniae* and 0.4 mg/L for ESBL-positive *E. coli*.

2.6. Characterization of bacteria using atomic force microscopy (AMF)

ESBL-positive *K. pneumoniae* was cultivated in the presence of 1 mg/L of cefotaxime alone, and 0.01 mg/L of cefotaxime combined with 1.7 mg/L of AgNPs. Mueller Hinton broth was inoculated with each bacterial strain and cultured for 24 h at 37 °C to obtain a concentration of 10^6 CFU/mL. Subsequently, bacteria were separated from culture media by centrifugation and washed in phosphate buffered saline (PBS; p.a., Sigma–Aldrich). The bacteria were fixed with 2% cold glutaraldehyde (p.a., Sigma–Aldrich) for 1 h, then washed thrice in PBS and dehydrated stepwise, for 15 min per step, in ethanol (p.a., Sigma–Aldrich) solutions (30%, 50%, 70%, 90%). Dehydrated bacteria were deposited on muscovite mica and imaged by an Ntegra Spectra atomic force microscope (NT-MDT, Moscow) using the semicontact mode under ambient conditions (humidity 44–45% and temperature 22–23 °C), and the lowest possible loading force for measurement with an HA–NC B cantilever.

2.7. Cytotoxicity evaluation of antibiotics, AgNPs, and their combinations

Cytotoxicity of AgNPs and antibiotics alone was evaluated at concentrations of 4 mg/L and 2 mg/L, respectively. The same concentrations were used for their combinations. The cytotoxicity evaluation procedure was slightly modified to exclude the potential additive effect due to standard application of the antibiotics. NIH/3T3 mammalian cells were cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Life Technologies) without supplemental antibiotics for 3 passages to obtain antibiotic-free cells. Subsequently, the mammalian cells were seeded onto a 96-well plate (TPP, Biotech) at a density of 2×10^4 cells per well. After spreading (4 h), the mammalian cells were treated with the samples (antibiotics, AgNPs, and their combinations) and incubated in a fully-humidified incubator containing 5% CO₂ at 37 °C for 24 h.

Following treatment, 20 μ L of MTT solution (5 mg/mL) was added to each well. The MTT solution was gently removed after 4 h and 100 μ L of dimethyl sulfoxide was added to dissolve formazan crystals. Absorbance was measured at 570 nm on the Infinite PRO M200 multiplate reader (Tecan, Austria). The cell survival rates were calculated using relative absorbance: $(A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$ and plotted as percentage viability. Each tested concentration was triplicated and all experiments were duplicated.

3. Results and discussion

Tollens process, a well-known and reliable method, was used to synthesize AgNPs. This process produces AgNPs of a specific size, 28 nm in diameter, with a very narrow size distribution, as confirmed by TEM (Fig. 1). The surface plasmon resonance (a typical measure of adsorption of material onto metal nanoparticle surfaces) of these AgNPs was recorded at a wavelength of 405 nm (Fig. 1), proving their small size. The AgNPs were stabilized with 0.05% gelatin to prevent possible aggregation after addition to culture media, which contains highly concentrated electrolytes. Only stabilized, non-aggregated AgNPs produce high antibacterial activity.

We found that AgNPs, synthesized and stabilized as described above, showed antibacterial activity against the selected multiresistant strains, as reflected by low MIC_{Ag} values (Table S2). AgNPs almost inhibited bacterial growth at concentrations of several milligrams per liter. The AgNPs demonstrated the strongest antibacterial activity against ESBL-positive *E. coli*, as only 0.8 mg/L

Table 3
MICs (mg/L)^a, average FIC^b and resulting effect of antibiotics in combination with AgNPs at different silver concentrations below MICs of AgNPs^c against KPC-positive *Klebsiella pneumoniae* strains.

antibiotic/AgNPs	COX			CZD			MER			CIP			GEN		
	MIC	FIC	Eff	MIC	FIC	Eff	MIC	FIC	Eff	MIC	FIC	Eff	MIC	FIC	Eff
antibiotic alone	>16	0.59 (0.26)	A	>64	0.38 (0.26)	S	>32	0.37 (0.25)	S	>32	0.33 (0.11)	S	1	0.55 (0.3)	A
antibiotic + AgNPs 1.7 mg/L	0.03			0.125			0.06			0.125			0.125		
antibiotic + AgNPs 0.8 mg/L	2			0.125			0.06			0.5			0.125		
antibiotic + AgNPs 0.4 mg/L	>16			2			4			8			0.125		
antibiotic + AgNPs 0.2 mg/L	>16			>64			>32			16			1		

^a The MIC determination is a qualitative assay and the estimated error is of the order of magnitude of the value; (n = 3).

^b average value (SD); (n = 3).

^c MIC of AgNPs alone against KPC-positive *Klebsiella pneumoniae* = 3.4 mg/L.

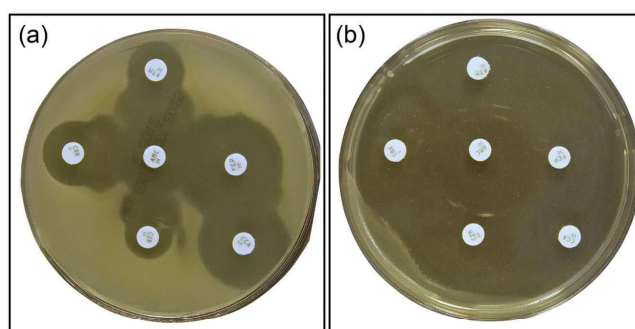


Fig. 3. Positive (a) and negative (b) detection of ESBL production by ESBL-positive *Klebsiella pneumoniae* exposed to antibiotics alone (a) and antibiotics combined with AgNPs (b).

of AgNPs was sufficient to kill the bacteria. The highest MIC_{Ag}, 6.75 mg/L, was required to kill ESBL-positive *K. pneumoniae*; however, this value is still considered a very low bactericidal concentration.

Such low MICs_{Ag} of AgNPs represent very high antibacterial activity, but the AgNP concentration needed to enhance the activity of the selected antibiotics against all the selected multiresistant strains was considerably lower, even less than 1 mg/L. This is particularly significant, from a therapeutic point of view, since the lowest concentrations of therapeutic agents minimize possible adverse effects.

We determined the MICs of the selected antibiotics in order to distinguish between antibiotic-resistant and antibiotic-susceptible bacteria in this study. Table S2 shows the MICs of antibiotics against the tested multiresistant bacteria. The bacteria is antibiotic-resistant when the MIC of the antibiotic is higher than its breakpoint (the concentration that defines whether a bacterial species is resistant or susceptible to the antibiotic; based on the EUCAST database [55]).

Tables 1–4 summarize the MICs and calculated FIC indexes of the AgNPs–antibiotics combinations. These tables show that AgNPs, when combined with antibiotics, strongly enhanced the activity of the antibiotics against the selected multiresistant strains. This enhancement was apparent for all the antibiotics we tested, especially those to which a particular bacterium was resistant.

The combined antibacterial effect of the AgNPs and the antibiotics was synergistic against all resistant bacterial strains except KPC-positive *K. pneumoniae*, for which the combined antibacterial effect of COX with AgNPs was additive. However, the combined antibacterial effect was not as strong for susceptible bacteria as for resistant bacteria. The effects of only two of the seven bacterial treatments with AgNPs–antibiotic combinations exhibited a

synergistic effect of the combination against susceptible bacteria (AgNPs–GEN against both ESBL-positive *E. coli* and AmpC-positive *E. coli*). Two of the remaining five bacterial treatments (AgNPs–CIP against ESBL-positive *K. pneumoniae* and AgNPs–GEN against KPC-positive *K. pneumoniae*) exhibited additive effects. The effects of the remaining three combinations (AgNPs–MER against ESBL-positive *E. coli*, AmpC-positive *E. coli* and ESBL-positive *K. pneumoniae*) were indifferent.

The strength of the antibacterial effect of a given antibiotic caused its combined (with AgNPs) antibacterial effect against susceptible bacteria to be weaker than its combined effect against resistant bacteria. This was especially the case for the antibiotic MER. The synergistic effect of the AgNPs–MER combination was observed only once, and only against meropenem-resistant bacteria. The combined antibacterial effect of MER with AgNPs against meropenem-susceptible bacteria was either additive or indifferent. Moreover, the MIC values of AgNPs–MER combinations did not fall below the MIC values of unattached MER against meropenem-susceptible bacteria, which remained at a value of 0.06 mg/L. Thus, the antibacterial effect of unattached MER against susceptible bacteria was considerably strong and could not be exceeded by the antibacterial effect of the AgNPs–MER combination.

AgNPs very strongly enhanced the effects of antibiotics at all concentrations tested, even at the lowest concentration of MIC_{Ag}/16. The greatest enhancement of antibacterial activity was observed at AgNP concentrations of MIC_{Ag}/2 and MIC_{Ag}/4, with the MICs of the antibiotics being as much as 100-fold lower. The enhanced antibacterial effects of antibiotics combined with AgNP concentrations of MIC_{Ag}/8 and MIC_{Ag}/16 were still apparent, albeit less prominent.

Nevertheless, the MICs of the antibiotics decreased several times. At concentrations of MIC_{Ag}/2 and MIC_{Ag}/4, the MICs of

Table 4
MICs (mg/L)^a, average FIC^b and resulting effect of antibiotics in combination with AgNPs at different silver concentrations below MICs of AgNPs^c against ESBL-positive *Klebsiella pneumoniae* strains.

antibiotic/AgNPs	COX			CZD			MER			CIP			GEN		
	MIC	FIC	Eff	MIC	FIC	Eff	MIC	FIC	Eff	MIC	FIC	Eff	MIC	FIC	Eff
antibiotic alone	>32	0.18 (0.14)	S	32	0.2 (0.14)	S	0.06	1.23 (0.2)	A	0.2	0.98 (0.16)	A	>32	0.33 (0.16)	S
antibiotic + AgNPs 3.4 mg/L	0.03			0.125			0.06			0.125			0.125		
antibiotic + AgNPs 1.7 mg/L	0.03			0.125			0.06			0.125			1		
antibiotic + AgNPs 0.8 mg/L	0.03			0.125			0.06			0.2			2		
antibiotic + AgNPs 0.4 mg/L	1			2			0.06			0.2			16		

^a The MIC determination is a qualitative assay and the estimated error is of the order of magnitude of the value; (n = 3).

^b average value (SD); (n = 3).

^c MIC of AgNPs alone against ESBL-positive *Klebsiella pneumoniae* = 6.8 mg/L.

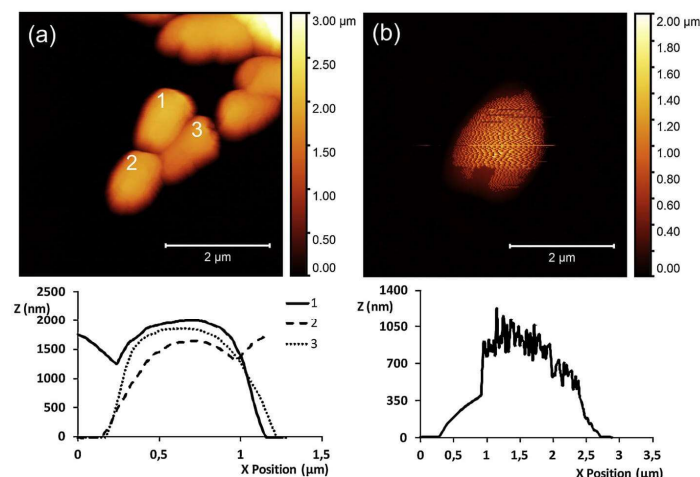


Fig. 4. Atomic Force Microscopy (AFM) images and profiles (plot below image) of ESBL-positive *Klebsiella pneumoniae* exposed to cefotaxime alone (a) and cefotaxime combined with AgNPs (b).

the antibiotics for multiresistant strains were always below their breakpoints. Thus, all the multiresistant bacteria tested may have been considered susceptible to the antibiotics combined with sub-inhibitory AgNP concentrations. At the subsequently lower silver concentration of $MIC_{Ag}/8$, the MICs of the antibiotics were below or equal to the breakpoint levels in the following cases: ESBL-positive *E. coli* treated with COX or CIP, AmpC-positive *E. coli* treated with COX, and ESBL-positive *K. pneumoniae* treated with COX, CZD or GEN.

No MIC value of any antibiotic combined with AgNPs at $MIC_{Ag}/8$ was less than or equal to the breakpoint for KPC-positive *K. pneumoniae*. At the lowest silver concentration of $MIC_{Ag}/16$, MICs of the antibiotics that were less than or equal to the breakpoints were noted only for COX against all the multiresistant bacteria except KPC-positive *K. pneumoniae*. When the other antibiotics were combined with $MIC_{Ag}/16$, the MICs of the antibiotics decreased in some cases, but never fell below the breakpoints. In the other cases, the MICs of these other antibiotics did not decrease when they were combined with $MIC_{Ag}/16$. Thus, $MIC_{Ag}/8$ and especially $MIC_{Ag}/16$ were threshold concentrations at which the enhanced antibacterial activity of the antibiotics gradually started to vanish.

Several studies have demonstrated the synergistic effect of AgNPs with antibiotics against both antibiotic-susceptible [35–47] and antibiotic-resistant bacteria [40,45–47]. Brown et al. found synergy with both silver NPs and gold NPs functionalized with ampicillin, even against multiresistant strains such as

multiresistant isolates of *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, and methicillin-resistant *S. aureus* [47]. These results are consistent with our data, and corroborate the enhanced activity of cefotaxime, ceftazidime, meropenem, ciprofloxacin and gentamicin after combination with AgNPs at concentrations lower than the MICs of AgNPs. Unlike the study by Brown et al., our study showed the synergistic effect with a wider concentration ranges of the antibiotic agents, and lower silver concentrations.

Markowska et al. evaluated the synergistic effect of AgNPs combined with antibiotics against both susceptible and resistant *P. aeruginosa*. The synergistic effect was shown only against susceptible *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* resistant to streptomycin and rifampicin retained its resistance when these antibiotics were combined with AgNPs [40]. Similarly, Singh et al. tested the synergistic effects of AgNPs–antibiotics combinations against both susceptible and resistant bacterial strains using the disk diffusion and dilution methods. For the disk method, they used a concentration of 30 μg of silver per disk which, on its own, showed antibacterial effects against the tested bacteria. The synergistic effect was weak in most cases, mainly against susceptible strains. However, for the dilution method, the authors did confirm the synergistic effect of AgNPs and antibiotics against both susceptible and resistant bacteria using a AgNP concentration of 75 mg/L [45]. On one hand, this concentration was already sub-inhibitory (the MIC_{AgNPs} was above 100 mg/L); on the other hand, it was relatively high and toxic for human cells [11,56], making it useless for practical application.

Our findings demonstrated the synergistic effect of AgNPs and antibiotics against resistant bacterial strains at much lower AgNP concentrations (by as much as two orders of magnitude). Sen et al. studied the synergistic effect of AgNPs and antibiotics at a concentration of 15 mg/L of silver. This concentration on its own inhibited the growth of the tested resistant bacteria by 50%. Combination of AgNPs, at concentrations equal to the lethal dose that kills 50% of bacteria (LD50), with 50 mg/L of ampicillin, 10 mg/L of azithromycin, 10 mg/L of cefepime, and 20 mg/L of tetracycline produced a synergistic effect against the resistant bacteria strains tested [46]. However, we used considerably lower concentrations of silver that did not inhibit the growth of resistant bacteria on their own.

The above data from AgNPs–antibiotics combinations suggest a potential solution to the problem of bacterial resistance. The results confirm synergistic antimicrobial effects, and decreases in the MICs of the antibiotics tested to values that fall below their respective breakpoints. When combined with very low AgNP concentrations, the originally ineffective antibiotics regained their strong bactericidal activity against multiresistant strains.

The synergistic effect and enhanced activity of antibiotics combined with AgNPs may be explained by the concurrent impact of silver on numerous bacterial structures and metabolic processes. AgNPs inactivate bacterial enzymes [18,19], disrupt bacterial metabolic processes [14,17] and the bacterial cell wall [24], accumulate in the cytoplasmic membrane and increase its permeability [19–21], interact with DNA [18], denature proteins [40] and generate reactive oxygen species [15,16,22]. This multilevel mode of action makes AgNPs able to destroy or inhibit the growth of pathogenic microorganisms, including highly resistant bacterial strains (from a few mg/mL to several tens of mg/L) [10–12,20,21].

At lower silver concentrations, specifically from a few tenths of 1 mg/L to several mg/L, AgNPs exhibit no bactericidal activity. To a certain extent, however, they may damage the cell wall and influence its permeability, and affect bacterial metabolic processes. Silver may also inhibit production of enzymes responsible for bacterial multidrug resistance, or even directly inhibit the enzymatic process of antibiotic hydrolysis. Inhibition of antibiotic degradation by ESBL, AmpC and KPC enzymes may occur by either direct enzyme inactivation, or changes in the structure of the antibiotic substrate resulting from chemical or physical interactions between antibiotic molecules and AgNP surfaces to which antibiotic molecules may adsorb.

DDSTs for detection of ESBL produced by ESBL-positive *E. coli* and ESBL-positive *K. pneumoniae* were performed to confirm the impact of AgNPs on β -lactamase. The DDSTs positively detected ESBL production in both strains of ESBL-positive *E. coli* and ESBL-positive *K. pneumoniae*. Positive detection was reflected by the typical enlargement of aztreonam and cephalosporins inhibition zones towards amoxicillin–clavulanate (Figs. 2 a and 3 a) after cultivation on agar plates without AgNPs. The ceftazidime + clavulanate inhibition zone was also enlarged, compared to the ceftazidime inhibition zone.

ESBL production was not detected when ESBL-positive *E. coli* and ESBL-positive *K. pneumoniae* were cultivated on agar containing 0.4 mg/L and 3 mg/L of AgNPs respectively. Inhibition zone expansion towards amoxicillin–clavulanate and an enlarged ceftazidime + clavulanate inhibition zone were not observed, proving negative detection of ESBL production (Figs. 2 b and 3 b).

This negative DDST result may be explained by the notion that the presence of AgNPs in the agar plate affected bacterial production or activity of β -lactamases. This result demonstrates that antibacterial activity of the antibiotics is restored when they are combined with sub-inhibitory concentrations of AgNPs. Given the effect of silver on β -lactamase function, hydrolysis of the antibiotics does not occur; therefore the antibiotics remain effective against

bacteria. Figs. 2 b and 3 b clearly show, by comparison, the concurrent synergistic effect of AgNPs and antibiotics. Inhibition zones around all the antibiotic disks placed on agar plates containing AgNPs were enlarged compared to inhibition zones around antibiotic disks placed on agar plates without AgNPs.

The mechanisms of the synergistic effect, based on restoration of the antibacterial activity of the antibiotic due to obstructed β -lactamase activity, also support the AFM characterizations of ESBL-positive *K. pneumoniae* cells exposed to cefotaxime alone and the AgNPs–cefotaxime combination. When exposed to cefotaxime, the rigid cell wall of the resistant bacterial strain remained undamaged because β -lactamase inactivated the antibiotic (Fig. 4a). Therefore, the topography and profiles of bacterial cells treated with unattached cefotaxime were well-characterized by AFM.

On the contrary, AFM characterization of bacterial cells exposed to cefotaxime combined with AgNPs was difficult and infeasible under the same conditions and produced much noise for both image and profile (Fig. 4b). Such infeasible measurement was given by reduced bacterial cell wall rigidity and, thus, restored activity of the sub-inhibitory cefotaxime concentration, combined with AgNPs, which was not hydrolyzed by β -lactamase. Another indication of the reduced cell wall rigidity is that the bacteria appear flatter and wider during the AFM measurement.

Given their very low concentrations, the AgNPs are harmless in that they have no cytotoxic effects on mammalian cells, as confirmed by the cytotoxic study using NIH/3T3 cell lines. AgNPs, antibiotics alone and AgNPs–antibiotics combinations at concentrations of 4 mg/L and 2 mg/L, respectively, showed no cytotoxic effect on the mammalian cell lines compared to control cells. The viability of mammalian cells treated with AgNPs and antibiotics alone decreased slightly to 97% and 98%, respectively, compared to control cells, suggesting no significant cytotoxic effect. When antibiotics were combined with AgNPs at identical concentrations (4 mg/L and 2 mg/L, respectively), the viability of the mammalian cells decreased slightly from 98% to 95% compared to control cells, depending on the antibiotic used (Fig. S3).

We demonstrated the synergistic antibacterial effect of AgNPs combined with antibiotics for significantly lower concentrations than those used in the cytotoxicity evaluation. Therefore, any cytotoxic effects of the AgNPs–antibiotics combinations may be ruled out for concentrations that were effective against the resistant strains we tested. Previous studies reported the cytotoxic effect of AgNPs prepared by the Tollens process at concentrations higher than 30 mg/L [11,56]. The absence of adverse cytotoxic effects is particularly important for: potential medical preparations, medical devices comprising combinations of conventional antibiotics and AgNPs which could be useful for treating local infections, production of antibacterial catheters, prostheses, vascular grafts, etc. It may be assumed that prevention or treatment of infections using the strong synergistic effects of antibiotics combined with AgNPs would be more effective with very low concentrations of both antimicrobial substances, thus minimizing the risk of toxic side effects.

4. Conclusion

This study of the antibacterial activity of AgNPs combined with antibiotics clearly confirmed the existence of a synergistic effect resulting from the combination of these two antimicrobial agents. In *in vitro* tests, the synergistic effect led to a reduction in the MICs of the antibiotics by at least one order of magnitude when combined with AgNPs at concentrations below 1 mg/L. Moreover, even antibiotics that originally were totally ineffective showed bactericidal effects against multiresistant bacterial strains when combined with such low AgNP concentrations.

Additionally, DDSTs showed a lack of β -lactamase production in bacteria when antibiotics were combined with AgNPs, thus confirming the restoration of the antibacterial effect of antibiotics in the presence of silver. The potential cytotoxic effect of such low AgNP concentrations on mammalian cells, as observed in *in vitro* tests with concentrations more than one order of magnitude higher, was eliminated. Additionally, the observed decrease in minimum inhibitory antibiotic concentration by one order of magnitude substantially reduces any adverse effects of antibiotics currently used in medical practice. Altogether, combining antibiotics with AgNPs provides one potential approach to an effective fight against the unresolved problem of an increasing resistance of pathogenic bacteria against traditional antibiotics.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the support provided by project LO1305 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, the Czech Science Foundation (project No.15-22248S), the Ministry of Health of the Czech Republic (AZV VES 15-27726A) and the Internal Grants of Palacký University in Olomouc (IGA.PrF.2015.022 and IGA.LF.2015.035).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.007>.

References

- [1] D.M. Livermore, Int. J. Antimicrob. Agents 39 (2012) 283.
- [2] C.I. Kang, D.R. Chung, K.S. Ko, K.R. Peck, J.H. Song, K.N.S.I. Dis. Ann. Hematol. 91 (2012) 115.
- [3] E. Toussaint, E. Bahel-Ball, M. Vekemans, A. Georgala, L. Al-Hakak, M. Paesmans, M. Aoun, Support. Care Cancer 14 (2006) 763.
- [4] L. Vidal, M. Paul, L. Ben dor, K. Soares-Weiser, L. Leibovici, J. Antimicrob. Chemother. 54 (2004) 29.
- [5] T.M. Barbosa, S.B. Levy, Drug. Resist. Update 3 (2000) 303.
- [6] E. Mokaddas, V.O. Rotimi, S.C. Sanyal, J. Chemother. 10 (1998) 208.
- [7] J.A. Retsema, A.R. English, A. Girard, J.E. Lynch, M. Anderson, L. Brennan, C. Cimochoowski, J. Faiella, W. Norcia, P. Sawyer, Rev. Infect. Dis. 8 (1986) S528.
- [8] P.A. Todd, P. Benfield, Drugs 39 (1990) 264.
- [9] Antimicrobial resistance surveillance in Europe, Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) Stockholm, 2014, 2013, Available online: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>.
- [10] L. Kvitek, A. Panacek, J. Soukupova, M. Kolar, R. Vecerova, R. Prucek, M. Holecova, R. Zboril, J. Phys. Chem. C 112 (2008) 5825.
- [11] A. Panacek, M. Kolar, R. Vecerova, R. Prucek, J. Soukupova, V. Krystof, P. Hamal, R. Zboril, L. Kvitek, Biomaterials 30 (2009) 6333.
- [12] A. Panacek, L. Kvitek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizurova, V.K. Sharma, T. Nevecna, R. Zboril, J. Phys. Chem. B 110 (2006) 16248.
- [13] E. Cabiscot, J. Tamarit, J. Ros, Int. Microbiol. 3 (2000) 3.
- [14] L. Cui, P.Y. Chen, S.D. Chen, Z.H. Yuan, C.P. Yu, B. Ren, K.S. Zhang, Anal. Chem. 85 (2013) 5436.
- [15] O. Choi, Z.Q. Hu, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 4583.
- [16] J.S. Kim, E. Kuk, K.N. Yu, J.H. Kim, S.J. Park, H.J. Lee, S.H. Kim, Y.K. Park, Y.H. Park, C.Y. Hwang, Y.K. Kim, Y.S. Lee, D.H. Jeong, M.H. Cho, Nanomed. Nanotechnol. 3 (2007) 95.
- [17] H.H. Lara, N.V. Ayala-Nunez, L.D.I. Turrent, C.R. Padilla, World J. Microbiol. Biotechnol. 26 (2010) 615.
- [18] W.R. Li, X.B. Xie, Q.S. Shi, S.S. Duan, Y.S. Ouyang, Y.B. Chen, Biomaterials 24 (2011) 135.
- [19] W.R. Li, X.B. Xie, Q.S. Shi, H.Y. Zeng, Y.S. Ou-Yang, Y.B. Chen, Appl. Microbiol. Biotechnol. 85 (2010) 1115.
- [20] C.N. Lok, C.M. Ho, R. Chen, Q.Y. He, W.Y. Yu, H.Z. Sun, P.K.H. Tam, J.F. Chiu, C.M. Che, J. Proteome Res. 5 (2006) 916.
- [21] J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramirez, M.J. Yacaman, Nanotechnology 16 (2005) 2346.
- [22] I. Sondi, B. Salopek-Sondi, J. Colloid Interface Sci. 275 (2004) 177.
- [23] H.Y. Xu, F. Qu, H. Xu, W.H. Lai, Y.A. Wang, Z.P. Aguilar, H. Wei, Biomaterials 25 (2012) 45.
- [24] G. Sahni, P. Gopinath, P. Jeevanandam, Colloids Surf. B 103 (2013) 441.
- [25] C. Jelenko, Ann. Surg. 170 (1969) 296.
- [26] S. Silver, FEMS Microbiol. Rev. 27 (2003) 341.
- [27] S. Silver, L.T. Phung, G. Silver, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 33 (2006) 627.
- [28] A.N. Kremer, H. Hoffmann, J. Clin. Microbiol. 50 (2012) 3249.
- [29] C. Haefeli, C. Franklin, K. Hardy, J. Bacteriol. 158 (1984) 389.
- [30] A. Gupta, K. Matsui, J.F. Lo, S. Silver, Nat. Med. 5 (1999) 183.
- [31] X.Z. Li, H. Nikaïdo, K.E. Williams, J. Bacteriol. 179 (1997) 6127.
- [32] D.H. Nies, FEMS Microbiol. Rev. 27 (2003) 313.
- [33] J.L. Graves Jr., M. Tajkarimi, Q. Cunningham, A. Campbell, H. Nonga, S.H. Harrison, J.E. Barrick, Front. Genet. 6 (2015) 42.
- [34] C. Losasso, S. Belluco, V. Cibin, P. Zavagnin, I. Micetic, F. Gallochio, M. Zanella, L. Bregoli, G. Biancotto, A. Ricci, Front. Microbiol. 5 (2014) 227.
- [35] S.S. Birla, V.V. Tiwari, A.K. Gade, A.P. Ingole, A.P. Yadav, M.K. Rai, Lett. Appl. Microbiol. 48 (2009) 173.
- [36] A.M. Fayaz, K. Balaji, M. Girilal, R. Yadav, P.T. Kalaichelvan, R. Venkatesan, Nanomed. Nanotechnol. 6 (2010) 103.
- [37] S. Ghosh, S. Patil, M. Ahire, R. Kitture, S. Kale, K. Pardesi, S.S. Cameotra, J. Bellare, D.D. Dhavale, A. Jabgunde, B.A. Chopade, Int. J. Nanomed. 7 (2012) 483.
- [38] I.S. Hwang, J.H. Hwang, H. Choi, K.J. Kim, D.G. Lee, J. Med. Microbiol. 61 (2012) 1719.
- [39] P. Li, J. Li, C.Z. Wu, Q.S. Wu, Nanotechnology 16 (2005) 1912.
- [40] K. Markowska, A.M. Grudniak, K. Krawczyk, I. Wrobel, K.I. Wolska, J. Med. Microbiol. 63 (2014) 849.
- [41] T.M. Muhsin, A.K. Hachim, World J. Microbiol. Biotechnol. 30 (2014) 2081.
- [42] S.Z.H. Naqvi, U. Kiran, M.I. Ali, A. Jamal, A. Hameed, S. Ahmed, N. Ali, Int. J. Nanomed. 8 (2013) 13.
- [43] G. Sathiyarayanan, G.S. Kiran, J. Selvin, Colloids Surf. B 102 (2013) 13.
- [44] A.R. Shahverdi, A. Fakhimi, H.R. Shahverdi, S. Minaian, Nanomed. Nanotechnol. 3 (2007) 168.
- [45] R. Singh, P. Wagh, S. Wadhvani, S. Gaidhani, A. Kumbhar, J. Bellare, B.A. Chopade, Int. J. Nanomed. 8 (2013) 4277.
- [46] I.K. Sen, A.K. Mandal, S. Chakraborti, B. Dey, R. Chakraborty, S.S. Islam, Int. J. Biol. Macromol. 62 (2013) 439.
- [47] A.N. Brown, K. Smith, T.A. Samuels, J.R. Lu, S.O. Obare, M.E. Scott, Appl. Environ. Microbiol. 78 (2012) 2768.
- [48] K. Bush, G.A. Jacoby, Antimicrob. Agents Chemother. 54 (2010) 969.
- [49] L. Kvitek, R. Prucek, A. Panacek, R. Novotny, J. Hrbac, R. Zboril, J. Mater. Chem. 15 (2005) 1099.
- [50] M. Kolar, J. Bardou, M. Chroma, K. Hricova, T. Stosova, P. Sauer, D. Koukalova, Vet. Med. (Prague Czech Repub.) 55 (2010) 119.
- [51] J. Monteiro, R.H. Widen, A.C.C. Pignatari, C. Kubasek, S. Silbert, J. Antimicrob. Chemother. 67 (2012) 906.
- [52] European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Clin. Microbiol. Infect. 6 (2000) 503.
- [53] EUCAST, Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing—Version 5.0, 2015, Available online: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Manual_v5.0_EUCAST_Disk_Test.pdf.
- [54] M.H. Sedlakova, V. Hanulik, M. Chroma, K. Hricova, M. Kolar, T. Latal, R. Schaumann, A.C. Rodloff, Med. Sci. Monit. 17 (2011) Br47.
- [55] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015, Available online: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
- [56] S. Krajewski, R. Prucek, A. Panacek, M. Avci-Adali, A. Nolte, A. Straub, R. Zboril, H.P. Wendel, L. Kvitek, Acta Biomater. 9 (2013) 7460.

Effects of silver nanoparticles on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes

Human and Experimental Toxicology
2016, Vol. 35(9) 946–957
© The Author(s) 2015
Reprints and permission:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0960327115611969
het.sagepub.com


A Galandáková^{1,2}, J Franková^{1,2}, N Ambrožová¹, K Habartová¹,
V Pivodová^{1,2}, B Zálešák³, K Šafářová⁴, M Smékalová⁴
and J Ulrichová^{1,2}

Abstract

Biomedical application of silver nanoparticles (AgNPs) has been rapidly increasing. Owing to their strong anti-microbial activity, AgNPs are used in dermatology in the treatment of wounds and burns. However, recent evidence for their cytotoxicity gives rise to safety concerns. This study was undertaken as a part of an ongoing programme in our laboratory to develop a topical agent for wound healing. Here, we investigated the potential toxicity of AgNPs using normal human dermal fibroblasts (NHDF) and normal human epidermal keratinocytes (NHEK) with the aim of comparing the effects of AgNPs and ionic silver (Ag-I). Besides the effect of AgNPs and Ag-I on cell viability, the inflammatory response and DNA damage in AgNPs and Ag-I-treated cells were examined. The results showed that Ag-I were significantly more toxic than AgNPs both on NHDF and NHEK. Non-cytotoxic concentrations of AgNPs and Ag-I did not induce DNA strand breaks and did not affect inflammatory markers, except for a transient increase in interleukin 6 levels in Ag-I-treated NHDF. The results showed that AgNPs are more suitable for the intended application as a topical agent for wound healing up to the concentration 25 µg/mL.

Keywords

Human dermal fibroblasts, human epidermal keratinocytes, silver nanoparticles, toxicity, inflammation, DNA damage

Introduction

Nanotechnology is a highly promising field for the development of new applications in a variety of areas including electronics, environmental remediation, and medical healthcare.¹ Nanomaterial is defined as a substance (natural, incidental or manufactured) containing particles in an unbound state, as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50% or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in a size ranging from 1 to 100 nm.² Nanoparticles (NPs) can take many different forms such as tubes, rods, wires or spheres, with more elaborate structures devised such as nano-onions and nano-pea pods.^{3,4} Due to the large surface area and high reactivity of NPs compared with macro-/micro-particles, NPs exhibit excellent physical, chemical and biological properties. This makes nanomaterial attractive for

exploitation in diverse products, and therefore, the field of nanotechnology is expanding at a rapid rate.^{5,6}

¹Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

²Faculty of Medicine and Dentistry, Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

³Department of Plastic and Aesthetic Surgery, University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic

⁴Faculty of Science, Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

Corresponding author:

A Galandáková, Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Palacký University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, Czech Republic.

Email: galandakova.a@seznam.cz

In terms of interest and utilization, silver NPs (AgNPs) seem to be the most popular. Ag compounds and ions have been used for both hygienic and healing purposes, due to their strong bactericidal effects as well as a broad spectrum of antimicrobial activity.^{7,8} Nevertheless, topical application of Ag compounds (silver nitrate (AgNO₃) and silver sulfadiazine) may cause cosmetic abnormality, for example, argyria (blue grey colouration) upon prolonged use or could arrest the healing process owing to fibroblast and epithelial cell toxicity.⁹ The use of the Ag compounds and ions was suppressed with the advent of antibiotics and other disinfectants.^{10,11} However, interest of Ag in medicine has re-emerged with the increased bacterial resistance to antibiotics and the production Ag in the form of NPs. Owing to their strong antimicrobial activity, AgNPs are used in surgical instruments and bone prostheses coated or embedded with AgNPs.¹² Further application of AgNPs is in dermatology in the treatment of wounds and burns.^{13,14} With the increasing interest in the use of AgNPs in medicine, concerns about the potential toxicity of AgNPs also increase. Hence toxic effects on human health have been studied *in vitro*^{15–18} and *in vivo*.^{15,19,20} Many studies have identified some degree of NPs toxicity.

Due to the small size, NPs have higher mobility in the body compared to macro-/micro-particles. *In vivo* studies have shown the presence of AgNPs in various organs (e.g. brain, skin, lung, kidney, liver and testis).^{19,21} Several *in vitro* studies further reported the ability of AgNPs to enter cells.^{22–25} However, the mode by which NPs enter cells has not been explained yet. Similarly, the mechanism of NPs, particularly AgNPs, and their toxic effects remain unclear. Several *in vitro* studies suggest that AgNPs cytotoxicity is connected with their effect on cellular energy metabolism. AgNPs induce mitochondrial dysfunction via interruption of mitochondrial membrane permeability and adenosine triphosphate synthesis.^{22,26,27} AgNPs further stimulate generation of reactive oxygen species (ROS).^{22,28,29} Excessive ROS generation results in oxidative stress and subsequent oxidative damage to biomolecules including lipids³⁰ and DNA as well as an inflammatory response. Recent studies have reported production of DNA single-strand breaks in AgNPs-exposed cells.^{20,22,30,31} Carlson et al.²⁸ and Park et al.¹⁶ have further shown increased levels of pro-inflammatory cytokines (interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 and tumour necrosis factor α (TNF- α)), Th1- and Th2-type cytokines (IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 and interferon- γ) and transforming growth factor β after AgNPs treatment *in vitro* or *in vivo*.¹⁶

The goal of the present work was to evaluate the potential toxicity of AgNPs and ionic silver (Ag-I) using normal human dermal fibroblasts (NHDF) and normal human epidermal keratinocytes (NHEK) and define a range of AgNPs and Ag-I concentration for the intended application as a topical agent for wound healing. Besides, influence of AgNPs and Ag-I on cell viability, the inflammatory response and DNA damage in AgNPs and Ag-I-treated cells were examined.

Materials and Methods

Chemicals

AgNPs and AgNO₃ (Ag-I) were provided by NanoTrade s.r.o. (Czech Republic). Western blotting Luminol Reagent, cyclooxygenase 2 (COX-2) rabbit polyclonal antibody, IL-6 rabbit polyclonal antibody, actin (1–19) goat polyclonal antibody, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and rabbit anti-goat antibodies were received from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA). Protease inhibitor cocktail tablets (Complete™) were purchased from Roche (Mannheim, Germany). Keratinocyte basal medium-2 and KGM™-2 SingleQuots™ were purchased from East port Prague s.r.o. (Czech Republic). EpiLife® medium and human keratinocyte growth supplement kit were received from Life Technologies s.r.o. (Czech Republic). Dulbecco's modified Eagle's medium, Ham-F12 nutrient mixture, stabilized penicillin–streptomycin solution, amphotericin B, hydrocortisone, adenine, insulin, epidermal growth factor, 3,3',5 triiod-L-thyronin, trypsin, ampicillin, lipopolysaccharide (LPS; from *Escherichia coli* 055:B5), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), ethidium bromide, Immun-Blot™ polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, and Kodak BioMax light film, and all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA).

Synthesis and characterization of AgNPs

AgNPs were provided by NanoTrade s.r.o. The particle was synthesized by chemically reducing AgNO₃ with sodium borohydride (NaBH₄) as referred in Czech patent (CZ 304160 B6).³² The prepared AgNPs were sonicated in a bath sonicator for 30 min prior to use. The size of prepared AgNPs was lower than 20 nm (Figure 1(a) and (b)). The ultraviolet–visible spectrum was collected on a ultraviolet–visible spectrophotometer (Helios Alpha, Thermo Electron Corporation, UK); Figure 1(c) and (d).

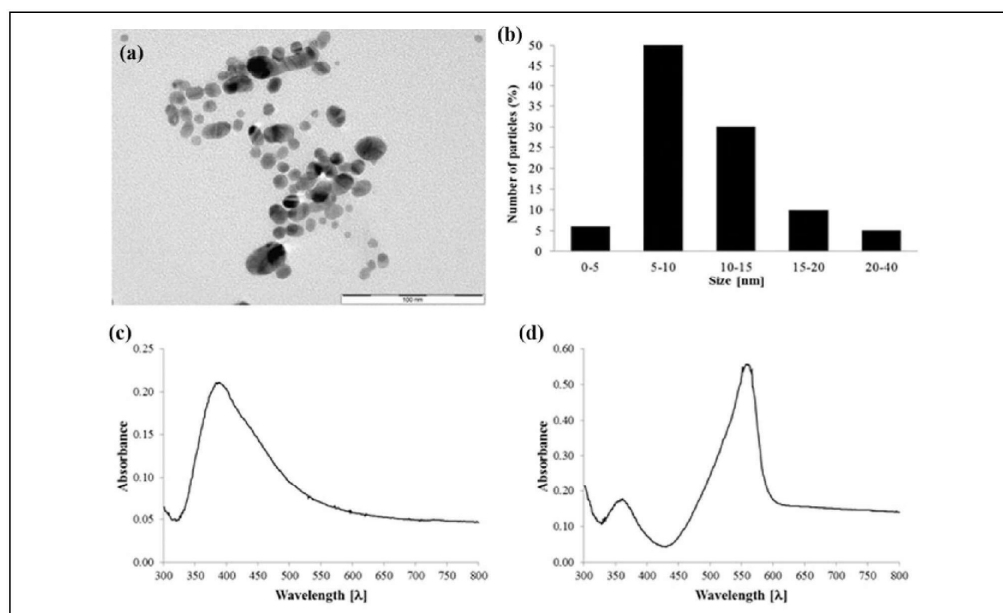


Figure 1. Characterization of AgNPs. Panel (a) represents typical TEM image of AgNPs captured with the TEM JEOL 2010. Scale bar represent 100 nm. Panel (b) shows the size distribution of AgNPs measured with Image J software. Panel (c) shows UV-Vis absorption spectra of AgNPs diluted in water and panel (d) shows UV-Vis absorption spectra of AgNPs diluted in serum-free medium.

AgNPs: silver nanoparticle; TEM: transmission electron microscope; UV-Vis: ultraviolet-visible.

The primary particle size and morphology of AgNPs were examined using a transmission electron microscope (TEM; JEOL 2010, JEOL Ltd, Japan) at an accelerating voltage of 160 kV. An aqueous solution of AgNPs was sonicated (30 min) to reduce agglomeration, 5 μ l of NPs suspension was then applied onto Formvar carbon-coated copper grid which was then dried. Image J software was used to measure the nanoparticle size. Particles were approximately spherical, and thereafter, the diameter measurements were performed at random. The mean and standard deviation (SD) of particle sizes were calculated from measuring over 700 individual NPs in random fields of view in addition to the images showing the general morphology of the NPs.³³ Zeta potential was also measured to determine the amount of aggregation of particles.

Cell culture and characterization

NHDF and NHEK were cultivated from skin of healthy donors (see supplementary document). The tissue specimens were obtained from patients undergoing plastic

surgery at the Department of Plastic and Aesthetic Surgery (University Hospital Olomouc). The tissue acquisition protocol adhered to the requirements of the local ethics committee. All patients had signed written informed consent.

The isolated primary cell cultures (NHDF and NHEK) were characterized by the morphology and immunocytochemically according to their phenotype at the Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc (see supplementary document).

Treatment of cells

For evaluation of AgNPs and Ag-I effects on cell viability, inflammatory response, and DNA damage, NHDF and NHEK were treated with AgNPs and Ag-I in serum-free medium that was applied for 8 or 24 h. Then the media were collected and immediately frozen (-80°C) for a measurement of inflammatory markers particularly IL-6, IL-8, TNF- α , basic fibroblast growth factor (FGF basic)

and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), if necessary, further processed and then toxicity, DNA damage or expression of COX-2 and IL-6 were evaluated.

Cell viability

Reduction of tetrazolium salt, MTT, was used as a parameter for cytotoxicity assessment. MTT is reduced by intracellular dehydrogenases of viable living cells that lead to the formation of purple formazan crystals, insoluble in aqueous solutions. After dissolution in organic solvent, the absorbance is monitored.³⁴

The cells on 96-well microplates were treated with AgNPs (0–33 µg/mL) and Ag-I (0–33 µg/mL) in serum-free medium for 24 h. Control cells were treated with a serum-free medium without AgNPs or Ag-I. After the incubation period, the medium was removed, and serum-free medium supplemented with MTT (5 mg/mL) was applied to the cells for 2 h (37°C, dark). The solution was then removed and the crystals were dissolved in dimethyl sulfoxide with ammonia (1%, v/v). Afterwards, the solubilization solution (100 µl) from each well was transferred onto a new 96-well plate, and the absorbance was read from the bottom of the well to ensure that residual AgNPs or Ag-I on the bottom of the wells did not interfere with the absorbance. The absorbance was measured at a test wavelength 540 nm and a reference wavelength of 690 nm (Sunrise, Tecan, Switzerland).³⁵

The cytotoxicity of AgNPs/Ag-I can be evaluated using the following equation:

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = 100 \times \left(\frac{(A_S - A_B)}{(A_C - A_B)} \right),$$

where A_S is the absorbance of sample (the cells treated with AgNPs or Ag-I), A_B is the absorbance of background (well without cell and with AgNPs or Ag-I), and A_C is the absorbance of control (the cells treated with a serum-free medium without AgNPs or Ag-I).

Genotoxicity

DNA strand breaks were used for genotoxicity evaluation. The alkaline version of single-cell gel electrophoresis (comet assay) was used. The NHDF on 24-well plates were treated with AgNPs (1, 10, and 25 µg/mL) and Ag-I (0.1, 0.5, and 1 µg/mL) in serum-free medium for 24 h. After the incubation period, cells were washed with PBS, harvested, and processed as described previously.³⁶

The extent of DNA damage was analysed after staining by ethidium bromide on an Olympus BX 70 fluorescence microscope (Tokyo, Japan). The lesions were assessed at least in 100 nuclei/slide area by visual scoring from 0 (*undamaged, no discernible comet tail*) to 4 (*almost all DNA in tail, insignificant head*) using the standard breakage scale (Figure 2). Total DNA damage was calculated: number of cells in class 0 × 0 + number of cells in class 1 × 1 + number of cells in class 2 × 2 + number of cells in class 3 × 3 + number of cells in class 4 × 4. The maximal damage was given a value of 400.

Cytokine determination

Production of inflammatory markers particularly IL-6, IL-8, TNF-α, FGF basic and GM-CSF was measured in medium collected from NHDF treated with AgNPs (0.25 and 25 µg/mL) and Ag-I (0.025 and 0.25 µg/mL) after 8 and 24 h. For determination, the Bio-Plex Human Cytokines enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit and Bio-Plex 200 System (Bio-Rad, Hercules, California, USA) were used according to the manufacturer's manual. The system allowed simultaneous measurement of all five cytokines in one sample.

Negative control cells were treated with a serum-free medium without AgNPs and Ag-I. Positive control cells were treated with a LPS (10 µg/mL) in serum-free medium, as LPS is a well-known inflammatory agent.³⁷

Protein expression

The amount of COX-2 and IL-6 protein was evaluated using Western blot analysis. NHDF were treated with AgNPs (0.25 and 25 µg/mL) and Ag-I (0.025 and 0.25 µg/mL) in serum-free medium for 24 h. Fibroblasts were then washed properly with cold PBS and scraped into the ice-cold lysis buffer (20 mM Tris, 5 mM ethylene glycol tetra acetic acid, 150 mM sodium chloride, 20 mM glycerol phosphate, 1 mM sodium fluoride, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 0.1% Tween 20, and protease inhibitor cocktail tablet). After incubation (15 min, 4°C), the lysate was cleared by centrifugation (14,000 r/min, 10 min, 4°C). The supernatant protein concentration was determined by Bradford assay. Proteins were separated by 12.5% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto a PVDF membrane. Residual binding sites on the membrane were blocked using blocking buffer (5% non-fat dry milk (w/v) in 100 mM Tris-buffered saline

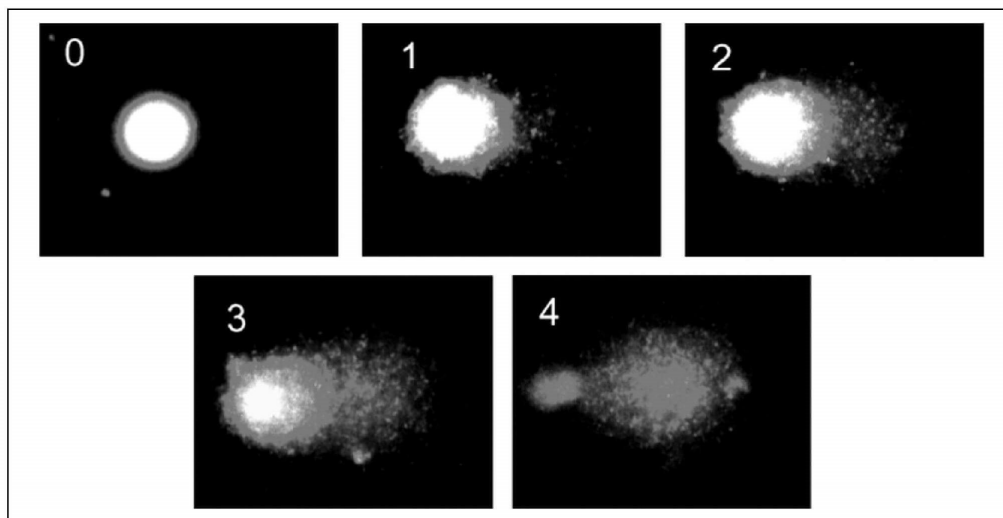


Figure 2. Comet examples for visual scoring of DNA damage.

(pH 7.5) with Tween 20 (0.05%, v/v) for 1 h at room temperature). The membrane was then incubated with a polyclonal primary antibody (rabbit anti-IL-6, goat anti-COX-2 or goat anti-actin (1–19), overnight at 4°C) and with a secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody (goat anti-rabbit or rabbit anti-goat for 2 h at room temperature). COX-2, IL-6 and actin expression was detected by chemiluminescence using Western Blotting Luminol Reagent and autoradiography using a Kodak BioMax light film. The quantification of proteins was performed by densitometric analysis using ElfoMan 2.6 software.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SD of four independent experiments performed in triplicate for each sample. The Student's *t*-test was used for statistical analysis. Statistical significance was determined at $p = 0.05$. Western blot data are representatives of three independent experiments.

Results

Synthesis and characterization of AgNPs

AgNPs were synthesized chemically by reducing AgNO_3 with NaBH_4 . The use of strong reducing agent like NaBH_4 enables to produce AgNPs of size lower than 40 nm. The AgNPs were characterized

before using them further. TEM analysis was used for the determination of accurate size, shape and state of dispersion. The TEM analysis revealed that AgNPs (Figure 1(a)) monodispersed with spherical morphology. The size distribution analysis showed that the 50% of the AgNPs occurring between 5 and 40 nm in size, and the overall average size matches the 10.43 ± 4.74 nm (Figure 1(b)). Zeta potential value was -22 mV (in water) and -14.6 mV (in serum-free medium). Spectrophotometrical analysis showed that the AgNPs diluted in water and serum-free medium have absorption maximum at 388 nm and 557 nm, respectively (Figure 1(c) and (d)).

Effect of AgNPs on cell viability

Toxicity is the most crucial problem for metal-based NPs in medical applications. Therefore, we evaluated the toxic effect of AgNPs and Ag-I on two cell cultures (NHDF and NHEK) after 24 h exposure. The MTT results revealed that the concentrations of Ag-I above 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were extremely toxic to both NHDF (Figure 3(a)) and NHEK (Figure 4(a)). The IC_{50} values (concentration yielding 50% growth inhibition) were 3.1 ± 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 5.8 ± 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the Ag-I on NHDF and NHEK, respectively. In contrast, AgNPs did not decrease cell viability in the chosen concentration range in NHDF (Figure 3(a)) and NHEK (Figure 4(a)). Similar results were obtained

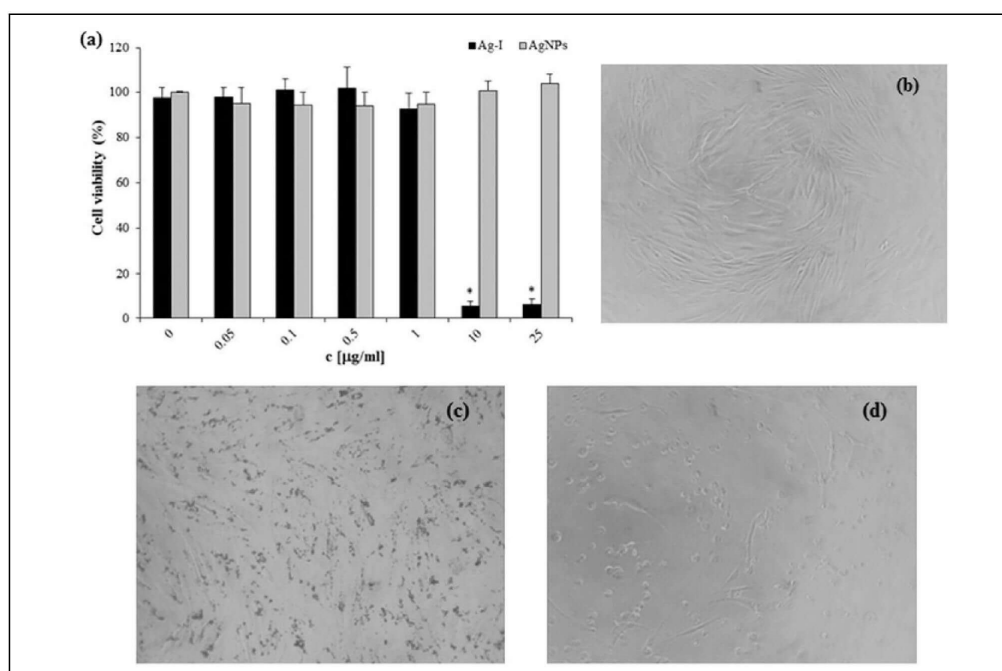


Figure 3. Effects of AgNPs and Ag-I on NHDF viability (a) determined by the MTT assay after 24 h treatment. The viability percentage was normalized to the untreated cells (without AgNPs or Ag-I). The values represent the mean \pm SD of four sets of independent experiments. * $p \leq 0.05$: significant difference from control. Morphological changes were observed after vehicle (b), AgNPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (c)) and Ag-I (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (d)).

AgNPs: silver nanoparticles; Ag-I: ionic silver; NHDF: normal human dermal fibroblasts; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

in morphologic observations (Figure 3(b) to (d) and Figure 4(b) to (d)).

Based on these results, we selected non-toxic concentration of AgNPs (0.25–25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Ag-I (0.025–1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for further biochemical studies. Although these concentrations did not affect cell viability, we would like to verify whether they cause (or not) modification of DNA and cytokines level.

Effect of AgNPs on DNA strand breaks formation

Earlier studies have shown that AgNPs induce DNA damage either directly through physical attack, indirectly by triggering the production of ROS or by a combination of both factors.^{18,22,38} To test whether non-toxic concentrations of AgNPs and Ag-I might affect DNA, NHDF were treated with AgNPs (1, 10 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Ag-I (0.1, 0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the strand breaks of DNA were evaluated. Our results

showed that neither AgNPs nor Ag-I induced DNA strand breaks formation in all tested concentrations after 24 h (Table 1).

Effect of AgNPs on inflammatory markers

Media collected from NHDF exposed to AgNPs (0.25 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Ag-I (0.025 and 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 8 and 24 h were used for cytokine level determination by ELISA assay. The results showed that of the five chosen cytokines, only IL-6 level was changed after AgNPs and Ag-I treatment. Non-toxic concentrations of AgNPs (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Ag-I (0.025 and 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) increased the production of IL-6 (Figure 5(a)) after 8 h treatment. The level was normalized within 24 h. IL-8, TNF- α , FGF basic and GM-CSF levels were not affected by either AgNPs or Ag-I (Figure 5(b) to (e)) after 8 and 24 h.

Western blot analysis also revealed that AgNPs (0.25 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Ag-I (0.025 and 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

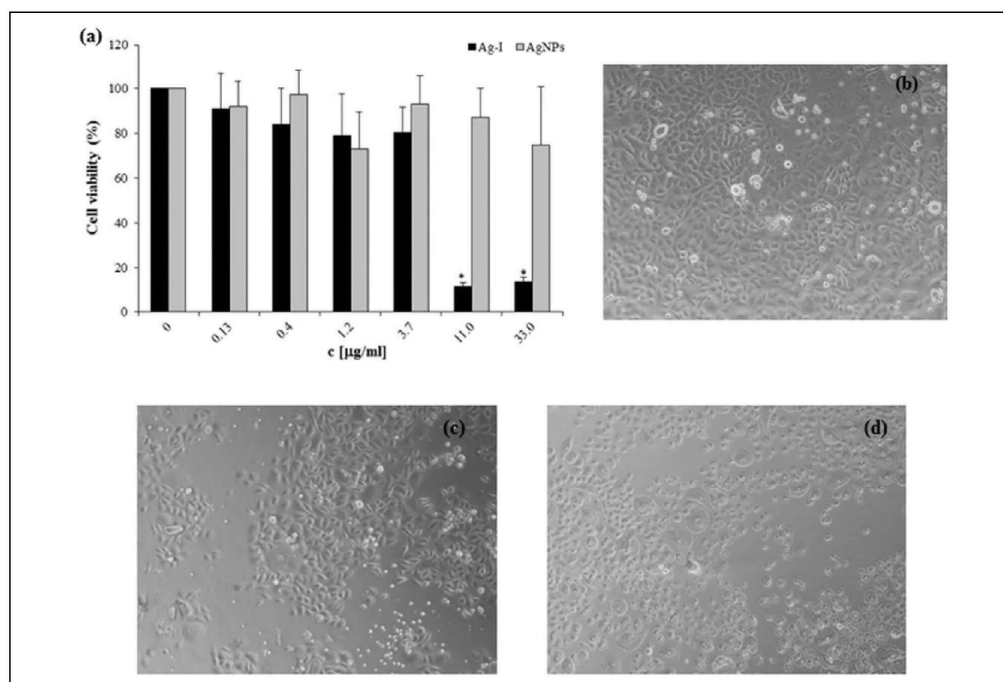


Figure 4. Effects of AgNPs and Ag-I on NHEK viability (a) determined by the MTT assay after 24 h treatment. The viability percentage was normalized to the untreated cells (without AgNPs or Ag-I). The values represent the mean \pm SD of four sets of independent experiments. * $p \leq 0.05$: significant difference from control. Morphological changes were observed after vehicle (b), AgNPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (c)) and Ag-I (11 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (d)). AgNPs: silver nanoparticles; Ag-I: ionic silver; NHEK: normal human epidermal keratinocytes; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; SD: standard deviation.

Table 1. Effect of AgNPs and Ag-I on DNA strand breaks formation in NHDF.^a

	c ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Number of damaged nuclei					Total damage (a.u.)
		0	1	2	3	4	
AgNPs	0	111	3	1	1	1	4.9 \pm 1.5
	1	106	7	0	1	0	6.0 \pm 1.7
	10	104	9	1	0	1	8.9 \pm 1.5
	25	106	7	1	1	1	7.5 \pm 2.3
Ag-I	0	111	2	1	1	1	6.2 \pm 1.4
	0.1	108	4	1	0	0	4.8 \pm 0.6
	0.5	108	4	1	0	1	4.3 \pm 1.4
	1	106	5	0	0	1	5.0 \pm 2.3

AgNPs: silver nanoparticles; Ag-I: ionic silver; NHDF: normal human dermal fibroblasts; SD: standard deviation.

^aToxicity scale (number of damaged nuclei in individual comet class) represents the mean of four sets of independent experiments. The values of total damage represent the mean \pm SD of four sets of independent experiments. No significant difference was found in total DNA damage between the controls (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and AgNPs (1–25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Ag-I (0.1–1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively.

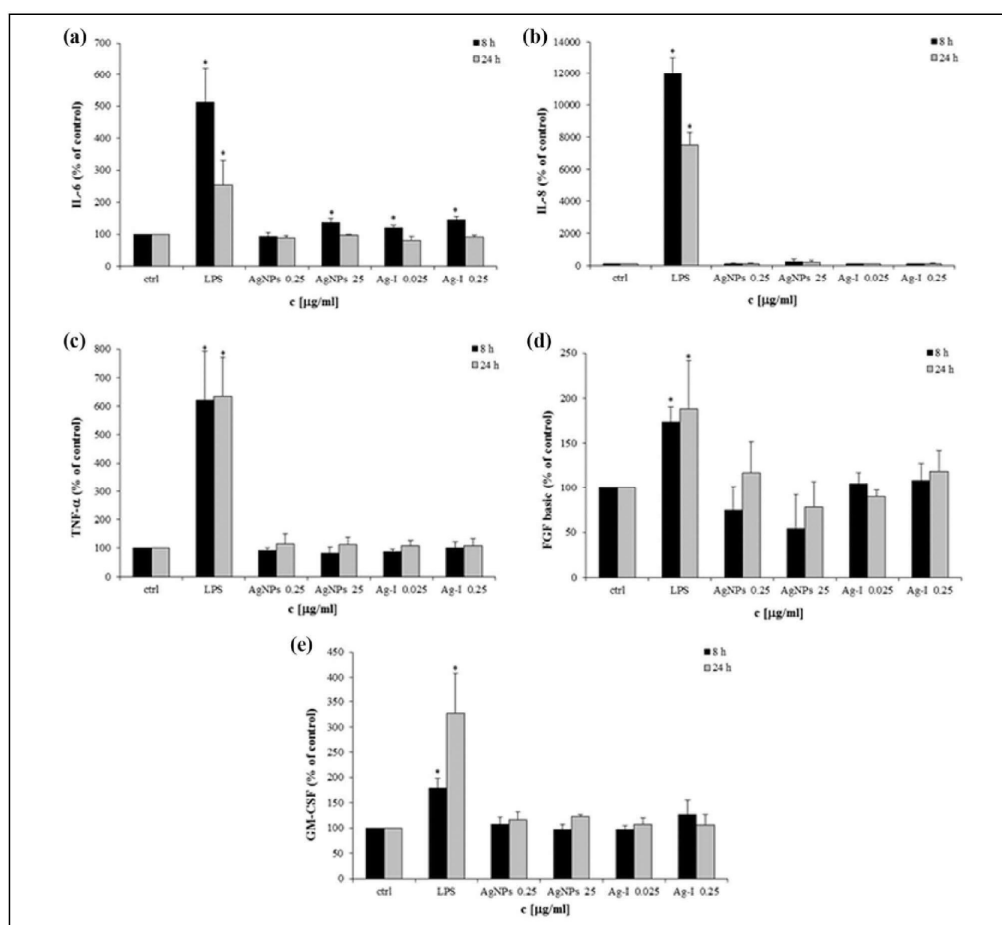


Figure 5. Effects of AgNPs and Ag-I on production of inflammatory markers in NHDF. Cells were treated with AgNPs (0.25 and 25 $\mu\text{g/ml}$) and Ag-I (0.025 and 0.25 $\mu\text{g/ml}$) for 8 and 24 h. As the positive control, cells were treated with LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) for 8 and 24 h. As negative control, cells were treated with medium without AgNPs or Ag-I for 8 and 24 h. The level of IL-6 (a), IL-8 (b), TNF- α (c), FGF basic (d) and GM-CSF (e) in supernatants were determined by ELISA analysis. * $p \leq 0.05$: significant difference from control.

AgNPs: silver nanoparticles; Ag-I: ionic silver; NHDF: normal human dermal fibroblasts; LPS: lipopolysaccharide; IL: interleukin; TNF: tumour necrosis factor; FGF: fibroblast growth factor; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

induced increase in IL-6 protein expression after 8 and 24 h (Figure 6(a) and (c)). No effect was found on COX-2 expression in AgNPs and Ag-I-treated cells after 8 and 24 h as shown in Figure 6(b) and (d).

Discussion

AgNPs are toxic to a wide range of microorganisms and for this reason they are a promising antimicrobial agent.

At the present time, many new products, utilized for the treatment of burns and chronic wound, containing AgNPs are developed. However, some studies also demonstrated that AgNPs may induce significant cytotoxicity in vitro and in vivo. The present study aimed to investigate the potential toxicity of AgNPs and Ag-I using primary skin cells (NHDF and NHEK) and define a range of AgNPs and Ag-I concentration for the intended application as a topical agent for wound healing.

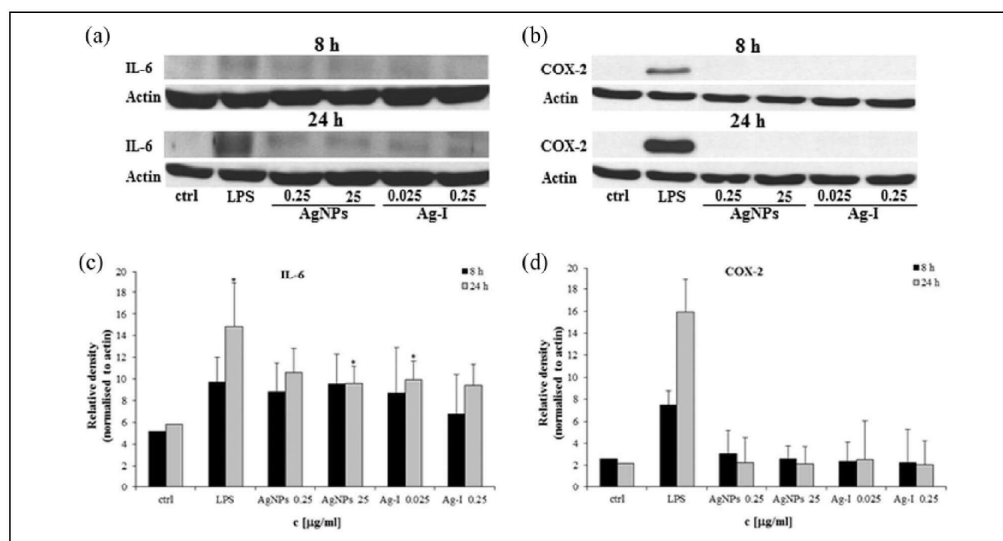


Figure 6. Effects of AgNPs and Ag-I on COX-2 and IL-6 protein expression in NHDF. Cells were treated with AgNPs (0.25 and 25 µg/mL) and Ag-I (0.025 and 0.25 µg/mL) for 8 and 24 h. As the positive control, cells were treated with LPS (10 µg/mL) for 8 and 24 h. As negative control, cells were treated with medium without AgNPs or Ag-I for 8 and 24 h. Panel (a) and (b) show effects on the proteins expression. Panel (c) and (d) represent the quantification of proteins performed by densitometric analysis using ElfoMan 2.6 software. Data are representatives of three independent experiments. * $p \leq 0.05$: significant difference from negative control.

AgNPs: silver nanoparticles; Ag-I: ionic silver; COX-2: cyclooxygenase-2; IL: interleukin; NHDF: normal human dermal fibroblasts; LPS: lipopolysaccharide.

In our study, the cytotoxicity of AgNPs was compared to that of various corresponding concentrations of Ag-I on two types of skin cells (Figure 3 and 4). We found a dramatic difference in cytotoxicity of AgNPs and Ag-I. While AgNPs were non-toxic in the tested range, Ag-I induced significant decrease in NHDF and NHEK viability with the IC_{50} values 3.1 µg/mL and 5.8 µg/mL, respectively. Comparably, Sur et al. did not find toxic effect of AgNPs on NHDF up to a concentration of 50 µg/mL.³¹ In other study, Hidalgo and Domínguez showed cytotoxicity of Ag-I on NHDF lower than 8.2 µmol/L.³⁹ Samberg et al. compared the toxicity of unwashed, washed and carbon-coated AgNPs (20, 50 and 80 nm) on NHEK. They found that 20 nm and 50 nm unwashed AgNPs decreased viability at 1.7 µg/mL and 80 nm AgNPs at 0.34 µg/mL. Washed (20, 50 and 80 nm) and carbon-coated (20 and 35 nm) AgNPs did not affect NHEK viability.⁴⁰ Burd et al. tested the cytotoxicity of five commercially available Ag-based dressings that contained different amounts of AgNPs (Acticoat™ (934 µg/cm²), Aquacel® Ag (21 µg/cm²), Contreet®

Foam (12 µg/cm²), PolyMem® Ag (139 µg/cm²) and Urgotul®SSD (85 µg/cm²) in NHDF and NHEK. They observed that Acticoat™, Aquacel® Ag, and Contreet® Foam which release 12, 13 and 14 µg/mL of Ag in the culture medium were much more toxic than PolyMem® Ag and Urgotul®SSD, which release 4 and 3 µg/mL of Ag in the culture medium.⁴¹ Studies using non-skin cells such as HepG2²³ and RAW 264.7¹⁶ described approximately the same sensitivity of cells to AgNPs and Ag-I. Furthermore, some studies suggest that the cytotoxic effects of AgNPs compared to Ag-I may relate to the size of the NPs. Liu et al. reported that 5 nm AgNPs were more toxic than Ag-I, but 20 nm and 50 nm were less toxic than Ag-I.⁴² Similarly, Piao et al. noted that 5–10 nm AgNPs showed two times higher toxicity than Ag-I.³⁰ Here, we showed that 10 nm AgNPs were less toxic than Ag-I. The discrepancy may be related to the fact that we used a mixture of AgNPs in a range 0–40 nm (Figure 1). These findings suggest that the toxicity of AgNPs and Ag-I depends on the cell type and also on NPs size.

Besides cytotoxicity, AgNPs were reported to cause DNA single-strand breaks. Asharani et al. studied the genotoxicity of AgNPs (6–20 nm) on normal human lung fibroblasts and human glioblastoma (U251) cells after 48 h treatment. They observed an increase in DNA damage with increasing AgNPs concentration up to 400 µg/mL in cancer U251 cells. In the lung fibroblasts, DNA damage increased up to 100 µg/mL and at higher concentrations of AgNPs the damage remained same.²² Ghosh et al. assessed the DNA damage caused by AgNPs (70–125 nm) on human lymphocytes. The greatest damage was found at a concentration of 25 µg/mL after 3 h, whilst at higher concentrations of AgNPs (50–150 µg/mL) DNA damage decreased.²⁰ Piao et al. also found the formation of DNA strand breaks in human liver cells by AgNPs (5–10 nm; 4 µg/mL; 3 h).³⁰ Although our experimental conditions were nearly comparable to those of the above-mentioned studies, we found no DNA strand break production either in AgNPs or in Ag-I-treated cells.

Several studies have also demonstrated that AgNPs induce the release of a number of pro-inflammatory markers in various cell types.^{16–18,29} Asharani et al. reported a threefold increase in IL-6 level, eightfold increase in IL-8 level and moderate increase in GM-CSF in normal human lung fibroblasts.¹⁸ Increased levels of IL-6 and IL-10 were also observed using THP-1 and RAW 264.7 macrophages.^{16,17} Moreover, AgNPs of various sizes (15, 30 and 50 nm) stimulated the secretion of cytokines in alveolar macrophages, particularly TNF- α , IL-1 β and IL 10.^{16,28} In our study, we found moderate increase in IL-6 level in NHDF exposed to AgNPs and Ag-I (Figure 5(a)). However, we observed no changes in the levels of other markers, IL-8, TNF- α , FGF basic or GM-CSF (Figure 5(b) to (e)). Even though the size of the AgNPs was nearly the same, Asharani et al. used a 16-fold higher concentration of AgNPs (400 µg/mL) compared to our study.¹⁸ On the other hand, some studies have described the anti-inflammatory effects of AgNPs.^{43–45} The discrepancy between our results and the results of the above studies could be explained by the AgNPs concentrations used. Moreover, it should be noted that the size, type and source of the AgNPs, manufacturers' synthesis method, type of stabilizer used during the manufacturing process, residues within the AgNPs and also the cell type may influence the response.

Conclusion

Our study showed that Ag-Is were significantly more toxic than AgNPs on NHDF and NHEK. In addition,

non-cytotoxic concentrations of AgNPs and Ag-I did not induce DNA strand breaks and did not affect inflammatory markers, except for transient increase in IL-6 levels in AgNPs and Ag-I-treated NHDF. AgNPs seem to be more suitable for the intended application as a topical agent for wound healing up to the concentration 25 µg/mL though further investigation is necessary to exclude any possible adverse effect such as evaluation of safety after topical application and skin absorption of AgNPs using human skin explants.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by the grant from Palacký University (IGA_LF_2014_014; NA, AG), by the National Programme for Sustainability I (LO1304; AG, JU), by the National Programme for Sustainability LO1305; MS) and by Operational Program Education for Competitiveness – European Social Fund (CZ.1.07/2.3.00/30.0004; VP). We thank the Mgr. Kateřina Čížková (Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University) for the characterization of primary cell cultures (NHDF and NHEK).

Supplemental material

The online [data supplements] are available at <http://het.sagepub.com/supplemental>

References

1. Singh N, Manshian B, Jenkins GJ, et al. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 2009; 30: 3891–3914.
2. The European commission. Commission recommendation of October 18th 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). *Off J Eur Union* 275: 38–40.
3. Imasaka K, Kanatake Y, Ohshiro Y, et al. Production of carbon nanoions and nanotubes using an intermittent discharge in water. *Thin Solid Films* 2006; 506: 250–254.
4. Warner JH, Ito Y, Zaka M, et al. Rotating fullerene chains in carbon nanopeapods. *Nano Lett* 2008; 8: 2328–2335.
5. Chen X and Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoprodukt in medical application. *Toxicol Lett* 2008; 176: 1–12.

6. Chaloupka K, Malam Y and Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. *Trends Biotechnol* 2010; 28: 580–588.
7. Panáček A, Kolár M, Vecerová R, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 2009; 30: 6333–6340.
8. Panáček A, Balzerová A, Pucek R, et al. Preparation, characterization and antimicrobial efficiency of Ag/PDDA-diatomite nanocomposite. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013; 110: 191–198.
9. Jain J, Arora S, Rajwade JM, et al. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Mol Pharm* 2009; 6: 1388–1401.
10. Klasen HJ. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* 2000; 26: 117–130.
11. Klasen HJ. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* 2000; 26: 131–138.
12. Cohen MS, Stern JM, Vanni AJ, et al. In vitro analysis of a nanocrystalline silver-coated surgical mesh. *Surg Infect (Larchmt)* 2007; 8: 397–403.
13. Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN, et al. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns* 2007; 33: 139–148.
14. Rigo C, Ferroni L, Tocco I, et al. Active silver nanoparticles for wound healing. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 4817–4840.
15. Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, et al. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol* 2010; 40: 328–346.
16. Park MV, Neigh AM, Vermeulen JP, et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* 2011; 32: 9810–9817.
17. Martínez-Gutiérrez F, Thi EP, Silverman JM, et al. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 2012; 8: 328–336.
18. Asharani P, Sethu S, Lim HK, et al. Differential regulation of intracellular factors mediating cell cycle, DNA repair and inflammation following exposure to silver nanoparticles in human cells. *Genome Integr* 2012; 3: 2.
19. Park EJ, Bae E, Yi J, et al. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environ Toxicol Pharmacol* 2010; 30: 162–168.
20. Ghosh M, Manivannan J, Sinha S, et al. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutat. Res* 2012; 749: 60–69.
21. Kim YS, Song MY, Park JD, et al. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 2010; 7: 20.
22. Asharani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 2009; 3: 279–290.
23. Kim S, Choi JE, Choi J, et al. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro* 2009; 23: 1076–1084.
24. Lin JJ, Lin WC, Dong RX, et al. The cellular responses and antibacterial activities of silver nanoparticles stabilized by different polymers. *Nanotechnology* 2012; 23: 065102.
25. Hsin YH, Chen CF, Huang S, et al. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett* 2008; 179: 130–139.
26. Lim HK, Asharani PV and Hande MP. Enhanced genotoxicity of silver nanoparticles in DNA repair deficient Mammalian cells. *Front Genet* 2012; 3: 104.
27. Teodoro JS, Simões AM, Duarte FV, et al. Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: a mitochondrial perspective. *Toxicol In Vitro* 2011; 25: 664–670.
28. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B* 2008; 112: 13608–13619.
29. Avalos A, Haza AI, Mateo D, et al. Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells. *J Appl Toxicol* 2014; 34: 413–423.
30. Piao MJ, Kang KA, Lee IK, et al. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol Lett* 2011; 201: 92–100.
31. Sur I, Altunbek M, Kahraman M, et al. The influence of the surface chemistry of silver nanoparticles on cell death. *Nanotechnology* 2012; 23: 375102.
32. Kvítek L, Panáček A and Pucek R. Process for preparing aqueous dispersions of metal nanoparticles. Patent CZ 304160 B6, Czech Republic, 2013.
33. Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, et al. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol Sci* 2008; 101: 239–253.

34. Maines MD, Costa LG, Reed DJ, et al. *Current protocols in toxicology*. New York: John Wiley & Sons, 1998.
35. Monteiro-Riviere NA, Inman AO and Zhang LW. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 234: 222–235.
36. Malíková J, Zdarilová A, Hlobilková A, et al. The effect of chelerythrine on cell growth, apoptosis, and cell cycle in human normal and cancer cells in comparison with sanguinarine. *Cell Biol Toxicol* 2006; 22: 439–453.
37. Ara T, Kurata K, Hirai K, et al. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J Periodontol Res* 2009; 44: 21–27.
38. Asharani PV, Hande MP and Valiyaveetil S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol* 2009; 10: 65.
39. Hidalgo E and Domínguez C. Study of cytotoxicity mechanisms of silver nitrate in human dermal fibroblasts. *Toxicol Lett* 1998; 98: 169–179.
40. Samberg ME, Oldenburg SJ and Monteiro-Riviere NA. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro. *Environ Health Perspect* 2010; 118: 407–413.
41. Burd A, Kwok CH, Hung SC, et al. A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. *Wound Repair Regen* 2007; 15: 94–104.
42. Liu W, Wu Y, Wang C, et al. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. *Nanotoxicology* 2010; 4: 319–330.
43. Tian J, Wong KK, Ho CM, et al. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *Chem-MedChem* 2007; 2: 129–136.
44. Nadworny PL, Wang J, Tredget EE, et al. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver-derived solutions in porcine contact dermatitis. *J Inflamm (Lond)* 2010; 7: 13.
45. Yilma AN, Singh SR, Dixit S, et al. Anti-inflammatory effects of silver-polyvinyl pyrrolidone (Ag-PVP) nanoparticles in mouse macrophages infected with live *Chlamydia trachomatis*. *Int J Nanomedicine* 2013; 8: 2421–2432.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA FYZIKÁLNÍ CHEMIE

**Biologická aktivita nanočástic stříbra vůči eukaryotním
a prokaryotním organismům**

Autoreferát dizertační práce

Mgr. Monika Smékalová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA FYZIKÁLNÍ CHEMIE

Biologická aktivita nanočástic stříbra vůči eukaryotním a prokaryotním organismům

Autoreferát dizertační práce

Mgr. Monika Smékalová

Školitel: doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.
Konzultant: doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

Uchazeč: Mgr. Monika Smékalová

Katedra fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Školitel: doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.

Katedra fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Oponenti:

Místo a termín obhajoby:

Místo, kde bude možné se s dizertační prací a posudky alespoň 14 dnů před vykonáním obhajoby seznámit:

Obsah

Úvod	4
Teoretická část.....	5
1. Nanočástice stříbra	5
2. Antimikrobiální aktivita AgNP a synergie s antibiotiky	6
3. Rezistence k AgNP	8
4. Toxicita Ag.....	9
Experimentální část	11
7. Synergický účinek AgNP a antibiotik vůči zvířecím bakteriím	11
8. Synergie AgNP a antibiotik vůči bakteriím citlivým k antibiotikům	16
9. Synergie AgNP a antibiotik vůči multirezistentním enterobakteriím	20
10. Tvorba rezistence bakterií k AgNP a její překonání.....	26
11. Vliv média a stabilizačního činidla na toxicitu AgNP vůči <i>Daphnia magna</i>	33
Závěr.....	40
Summary.....	42
Seznam použitých zkratk.....	44
Reference.....	46
Seznam publikací.....	51

Úvod

Nanočástice stříbra (AgNP) získaly v posledních desítkách let velkou pozornost mimo jiné díky jejich výrazné antimikrobiální aktivitě. V současnosti je předmětem výzkumu i synergický účinek nanočástic stříbra a antibiotik vzhledem k vývoji a rychlému rozšiřování bakteriální rezistence k antibiotikům. Slibným řešením problematiky vzrůstající bakteriální odolnosti je obnovení účinku antibiotik pomocí kombinace s jinou antibakteriální látkou. Kombinace antibiotik s AgNP přináší několik výhod, mezi něž patří minimalizace požadované dávky antibiotika, potlačení vývoje bakteriální rezistence a zvýšení efektivity podávaného antibiotika. Část dizertační práce se proto zabývá studiem zvýšené aktivity antibiotik v kombinaci s AgNP.

Předpokládané využití AgNP samostatně nebo v kombinaci s antibiotiky při léčbě infekcí vedlo k myšlence ověřit, zda si bakterie mohou k AgNP také vytvořit rezistenci stejně jako k antibiotikům. Další podstatné téma dizertační práce je tedy zaměřeno na vznik a popis mechanismu rezistence bakterií k AgNP po dlouhodobé a opakované expozici AgNP. Je také popsán způsob, jak tuto rezistenci překonat.

Vzhledem k rozsáhlému využití AgNP lze předpokládat, že se částice budou uvolňovat do životního prostředí. Toxicita AgNP je proto intenzivně studována a mnoho těchto studií jednoznačně prokázalo vysokou toxicitu k vodním organismům. Součástí dizertační práce je studium chronické toxicity AgNP vůči *Daphnia magna* v závislosti na koncentraci živného média a užití povrchového stabilizátoru, což výrazně ovlivňuje stabilitu AgNP a tím ve výsledku jejich dlouhodobou toxicitu.

Teoretická část

12. Nanočástice stříbra

Nanoobjekty (objekty o rozměrech 1 až 100 nm) se vyznačují odlišným fyzikálně-chemickým chováním od makroobjektů. Důvodem těchto odlišností je vzrůstající podíl atomů na povrchu částice ku celkovému počtu atomů s klesajícím rozměrem částice. Důležité postavení mají nanočástice kovů, zejména nanočástice stříbra, které se dají se využít např. v heterogenní katalýze, povrchem zesílené Ramanově spektroskopii nebo v biologických aplikacích.¹⁻³

Intenzivní zbarvení zejména vodných disperzí nanočástic kovů je způsobeno povrchovou plazmonovou rezonancí (SPR). Povrchový plazmon je jev, který se vysvětluje jako koherentní oscilace vodivostních elektronů po interakci s dopadajícím elektromagnetickým zářením. Elektrony se pohybují ve fázi shodné s budící vlnou, a pokud je frekvence tohoto elektromagnetického pole v rezonanci s koherentním pohybem elektronů, dojde k silné absorpci záření. Pro nanočástice stříbra nastává rezonance ve viditelné části spektra a částice ve vodné disperzi se tak jeví barevné.⁴ S rostoucí velikostí částic dochází k posunu maxima plazmonové absorpce k vyšším vlnovým délkám.⁵

Rozptylu světla na koloidních částicích lze využít ke stanovení jejich průměrné velikosti. Použijeme-li laser jako zdroj koherentního záření, dochází k interferenci rozptýleného záření, která toto záření zesiluje nebo zeslabuje. Neustálý Brownův pohyb koloidních částic způsobuje fluktuace intenzity rozptýleného záření v čase kolem průměrné hodnoty, jedná se o dynamický rozptyl světla. Z časového průběhu kolísání intenzity lze zjistit rychlost pohybu částic a následně jejich rozměr. Na tomto principu je založena metoda měření distribuce velikosti částic zvaná Dynamic Light Scattering – DLS.⁶

Nanočástice stříbra jsou nejčastěji připravovány ve formě vodných disperzí. Velikost připravených částic, morfologii, nebo polydisperzitu lze měnit poměrem a koncentrací reakčních složek, pH, teplotou nebo iontovou silou roztoku a volbou redukčního činidla. Polymerní a povrchově aktivní látky pak ovlivňují stabilitu koloidní disperze. Částice lze poté charakterizovat pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM), DLS a UV/Vis spektroskopii. Populárními metodami přípravy jsou chemické redukce za použití různých organických a anorganických redukčních činidel, elektrochemické postupy přípravy a radiolýza. Jednoduchý způsob přípravy představuje Tollensův postup, který spočívá v redukci amoniakálního komplexního kationtu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ redukujícími sacharidy.⁷

Lyofobní koloidy obecně nejsou agregátně stálé a koloidně dispergovaná látka se snadno vylučuje např. při změně pH nebo přidavkem elektrolytu ve formě aglomerátů nebo agregátů primárních částic. Otázku stability disperzí elektricky nabitých nanočástic kovů popisuje teorie DLVO (Derjagin,

Landau, Verwey, Overbeek).⁸ Základní myšlenkou této teorie je vzájemné soupeření přitažlivých a odpudivých sil mezi dvěma koloidními částicemi. Pokud převáží síly odpudivé, vyvolané především elektrostatickou repulzí, nedojde ke styku částic, avšak převáží-li přitažlivé síly, vyvolané disperzními přitažlivými interakcemi (van der Waalsovými interakcemi), dojde k jejich spojení.

Povrch koloidních částic nese elektrický náboj, který má význam pro jejich stabilitu a chování v elektrickém poli. Nabitá částice přitahuje protionty a na jejím povrchu tak vzniká elektrická dvojrstva. Existuje několik modelů, které elektrickou dvojrstvu popisují. Nejrozšířenějším modelem je Gouy-Chapman-Sternův model, kterým se dají vysvětlit mnohé rysy chování nanočástic v roztoku elektrolytu.⁹ Blíže u povrchu je adsorpcími silami vázána kompaktní Sternova vrstva, na kterou navazuje difúzní část tvořená ionty přitahovanými elektrostatickými silami, která se nepohybuje s částicí. Na rozhraní pohyblivé a nepohyblivé části, tzv. pohybovém rozhraní, se ustavuje elektrokinetický potenciál (zeta potenciál, ζ -potenciál). Čím vyšší je jeho hodnota, tím stabilnější jsou částice díky silnějšímu elektrostatickému odpuzování částic. Zvýšení povrchového náboje částic tedy znamená větší agregační stabilitu. Přídavkem indiferentního elektrolytu se zvýší koncentrace protiontů, stlačí se elektrická dvojrstva, klesne elektrokinetický potenciál a spolu s ním i stabilita částic. Z hlediska agregační stability je také důležitá hodnota pH, protože povrchový náboj může být ovlivněn disociací funkčních skupin na povrchu a adsorpcí H_3O^+ a OH^- .⁹ Zvýšení stability naopak může být dosaženo adsorpcí ionických povrchově aktivních látek (PAL), které zvyšují povrchový náboj a tím i elektrostatickou repulzi.⁷

13. Antimikrobiální aktivita AgNP a synergie s antibiotiky

Antimikrobiální vlastnosti nesou různé druhy kovových nanočástic, nanočástice stříbra se však jeví nejefektivnější, ať už vůči bakteriím, virům, plísním nebo jiným mikroorganismům.^{10–15}

Stříbrné ionty jsou velmi silným baktericidem. Dezinfekce pomocí kovového stříbra a jeho sloučenin je známá už staletí. V současné době však nachází stříbro uplatnění ve formě zdravotnických prostředků jako je sterilní krytí, endotracheální trubice, katetry či cévní náhrady pro eliminaci lokálních bakteriálních infekcí a tvorby bakteriálního biofilmu^{16–19}. V druhé polovině 20. století se začala zkoumat i antimikrobiální aktivita koloidního stříbra. Od té doby bylo publikováno tisíce prací na téma antibakteriální aktivity AgNP, velké množství studií se pak věnuje antivirálním a antimykotickým účinkům AgNP. AgNP jsou toxické i pro multirezistentní bakterie jako *S. typhus*,²⁰ MRSA,¹¹ *P. aeruginosa*,²¹ a mnoho dalších.

V současnosti se rozmáhá vývoj textilních materiálů s antibakteriální složkou.²² Tyto textilie pak mohou být využity pro výrobu funkčního oblečení, jako sterilní krytí při léčbě popálenin nebo různých

infekcí, na elektromagnetické stínění nebo jako membrány do filtrů na čištění vody.^{23,24} Výkumy také podporují myšlenku využití AgNP v medicíně např. k povrchové úpravě nástrojů nebo kontaktních čoček.^{3,25}

Má se za to, že za antibakteriální aktivitu jsou zodpovědné ionty stříbra uvolněné z povrchu nanočástic, avšak některé studie prokázaly, že antimikrobiální aktivita je spojena i s malým rozměrem částic.^{26,27} Zdá se, že AgNP působí na bakterie na několika úrovních. V přítomnosti AgNP dochází k rychlé tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), které mají za následek oxidativní stres.²⁸ Způsobují morfologické změny, rozpad buněčné stěny a membrány,²⁹ interagují s thiolovými skupinami proteinů účastnících se metabolických procesů,³⁰ způsobují kondenzaci DNA a ztrátu replikační schopnosti,³¹ deaktivují enzymy respiračního řetězce³² atd.

Antibakteriální aktivita AgNP závisí na jejich velikosti.^{11,33–36} Menší AgNP mají větší plochu povrchu vzhledem k objemu a do kontaktu s bakterií přijde velká část oblasti povrchu, proto s bakteriemi více interagují. Nejúčinnější se zdají být AgNP o průměrných velikostech nižších než 10 nm.³⁵ Morfologie částic je také určujícím parametrem antibakteriální aktivity. Např. podle práce autorů Pal a kol. trojhranné zkosené nanočástice inhibují bakteriální růst při 50–100krát menších koncentracích než sférické nanočástice.³⁷

Jednou z možností, jak bojovat proti infekcím způsobeným bakteriemi rezistentními k antibiotikům je kombinovaná terapie, kdy je antibiotikum posíleno jinou antimikrobiální nebo neantimikrobiální látkou (jiná antibiotika, kardiovaskulární léčiva, inhibitory beta-laktamáz atd).³⁸ V kombinaci s AgNP jsou antibiotika jednoznačně efektivnější bez ohledu na mechanismus účinku a chemickou strukturu antibiotika.^{39–43} Díky kombinaci se zvyšuje účinnost podávaného antibiotika, snižuje se potřebná dávka antibiotika i AgNP a tím se snižuje jejich toxicita vůči buňkám hostitelského organismu. Obnovuje se také schopnost antibiotika zabít bakterie, které k němu byly rezistentní.

Mechanismem synergie by mohlo být např. usnadnění prostupu antibiotika změnou permeability membrány nebo kooperace při její destrukci. V případě beta-laktamových antibiotik by mohly AgNP inhibovat beta-laktamázy produkované rezistentními bakteriemi, které hydrolyticky štěpí beta-laktamový kruh antibiotik. Synergie může být spojena s tvorbou hydroxylových radikálů, změnou ochranných funkcí buňky a antibiofilmovou aktivitou.⁴³ AgNP mohou zvyšovat lokální koncentraci navázaných molekul antibiotika v jednom bodě na povrchu buňky a mohou usnadňovat transport antibiotika k povrchu bakterie.³⁹

Na synergický účinek má vliv velikost AgNP. Habash a kol. testovali synergii pro 10nm, 20nm, 40nm, 60nm a 100nm AgNP s aztreonamem u *P. aeruginosa*. Částice větší než 40 nm žádnou interakci po kombinaci s antibiotikem neprojevily.⁴⁴ Synergický účinek také závisí na stabilizačním činidle. V práci Kora a kol. byl kombinovaný účinek významější u AgNP stabilizovaných

polyvinylpyrrolidonem (PVP) než u AgNP stabilizovaných dodecyl sulfátem sodným (SDS) nebo citrátem.⁴⁵

14. Rezistence k AgNP

Mikroorganismy rezistentní k těžkým kovům se běžně ve vodách v přírodě vyskytují.⁴⁶ Významnými zdroji stříbra, kterým jsou bakterie vystaveny, jsou např. vody z čističek odpadních vod nemocnic nebo továren. Rozsáhlé využívání AgNP ve spotřebitelské sféře také vede ke zvyšování množství stříbra v životním prostředí.⁴⁷ Determinanty rezistence ke stříbru jsou velmi rozšířené a díky jejich lokalizaci na mobilních genetických elementech se usnadňuje horizontální přenos uvnitř ekosystému, což může dále vést k rozšíření nových fenotypů mezi bakteriální populace.⁴⁸

Obecně bakterie využívají mnoho způsobů, jak se zbavit těžkých kovů, ať už pasivních nebo aktivních. Např. využívají extracelulární polymerní látky (EPS), které kovy komplexují.⁴⁹ Vnější membrána produkuje enzymy, které oxidují kovy, a vnější membránové vezikuly, které kovy vylučují.^{50,51} Modifikací transportních systémů v cytoplazmatické membráně mohou bakterie předcházet průniku částic kovů do buňky.⁵² Existují také nepřímé mechanismy, které napravují škody způsobené kovy – např. eliminace ROS, reparace DNA nebo hydrolýza abnormálně složených proteinů.^{53–55}

Bakterie rezistentní ke stříbru byla poprvé izolována v roce 1960 z popáleniny, která byla ošetřována dusičnanem stříbrným.⁵⁶ Mechanismus rezistence ke stříbru byl poprvé popsán u Gram-negativní bakterie *Salmonella enterica* sérovar Typhymurim u pacienta s popáleninami v roce 1975. Doměným modelem této rezistence kódované na plazmidu pMG101 je transport přes ATPázu SilP, efluxní systém SilCFBA a periplazmatický chaperon pro přenos stříbra SilE.⁵⁷ Asiani a kol. popisují, že SilE mění svoji konformaci v přítomnosti stříbra, funguje jako molekulární houba a jako první obrana proti stříbru, které začíná pronikat do periplazmy.⁵⁸ Od té doby byly bakterie rezistentní na stříbro izolovány z klinického prostředí opakovaně.^{59–61}

Bakteriální rezistence byla dosud zkoumána především u iontového stříbra. Mechanismem takovéto rezistence může být eliminace iontů stříbra na méně toxické nižší oxidační stavy, nicméně více se uplatňuje aktivní eflux iontů stříbra z buňky.^{60,62–64} Společně s aktivním efluxem hraje výraznou roli v rezistenci k iontům stříbra snížená permeabilita membrány.⁶⁵ Co se týká stříbra v nanočásticové formě, Gunawan a kol. studovali odezvu *Bacillus* sp. na dlouhodobou a opakovanou expozici nanočástic oxidu stříbra v matrici TiO₂. Pozorovali vznik rezistence u bakterie *Bacillus subtilis*, která po dlouhodobé expozici stříbru začala dominovat v populaci mikrobiot. Ukázali, že *B. subtilis* má přirozenou schopnost adaptovat se na oxidativní stres způsobený iontovým stříbrem uvolněným z kompozitu.⁶⁶ Khan a kol.

objevili, že *Bacillus pumilus* izolovaný z odpadních vod měl stejnou růstovou křivku v přítomnosti i nepřítomnosti AgNP. Ukázalo se, že mechanismus tolerance této bakterie k AgNP je nadměrná produkce exopolysacharidů, které obalí nanočástici a znemožní tak její interakci s buněčnou stěnou bakterie.⁶⁷ V další studii, u bakterie *Escherichia coli* byla rezistence vyvolána opakovanou expozicí AgNP. Po 225 opakováních projevila exponovaná populace větší viabilitu než kontrolní skupina v přítomnosti různých koncentrací AgNO₃ a 10nm AgNP modifikovaných citrátem⁶⁸

15. Toxicita Ag

Hlavními faktory, které způsobují cytotoxicitu AgNP, jsou vznik ROS a uvolňování iontů stříbra, které právě vznik ROS katalyzují v přítomnosti různých forem kyslíku. AgNP a uvolněné stříbrné ionty interagují především s thiolovými skupinami molekul v cytoplazmě, buněčné membráně a membráně mitochondrií a dostávají se do jádra, kde poškozují DNA. Na reakci exponovaných buněk má vliv mnoho faktorů jako, tvar, povrchová úprava AgNP nebo typ buněk.^{69–72} Významným faktorem je velikost AgNP. Malé AgNP mají větší plochu povrchu, jsou aktivnější, snáze se rozpouští a katalyzují vznik ROS. Navíc lépe pronikají do buňky a skrze biologické bariéry.

AgNP samy o sobě v koncentraci nižší než 30 mg/l nejsou cytotoxické pro lidské buňky^{12,73} a mohou tedy být potenciálně používány pro terapeutické účely, např. při lokálním ošetření ran, kde jsou jednoznačně vhodnější než iontové stříbro, a to do koncentrace 25 mg/l, jak jsme publikovali.⁸ Ukázalo se totiž, že iontové stříbro výrazněji ovlivňuje životaschopnost buněk než AgNP a zvyšuje hladinu zánětlivých markerů.

Pro vodní organismy jsou AgNP toxické na různých trofických úrovních – řasy, sinice, vodní rostliny, mušle, korýši, ryby apod. Většina studií vede k závěru, že toxicita je způsobena uvolněnými ionty stříbra s povrchu AgNP, zatímco jiní autoři se přiklání k teorii, že toxicita je spojena s charakterem částic nebo kombinací obojího.^{74–76} Je známo, že AgNP způsobují oxidativní stres a mění aktivitu antioxidantních enzymů ve vodních rostlinách i zvířatech.^{76–79}

Mnoho akutních ale i chronických toxicitních studií provedených s korýši *Daphnia* spp. prokázalo toxický vliv v různých koncentracích AgNP (μg/l–mg/l) v závislosti na metodě přípravy částic, jejich velikosti, povrchové modifikaci, náboji apod.⁸⁰ Více než 70 % AgNP vstupuje do organismu korýše příjmem řas jako potravy.^{80,81} Následně se stříbro akumuluje v těle kolem žaber a střev.⁸² U exponovaných novorozenců byla zaznamenána menší velikost těla, změny stravování, menší

⁸ Výsledky publikovány v: Galandáková, A., Franková, J., Ambrožová, N., Habartová, K., Pivodová, V., Zálešák, B., Šafářová, K., **Směkalová, M.** a Ulrichová, J. Effects of silver nanoparticles on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Human and Experimental Toxicology* 35(9), 946–957 (2016).

zásoby hnědé tukové tkáně a léze.⁸³ Také je ovlivněna schopnost pohybu ve vodě a dochází k poškození DNA.⁸⁴⁻⁸⁶

Ve vodním prostředí je stabilita AgNP ovlivněna působením různých faktorů, mění se tím jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, a tedy i toxicita. Agregace a rozpouštění závisí na pH, iontové síle a přítomnosti oxidačních činidel a jiných sloučenin. Důležitost složení média byla zdůrazněna v mnoha současných studiích.⁸⁷⁻⁹⁰ V současnosti bylo publikováno několik málo studií, které se zabývaly vlivem dlouhodobého působení zředěných médií na stabilitu AgNP s různými stabilizačními činidly.^{91,92} Ukázalo se, že použité médium musí být zředěno desetkrát, aby se předešlo agregaci částic, zatímco životaschopnost organismů při těchto podmínkách nebyla ovlivněna. Römer et al. objevili, že akutní toxicita AgNP stabilizovaných citrátom vůči *D. magna* vzrůstá s ředěním média.⁹³ Chronická toxicita AgNP vůči dafniím ve zředěném médiu však nebyla toho času publikována.

Dosud provedené studie na lidech neodhalily významné nebezpečí plynoucí z dlouhodobé expozice stříbru. Munger a kol. provedli studii na lidech, kteří byli exponováni orálně AgNP o koncentraci 10 ppm po dobu 3, 7 a 14 dní a AgNP o koncentraci 32 ppm po dobu 14 dní. Nebyly zjištěny žádné významné metabolické, hematologické, urinální nálezy, žádné morfologické změny srdce, plic nebo abdominálních orgánů.⁹⁴ Sledování pracovníků v továrně, kteří pracují s AgNP a jsou vystaveni nízkým dávkám stříbrného prachu a rozpuštěného stříbra v mezních hraničních hodnotách, neukázalo žádný negativní dopad na jejich zdraví.⁹⁵ Při testování dermální toxicity výrobku Acticoat obsahem AgNP určeného ke sterilnímu krytí rán s nebyly u 30 pacientů prokázány žádné biochemické nebo hematologické indikátory toxicity.⁹⁶

Nízká toxicita u lidí může být zapříčiněna tím, že tělní tekutiny obsahují velké množství chloridových a sulfidových iontů, které se stříbrnými ionty tvoří nerozpustné soli.⁹⁷

Experimentální část

16. Synergický účinek AgNP a antibiotik vůči zvířecím bakteriím^h

Sférické AgNP o průměrné velikosti částic 28 nm (AgNP-28nm) byly syntetizovány pomocí známé modifikované Tollensovy metody,¹¹ jejíž principem je redukce diaminstříbrného komplexu sacharidy. Syntéza probíhala následujícím způsobem. Smícháním roztoku AgNO₃ s NH₃ vznikl komplex [Ag(NH₃)₂]⁺. Poté bylo pH upraveno roztokem NaOH a jako redukční činidlo byla použita D-maltóza. Konečné koncentrace reagensů byly: AgNO₃ 1·10⁻³ mol/l, NH₃ 5·10⁻³ mol/l, NaOH 9,6·10⁻³ mol/l a D-maltóza 1·10⁻² mol/l. Takto připravená disperze AgNP měla koncentraci stříbra 108 mg/l.

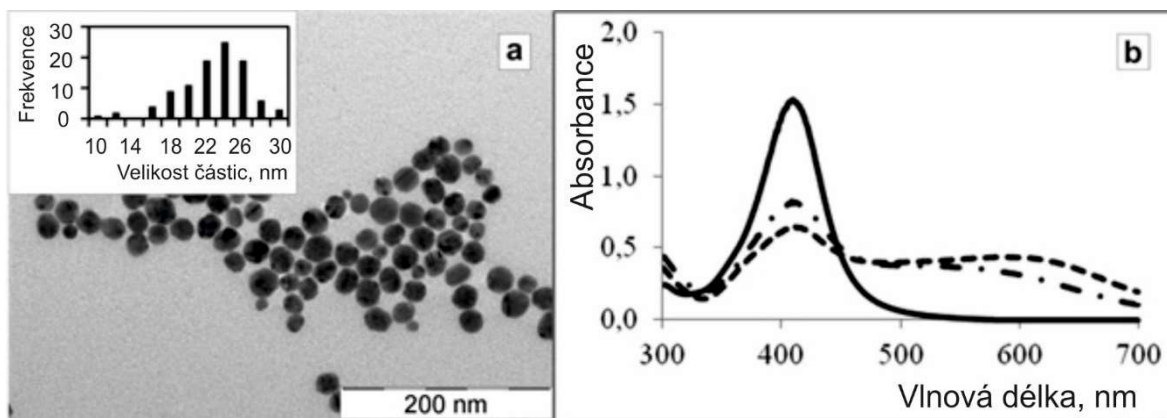
Pro stabilizaci AgNP byla do připravené disperze přidána želatina o výsledné koncentraci 0,5 % pro testy probíhající v živném médiu Müller-Hinton (M.-H.) a 0,1 % pro testy probíhající v médiu BHI (brain-heart infusion broth, bujón z mozkosrdcové infuze).

AgNP o průměrné velikosti 8 nm (AgNP-8nm) se připravovaly obdobně. Jako redukční činidlo byl použit tetrahydridboritan sodný. Konečné koncentrace reagensů byly: AgNO₃ 1·10⁻² mol/l, NH₃ 5·10⁻² mol/l, Na[BH₄] 2·10⁻² mol/l. Pro stabilizaci takto připravených AgNP se před redukcí přidala do reakčního systému PAA o výsledné koncentraci 0,18 %. Výsledná koncentrace stříbra v disperzi AgNP byla 1080 mg/l.

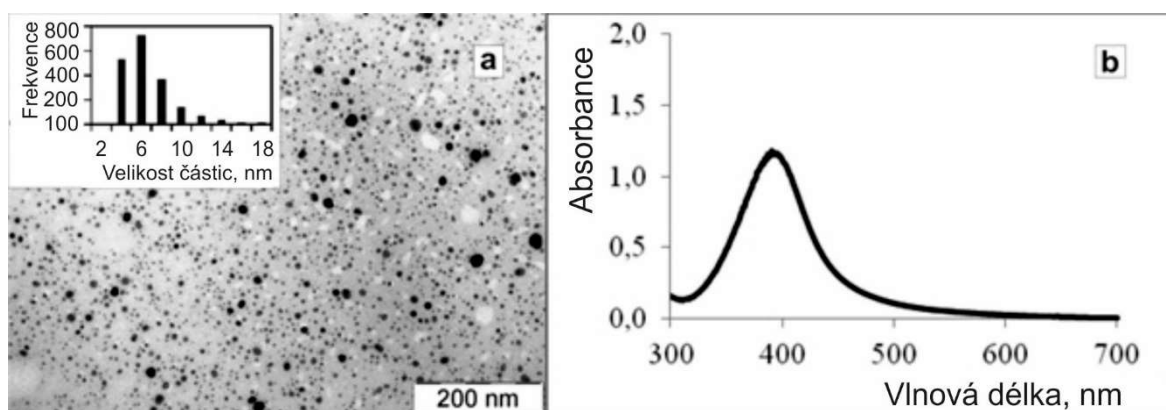
Průměrná velikost AgNP určená pomocí metody DLS byla následně ověřena TEM (obr. 1a a 2a). V UV/Vis spektrech připravených AgNP byly zaznamenány absorpční pásy s maximy při 409 nm (AgNP-28nm) a 392 nm (AgNP-8nm), což je charakteristické pro částice nanometrových rozměrů (obr. 1b a 2b).

Po smíchání nestabilizovaných AgNP-28nm s kultivačními médii došlo k částečné agregaci, jak bylo zřejmé i z UV/Vis spekter, kde se objevily sekundární píky v oblasti vyšších vlnových délek (obr. 1b). Sekundární absorpční píky v oblasti 550 nm až 650 nm se objevují, když částice podléhají agregaci.¹³ V případě AgNP-28nm v médiu BHI bylo potřeba použít větší množství želatiny než pro médium M.-H., jelikož BHI obsahuje vyšší koncentraci elektrolytů a proteinů. AgNP-8nm, které se připravovaly za přítomnosti PAA byly v médiích stabilní.

^h Výsledky publikovány v: **Smékalová, M., Aragon, V., Panáček, A., Pucek, R., Zbořil, R. a Kvítek, L.** Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. *The Veterinary Journal* 209, 174–179 (2016).



Obrázek 1. Snímek z TEM (a) a UV/Vis absorpční spektra AgNP-28 nm připravených redukcí $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ D-maltózou (plná čára) a absorpční spektra AgNP po smíchání s médiem MH (čerchovaná čára) a médiem BHI (čárkovaná čára) (b). Vložený histogram vyhodnocený z korespondujícího snímku TEM zobrazuje distribuci velikosti AgNP.



Obrázek 2. Snímek z TEM (a) a UV/Vis absorpční spektrum (b) AgNP-8nm připravených redukcí AgNO_3 borohydridem. Vložený histogram vyhodnocený z korespondujícího snímku TEM zobrazuje distribuci velikosti AgNP.

Bakteriální kmeny izolované ze zvířecích tkání byly získány ze sbírky centra CReSA (Španělsko). Bakteriální kmeny *S. enterica*, *S. aureus*, *E. coli* a *S. uberis* GP1037 byly kultivovány v kultivačním médiu M.-H. a kmeny *A. pleuropneumoniae* (suplementováno 1% IsoVitaleXem) a *P. multocida* v médiu BHI.

Minimální inhibiční koncentrace antibiotik, AgNP a jejich kombinací byly určeny pomocí mikrodiluční „šachovnicové“ metody za použití mikrotitrační destičky s 96 jamkami. Antibiotika byla postupně ředěna médiem dvakrát ve vodorovném směru a ve vertikálním směru byly přidány AgNP

taktéž sériově ředěné médiem dvakrát. Bakteriální citlivost byla hodnocena podle dokumentu VET01-A3 Institutu pro klinické a laboratorní standardy (CLSI).⁹⁸

Z určených minimálních inhibičních koncentrací (MIC) byl následně vypočítán frakční inhibiční koncentrační index (FIC) podle vzorce (1), kdy byl kombinovaný antibakteriální účinek hodnocen podle následujících kritérií: synergie ($FIC \leq 0,5$), aditivita ($0,5 < FIC \leq 1$), indiference ($1 < FIC \leq 2$) a antagonismus ($FIC > 2$).

$$FIC = \frac{\text{MIC A v kombinaci s B}}{\text{MIC A}} + \frac{\text{MIC B v kombinaci s A}}{\text{MIC B}}, \quad (1)$$

kde A a B jsou antibakteriální látky.

Dosažené výsledky antibakteriální aktivity samotných AgNP jsou prezentovány v tabulce 1. Antibakteriální účinek se projevil především u Gram-negativních bakterií. Růst Gram-pozitivních bakterií byl inhibován méně, avšak přesné určení hodnoty MIC AgNP-28nm bylo omezeno danou koncentrací disperze při přípravě (108 $\mu\text{g/ml}$) a testovaná koncentrace mohla být maximálně poloviční. Disperze AgNP byla nejprve naředěna na 100 $\mu\text{g/ml}$ a poté se médiem na destičce naředila na polovinu, tedy 50 $\mu\text{g/ml}$. Menší AgNP (8 nm) měly silnější antibakteriální účinky (tab. 1). Mohou totiž snadněji pronikat póry v buněčné membráně, uvolnit větší množství iontů stříbra a generovat více ROS.⁹⁹ Větší plocha povrchu ku objemu činí navíc AgNP více reaktivní.¹⁰⁰ Růst Gram-pozitivních bakterií byl inhibován méně než Gram-negativních. Tento fakt může být připsán tenčí peptidoglykanové vrstvě Gram-negativních bakterií ve srovnání s pevnou peptidoglykanovou buněčnou stěnou Gram-pozitivních bakterií.

Tabulka 1. MIC [$\mu\text{g/ml}$] nanočástic stříbra o průměrných velikostech 28 nm a 8 nm.

Bakterie	AgNP-28nm	AgNP-8nm
<i>S. enterica</i> (G-) ^a	25	12,5
<i>S. aureus</i> (G+)	> 50	25
<i>E. coli</i> (G-)	25	6,3
<i>A. pleuropneumoniae</i> (G-)	50	25
<i>S. uberis</i> (G+)	> 50	100
<i>P. multocida</i> (G-)	6,3	6,3

^a – G+, Gram-pozitivní bakterie; G-, Gram-negativní

Výsledky společného antibakteriálního efektu testovaných antibiotik a AgNP jsou uvedeny v tabulkách 2 až 5. V případě ampicilinu se MIC samotného antibiotika proti testovaným bakteriím pohybovaly v rozmezí 0,25 až > 32 $\mu\text{g/ml}$ (tab. 2). MIC amoxicilinu vůči *E. coli* a *A. pleuropneumoniae*

byla > 32 µg/ml, přičemž breakpoint (hraniční koncentrace antibiotika, která definuje mikroorganismus jako citlivý nebo rezistentní dle jeho MIC) je ≥ 32 µg/ml a tyto kmeny byly tedy k amoxicilinu rezistentní. Pouze v případě amoxicilinu kombinovaného s AgNP-28nm byla antibakteriální aktivita synergní s FIC indexem 0,4. Synergie bylo dosaženo kombinací 12,5 µg/ml AgNP s 8 µg/ml amoxicilinu proti rezistentní *A. pleuropneumoniae*. Při této kombinaci došlo k poklesu MIC antibiotika pod breakpoint a tedy k obnově bakteriální citlivosti. V ostatních případech byl pozorován pouze aditivní nebo indiferentní účinek.

Tabulka 2. MIC [µg/mL] amoxicilinu (Amx) a výsledky kombinace amoxicilinu s AgNP

Bakterie	MIC v kombinaci				účinek ^b	MIC v kombinaci			
	MIC Amx	AgNP-28nm	Amx	FIC		AgNP-8nm	Amx	FIC	účinek
<i>S. enterica</i> (G-) ^a	1	25	1	2,0	I	12,5	1	2,0	I
<i>S. aureus</i> (G+)	2	25	1	0,8	A	12,5	0,5	0,8	A
<i>E. coli</i> (R) ^c	> 32	25	> 32	2,0	I	6,3	> 32	2,0	I
<i>App</i> ^d (R, G-)	> 32	12,5	8	0,4	S	12,5	8	0,6	A
<i>P. multocida</i> (G-)	0,25	6,3	0,25	2,0	I	6,3	0,25	2,0	I
<i>S. uberis</i> (G+)	0,25	> 50	0,25	2,0	I	50	0,125	1,0	A

a – G+, Gram-pozitivní bakterie; G-, Gram-negativní bakterie

b – S, synergie; A, aditivita; I, indiference

c – R, rezistentní k amoxicilinu

d – *App*, *A. pleuropneumoniae*

V případě testování antibakteriálního účinku Penicilinu G v kombinaci s AgNP byly dosaženy podobné výsledky jako v případě amoxicilinu (tab. 3). MIC samotného penicilinu se pohybovaly v rozmezí 0,03 až > 32 µg/ml. *S. aureus* (MIC 1 µg/ml, breakpoint ≥ 0,25 µg/ml), *E. coli* (MIC > 32 µg/ml, breakpoint ≥ 4 µg/ml) a *A. pleuropneumoniae* (MIC > 32 µg/ml, breakpoint ≥ 4 µg/ml) byly k penicilinu rezistentní. Nejlepší výsledky byly dosaženy při kombinaci 6,3 µg/ml AgNP-8nm se 2 µg/ml penicilinu proti *A. pleuropneumoniae*, kdy se FIC index rovnal 0,3. Tento synergní účinek byl nejsilnější ze všech provedených experimentů. V ostatních případech byl pozorován pouze aditivní nebo indiferentní účinek.

Tabulka 3. MIC [$\mu\text{g}/\text{mL}$] penicilinu G (Pen) a výsledky kombinace penicilinu s AgNP

Bakterie	MIC Pen	MIC v kombinaci				účinek ^b	MIC v kombinaci			
		AgNP-28nm	Pen	FIC	účinek ^b		AgNP-8nm	Pen	FIC	účinek
<i>S. enterica</i> (G-) ^a	2	25	1	1,5	I	12,5	1	1,5	I	
<i>S. aureus</i> (R, G+)	1	12,5	0,5	0,6	A	12,5	0,125	0,6	A	
<i>E. coli</i> (R) ^c	> 32	25	> 32	2,0	I	6,3	> 32	2,0	I	
<i>App</i> ^d (R, G-)	> 32	25	8	0,6	A	6,3	2	0,3	S	
<i>P. multocida</i> (G-)	0,03	6,3	0,03	2,0	I	6,3	0,03	2,0	I	

a – G+, Gram-pozitivní bakterie; G-, Gram-negativní bakterie

b – S, synergie; A, aditivita; I, indiference

c – R, rezistentní k penicilinu

d – *App*, *A. pleuropneumoniae*

Nejefektivnějším antibiotikem v kombinaci s AgNP byl gentamicin (tab. 4). Kombinace gentamicinu s AgNP-28nm vedla k aditivnímu účinku u bakterií *S. enterica* a *P. multocida* a synergnímu účinku u bakterií *S. aureus*, *E. coli* a *A. pleuropneumoniae*. S AgNP-8nm byl efekt aditivní u *E. coli* a *P. multocida* a synergní u *S. aureus*. Kombinace 3,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AgNP-28nm i AgNP-8nm se 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicinu vedla k obnovení citlivosti rezistentní *P. multocida* k danému antibiotiku (MIC 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, breakpoint \geq 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Také rezistentní *A. pleuropneumoniae* (MIC 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, breakpoint \geq 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) byla opět citlivá ke gentamicinu kombinovaném s AgNP. Kombinací gentamicinu s AgNP-28nm umožnilo snížit koncentraci antibiotika na 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Tabulka 4. MIC [$\mu\text{g}/\text{mL}$] gentamicinu (Gen) a výsledky kombinace gentamicinu s AgNP

Bakterie	MIC Gen	MIC v kombinaci				účinek ^b	MIC v kombinaci			
		AgNP-28nm	Gen	FIC	účinek ^b		AgNP-8nm	Gen	FIC	účinek
<i>S. enterica</i> (G-) ^a	1	12,5	0,25	0,8	A	12,5	0,25	1,3	I	
<i>S. aureus</i> (G+)	2	25	0,25	0,4	S	6,3	0,5	0,5	S	
<i>E. coli</i> (R) ^c	> 32	6,3	8	0,4	S	3,1	16	0,8	A	
<i>App</i> ^d (R, G-)	8	25	0,25	0,5	S	25	8	2,0	I	
<i>P. multocida</i> (R, G-)	8	3,1	2	0,8	A	3,1	2	0,8	A	

a – G+, Gram-pozitivní bakterie; G-, Gram-negativní bakterie

b – S, synergie; A, aditivita; I, indiference

c – R, rezistentní ke gentamicinu

d – *App*, *A. pleuropneumoniae*

Zde byly ze čtyř kmenů bakterií, které byly zvoleny k testování, všechny kmeny ke kolistinu rezistentní. MIC samotného kolistinu se pohybovaly mezi 4 až 8 µg/ml (tab. 5) a tedy všechny testované bakterie byly k tomuto antibiotiku rezistentní (breakpoint ≥ 2 µg/ml). V kombinaci kolistinu s AgNP-28nm byl společný účinek pouze aditivní a to u všech bakteriálních kmenů. Aditivní účinek byl také pozorován pro kombinaci kolistinu s AgNP-8nm proti *S. enterica* a *P. multocida*. Při kombinaci 3,1 µg/ml AgNP-28nm nebo AgNP-8nm s kolistinem se rezistentní *P. multocida* stala ke kolistinu citlivou, protože MIC kolistinu klesla na 1 µg/ml. Kombinace 2 µg/ml kolistinu s 1,6 µg/ml AgNP-8nm měla synergní antibakteriální účinek proti *E. coli*.

Tabulka 5. MIC [µg/mL] kolistinu (Col) a výsledky kombinace kolistinu s AgNP

Bakterie	MIC Col	MIC v kombinaci			účinek ^b	MIC v kombinaci			účinek
		AgNP-28nm	Col	FIC		AgNP-8nm	Col	FIC	
<i>S. enterica</i> (R, G-) ^{a, c}	4	12,5	2	1,0	A	6,3	2	1,0	A
<i>E. coli</i> (R, G-)	8	12,5	2	0,8	A	1,6	2	0,5	S
<i>App</i> ^b (R, G-)	8	25	2	0,8	A	25	8	2,0	I
<i>P. multocida</i> (R, G-)	8	3,1	1	0,6	A	3,1	1	0,6	A

a – G-, Gram-negativní bakterie

b – S, synergie; A, aditivita; I, indiference

c – R, rezistentní ke kolistinu

17. Synergie AgNP a antibiotik vůči bakteriím citlivým k antibiotikůmⁱ

AgNP byly opět syntetizovány podle výše popsané modifikované Tollensovy metody. AgNP dosahovaly průměrné velikosti 26 nm. Hodnota zeta potenciálu byla -28 mV, což znamená vysokou agregační stabilitu připravených AgNP. AgNP však musely být před testováním synergie stabilizovány želatinou (0,05%), neboť po smíchání s kultivačním médiem v poměru 1 : 1 došlo k částečné agregaci částic stříbra.

ⁱ Výsledky publikovány v: Panáček, A., Smékalová, M., Kilianová, M., Prucek, R., Bogdanová, K., Večeřová, R., Kolář, M., Havrdová, M., Płaza, G. A., Chojniak, J., Zbořil, R. a Kvítek, L. Strong and Nonspecific Synergistic Antibacterial Efficiency of Antibiotics Combined with Silver Nanoparticles at Very Low Concentrations Showing No Cytotoxic Effect. *Molecules* 21(1), 26 (2016).

Pro stanovení MIC AgNP, antibiotik a jejich kombinace byla využita šachovnicová diluční metoda. Antibiotika byla ředěna geometrickou řadou a kombinována s AgNP o koncentraci nižší než jejich MIC. 100 µl média M.-H. o definované koncentraci antibiotik a AgNP bylo inokulováno bakteriemi o koncentraci 10^5 – 10^6 CFU/ml (CFU – colony-forming units) a inkubováno 24 hodin ve 37 °C.

Z hodnot MIC antibiotik a antibiotik v kombinaci AgNP je patrné, že synergický účinek byl pozorován u všech použitých antibiotik a u všech bakteriálních kmenů (tab. 6–8). V případě *E. coli* (tab. 6) se projevila výrazný synergický účinek v koncentracích AgNP 2,5 mg/l a 5 mg/l (MIC AgNP = 7,5 mg/l). Při kombinaci antibiotik s AgNP o těchto koncentracích se MIC antibiotik snížily o dva až tři řády oproti antibiotikům aplikovaným bez AgNP. Při nižších koncentracích AgNP byl synergický efekt pozorován u GEN, COL a OFL s MIC více jak dvakrát nižšími, než byly MIC antibiotik samotných. *E. coli* byla vůči samotnému AMP rezistentní, antibiotikum nevykazovalo žádnou antibakteriální aktivitu ani v nejvyšší použité koncentraci 32 mg/l (breakpoint = 8 mg/l). V kombinaci s AgNP proti *E. coli* se aktivita AMP znovu obnovila a *E. coli* byla vůči AMP znovu senzitivní. Při koncentraci AgNP 2,5 mg/l se snížila MIC AMP na 0,03 mg/l.

V případě *P. aeruginosa* (tab. 7) byly MIC antibiotik v kombinaci s AgNP (2,5 mg/l a 5 mg/l) také o dva až tři řády nižší než při aplikaci antibiotika samotného. V případě nižších koncentrací AgNP byla pozorována synergie s MER, GEN a COL (MIC více než dvakrát nižší).

Tabulka 6. MIC antibiotik (mg/l) v kombinaci s AgNP v koncentracích nižších než MIC (7,5 mg/l) pro *E. coli* CCM 4225.

	AMP ^a	AMS	CZL	CRX	CXT	GEN	COT	COL	OXO	OFL	TET	AZT
ATB + 0 mg/l AgNP	-	8	2	1	1	0,5	4	0,5	0,5	0,03	4	0,03
ATB + 0,6 mg/l AgNP	-	8	2	1	1	0,03	2	0,125	0,5	0,015	4	0,03
ATB + 1,25 mg/l AgNP	-	8	2	1	1	0,06	2	0,125	0,5	0,015	2	0,03
ATB + 2,5 mg/l AgNP	0,03	0,03	0,0019	0,00097	0,00097	0,00048	2	0,00097	0,5	0,00024	1	0,0078
ATB + 5 mg/l AgNP	0,00097	0,00097	0,00097	0,00097	0,00097	0,00048	0,0019	0,00048	0,00097	0,00024	0,00048	0,0019

a – Ampicilin (AMP), Ampicilin/sulbaktam (AMS), Cefazolin (CZL), Cefuroxim (CRX), Cefoxitin (CXT), Gentamicin (GEN), Kotrimoxazol (COT), Kolistin (COL), Oxolinová kyselina (OXO), Ofloxacin (OFL), Tetracyklin (TET), Aztreonam (AZT)

Tabulka 7. MIC antibiotik (mg/l) v kombinaci s AgNP v koncentracích nižších než MIC (7,5 mg/l) pro *P. aeruginosa* CCM 3955.

	PIP ^a	PPT	AZT	MER	CTZ	CPR	CPM	GEN	AMI	COL	OFL	CIP
ATB + 0 mg/l AgNP	4	4	4	1	1	4	2	0,25	1	0,5	1	0,125
ATB + 0,6 mg/l AgNP	4	4	4	1	1	4	1	0,03	0,25	0,125	1	0,03
ATB + 1,25 mg/l AgNP	2	4	4	0,5	1	4	1	0,015	0,25	0,06	1	0,03
ATB + 2,5 mg/l AgNP	0,015	0,0039	0,00097	0,0019	0,00024	0,00048	0,00024	0,00048	0,00048	0,00048	0,00024	0,00024
ATB + 5 mg/l AgNP	0,0078	0,0039	0,00097	0,0019	0,00024	0,00048	0,00024	0,00048	0,00048	0,00048	0,00024	0,00024

a – Piperacilin (PIP), Piperacilin/tazobaktam (PPT), Aztreonam (AZT), Meropenem (MER), Ceftazidim (CTZ), Cefoperazon (CPR), Cefepim (CPM), Gentamicin (GEN), Amikacin (AMI), Kolistin (COL), Ofloxacin (OFL), Ciprofloxacín (CIP)

Bakterie *S. aureus* (tab. 8) byla citlivější k AgNP více než další testované bakterie s MIC rovné 5 mg/l, což se také promítlo do silnějšího synergického efektu. Nejvyšší použitá koncentrace 2,5 mg/l vedla k nejvyššímu poklesu MIC antibiotik, o dva až tři řády. Při koncentraci 1,25 mg/l AgNP byl také pozorován synergický efekt téměř pro všechna antibiotika s poklesem MIC antibiotik o jeden řád. Také u nejnižší koncentrace 0,6 mg/l AgNP byl u *S. aureus* pozorován téměř ve všech případech (PEN, AMS, TET, COT, ERY, CLI, CIP, TEI a VAN) synergický účinek s více jak dvojnásobným poklesem MIC. Naopak u *E. coli* a *P. aeruginosa* bylo snížení MIC antibiotik výjimečné.

Tabulka 8. MIC antibiotik (mg/l) v kombinaci s AgNP v koncentracích nižších než MIC (5 mg/l) pro *S. aureus* CCM 4223.

	PEN ^a	OXA	AMS	CMP	TET	COT	ERY	CLI	CIP	GEN	TEI	VAN
ATB + 0 mg/l AgNP	0,125	0,25	0,5	4	0,25	1	0,125	0,125	0,25	0,25	0,25	1
ATB + 0,6 mg/l AgNP	0,015	0,25	0,125	4	0,015	0,03	0,06	0,015	0,03	0,25	0,03	0,03
ATB + 1,25 mg/l AgNP	0,015	0,03	0,06	2	0,015	0,0078	0,06	0,015	0,015	0,06	0,015	0,00097
ATB + 2,5 mg/l AgNP	0,00006	0,00048	0,00048	0,00048	0,00012	0,0019	0,00012	0,00012	0,00012	0,00048	0,00097	0,00048

a – Penicilin (PEN), Oxacilin (OXA), Ampicilin/sulbaktam (AMS), Chloramfenikol (CMP), Tetracyklin (TET), Kotrimoxazol (COT), Erytromycin (ERY), Klindamycin (CLI), Ciprofloxacín (CIP), Gentamicin (GEN), Teikoplanin (TEI), Vankomycin (VAN)

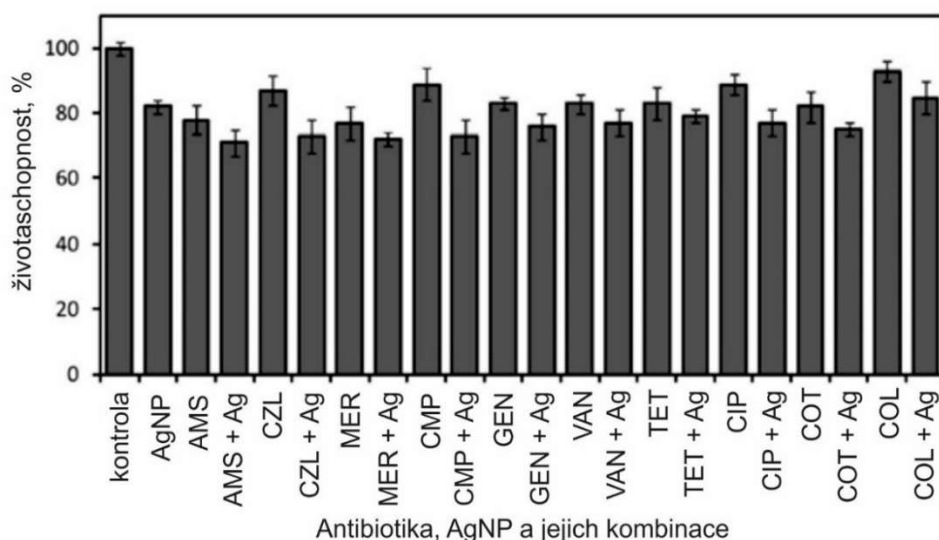
Společně s antibakteriální aktivitou byla rovněž posuzována cytotoxicita samotných AgNP a některých vybraných antibiotik a také jejich kombinace v koncentracích, které vykazovaly antibakteriální účinnost. Také byl hodnocen index toxicity LD₅₀ (letální dávka pro 50 % organismů) vybraných antibiotik, AgNP a jejich kombinace. Metodika testování cytotoxicity byla mírně pozměněna, aby se

zamezilo potenciálnímu aditivnímu vlivu antibiotik, která jsou při kultivaci buněk standardně přítomna. Každá koncentrace byla testována v tripletu a celý experiment byl opakován dvakrát.

Hodnoty parametru LD₅₀ antibiotik se pohybovaly od 120 mg/l do 250 mg/l v závislosti na použitém antibiotiku (tab. 9). Po kombinaci s AgNP index LD₅₀ klesl na hodnoty 90 mg/l až 180 mg/l (7,5 mg/l AgNP) a 80 mg/l až 150 mg/l (15 mg/l AgNP). V případě hodnocení cytotoxicity v koncentracích antibiotik rovných MIC inhibovala antibiotika samotná životaschopnost buněk pouze slabě na 80 % až 90 % oproti kontrole (obr. 3). V případě AMS odpovídala životaschopnost buněk 78 % a v případě MER 77 %, což se dá také považovat za slabý pokles. AgNP samotné v koncentraci odpovídající jejich MIC také slabě ovlivnily životaschopnost buněk, která oproti kontrole klesla na 82 %. Hodnota LD₅₀ AgNP byla stanovena na 30 mg/l. Po kombinaci antibiotik s AgNP klesla jejich životaschopnost na hodnoty v rozsahu 71 % až 80 % ve srovnání s kontrolou.

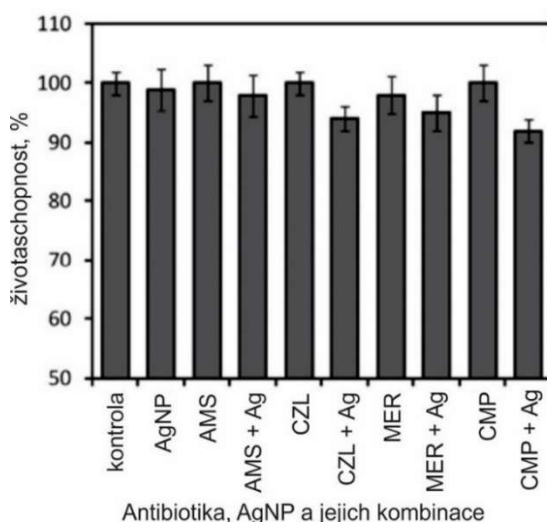
Tabulka 9. Index toxicity LD₅₀ [mg/l] antibiotik bez AgNP a v kombinaci s AgNP o koncentraci 7,5 mg/l a 15 mg/l.

	AMS	CZL	MER	CMP	GEN	VAN	TET	CIP	COT	COL
Atb + 0 mg/l AgNP	160	200	250	200	250	200	200	120	120	120
Atb + 7,5 mg/l AgNP	100	130	180	150	180	150	180	100	100	100
Atb + 15 mg/l AgNP	80	90	130	100	150	100	150	90	90	80



Obrázek 3. Životaschopnost buněk po aplikaci antibiotik, AgNP a jejich kombinace v koncentracích rovných MIC.

Největší cytotoxický vliv byl zaznamenán u antibiotik AMS, CZL, MER a CMP v kombinaci s AgNP, životaschopnost buněk klesla na 71 %, 73 %, 72 % a 73 %. Kombinace antibiotik a AgNP v koncentracích rovných MIC, které inhibovaly savčí buňky nejvíce, byly dále použity v testech cytotoxicity, tentokrát v koncentracích pod jejich MIC. Za použití antibiotik a AgNP v takto nízkých koncentracích samostatně, nebyla pozorována žádná inhibice životaschopnosti buněk oproti kontrole. Byla-li antibiotika kombinována s AgNP, poklesla životaschopnost buněk na 90 % až 95 % ve srovnání s kontrolou (obr. 4)



Obrázek 4. Životaschopnost buněk po aplikaci antibiotik, AgNP a jejich kombinace v koncentracích nižších než MIC.

18. Synergie AgNP a antibiotik vůči multirezistentním enterobakteriím^j

Podobně jako v předchozím případě i v této studii byly použity AgNP o velikosti 28 nm připravené pomocí modifikované Tollensovy metody a stabilizovány 0,05% želatinou.

Pro stanovení MIC AgNP, antibiotik a jejich kombinace byla využita šachovnicová diluční metoda. Antibiotika a AgNP byly odděleně ředěny médiem M.-H. geometrickou řadou. Při určování

^j Výsledky publikovány v: Panáček, A., Smékalová, M., Večeřová, R., Bogdanová, K., Röderová, M., Kolář, M., Kilianová, M., Hradilová, Š., Froning, J. P., Havrdová, M., Prucek, R., Zbořil R. a Kvítek, L. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant Enterobacteriaceae. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 142, 392–399 (2016).

synergie byly sledovány MIC každého antibiotika v kombinaci se 4 různými koncentracemi AgNP vždy pod hodnotou MIC AgNP, tedy $MIC_{Ag/2}$, $MIC_{Ag/4}$, $MIC_{Ag/8}$ and $MIC_{Ag/16}$. Hodnocení antibakteriální aktivity bylo provedeno podle testovacích protokolů CLSI (Ústav pro klinické a laboratorní standardy) a EUCAST (Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti) po inkubaci 24 hodin při 35 °C. a následně byla inhibice potvrzena přeočkováním na M.-H. agar. Nakonec byl vypočítán FIC index (dle rovnice 1).

Připravené AgNP stabilizované želatinou projevily vysokou antibakteriální aktivitu vyjádřenou velmi nízkými MIC (řádově jednotky mg/l).

AgNP významně zvyšovaly aktivitu antibiotik vůči testovaným multirezistentním kmenům (tab. 12–15). Toto zvýšení aktivity se projevilo u všech testovaných antibiotik, obzvláště v případech, kdy bakterie byly k antibiotiku rezistentní. U všech kombinací byla pozorována synergie. Výjimku tvořila pouze KPC-pozitivní *K. pneumoniae*, kdy byl kombinovaný účinek AgNP a COX pouze aditivní. Na rozdíl od bakterií rezistentních k antibiotikům se u citlivých bakterií neprojevil kombinovaný účinek tak markantně.

Nejlepších výsledků však bylo dosaženo při aplikaci AgNP v koncentracích $MIC_{Ag/2}$ a $MIC_{Ag/4}$, kdy MIC antibiotik dosahovaly řádově 100násobně nižších hodnot, což jsou hodnoty nižší, než jsou hodnoty jejich breakpointů. Všechny testované multirezistentní bakterie se tak při kombinaci antibiotika s AgNP v subinhibičních koncentracích staly k antibiotikům opět citlivé. Koncentrace AgNP rovna $MIC_{Ag/8}$ a především $MIC_{Ag/16}$ byly hraniční, protože se začal vytrácet zvýšený antibakteriální účinek kombinace AgNP a antibiotik.

Tabulka 12. MIC [$\mu\text{g/mL}$] antibiotik (atb) a výsledky kombinace atb s AgNP o koncentracích nižších než MIC (0,8 mg/l) pro ESBL-pozitivní *E. coli*

atb/AgNP	COX		CZD		MER		CIP		GEN	
	MIC	FIC ^a	MIC	FIC	MIC	FIC	MIC	FIC	MIC	FIC
atb + 0 mg/l		0,40		0,36		1,23		0,22		0,50
AgNP	4	(0,1)	16	(0,13)	0,06	(0,19)	> 32	(0,16)	0,5	(0,17)
atb + 0,4 mg/l										
AgNP	0,03	S	0,125	S	0,06	I	0,125	S	0,125	S
atb + 0,2 mg/l										
AgNP	0,125		0,125		0,06		0,125		0,125	
atb + 0,1 mg/l										
AgNP	1		2		0,06		0,5		0,125	
atb + 0,05 mg/l										
AgNP	1		16		0,06		2		0,125	

a – průměrná hodnota FIC a směrodatná odchylka, n = 3; S, synergie, I, indiference

Tabulka 13. MIC [$\mu\text{g/mL}$] antibiotik (atb) a výsledky kombinace atb s AgNP o koncentracích nižších než MIC (3,4 mg/l) pro AmpC-pozitivní *E. coli*.

atb/AgNP	COX		CZD		MER		CIP		GEN	
	MIC	FIC ^a	MIC	FIC	MIC	FIC	MIC	FIC	MIC	FIC
atb + 0 mg/l AgNP	8	0,28 (0,1)	32	0,28 (0,1)	0,06	1,23 (0,2)	32	0,34 (0,11)	0,5	0,48 (0,2)
atb + 1,7 mg/l AgNP	0,03	S	0,125	S	0,06	I	0,125	S	0,125	S
atb + 0,8 mg/l AgNP	0,03		0,125		0,06		0,125		0,125	
atb + 0,4 mg/l AgNP	1		2		0,06		8		0,125	
atb + 0,2 mg/l AgNP	1		8		0,06		16		0,125	

a – průměrná hodnota FIC a směrodatná odchylka, n = 3; S, synergie, I, indiference

Tabulka 14. MIC [$\mu\text{g}/\text{mL}$] antibiotik (atb) a výsledky kombinace atb s AgNP o koncentracích nižších než MIC (3,4 mg/l) pro KPC-pozitivní *K. pneumoniae*.

atb/AgNP	COX		CZD		MER		CIP		GEN	
	MIC	FIC ^a	MIC	FIC	MIC	FIC	MIC	FIC	MIC	FIC
atb + 0 mg/l AgNP	> 16	0,59 (0,26)	> 64	0,38 (0,26)	> 32	0,37 (0,25)	> 32	0,33 (0,11)	1	0,55 (0,3)
atb + 1,7 mg/l AgNP	0,03	A	0,125	S	0,06	S	0,125	S	0,125	A
atb + 0,8 mg/l AgNP	2		0,125		0,06		0,5		0,125	
atb + 0,4 mg/l AgNP	> 16		2		4		8		0,125	
atb + 0,2 mg/l AgNP	> 16		> 64		> 32		16		1	

a – průměrná hodnota FIC a směrodatná odchylka, n = 3; S, synergie, A, aditivita, I, indiference

Tabulka 15. MIC [$\mu\text{g}/\text{mL}$] antibiotik (atb) a výsledky kombinace atb s AgNP o koncentracích nižších než MIC (6,8 mg/l) pro ESBL-pozitivní *K. pneumoniae*.

atb/AgNP	COX		CZD		MER		CIP		GEN	
	MIC	FIC ^a	MIC	FIC	MIC	FIC	MIC	FIC	MIC	FIC
atb + 0 mg/l AgNP	> 32	0,18 (0,14)	32	0,20 (0,14)	0,06	1,23 (0,2)	0,2	0,98 (0,16)	> 32	0,33 (0,16)
atb + 3,4 mg/l AgNP	0,03	S	0,125	S	0,06	A	0,125	A	0,125	S
atb + 1,7 mg/l AgNP	0,03		0,125		0,06		0,125		1	
atb + 0,8 mg/l AgNP	0,03		0,125		0,06		0,2		2	
atb + 0,4 mg/l AgNP	1		2		0,06		0,2		16	

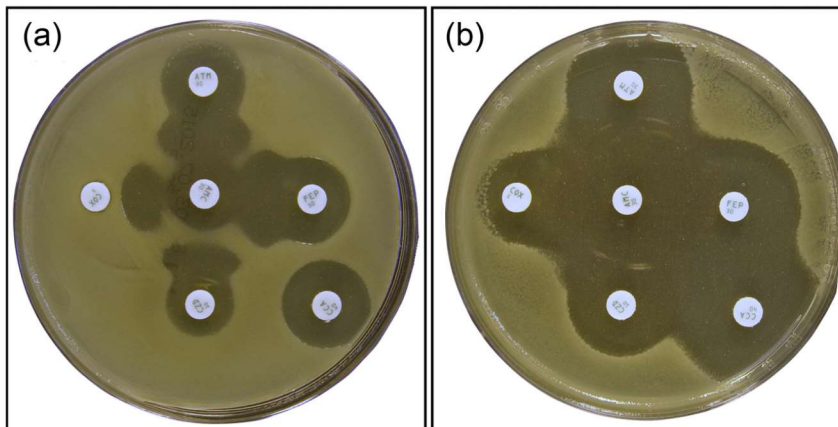
a – průměrná hodnota FIC a směrodatná odchylka, n = 3; S, synergie, A, aditivita

Pro detekci produkce beta-laktamáz bakteriemi, které byly exponovány antibiotikům a kombinaci antibiotika a AgNP, byl použit test DDST (double-disk synergy test) ve shodě s metodologií EUCAST.¹⁰¹ DDST spočívá v inhibici beta-laktamáz inhibitorem kyselinou klavulanovou. V případě

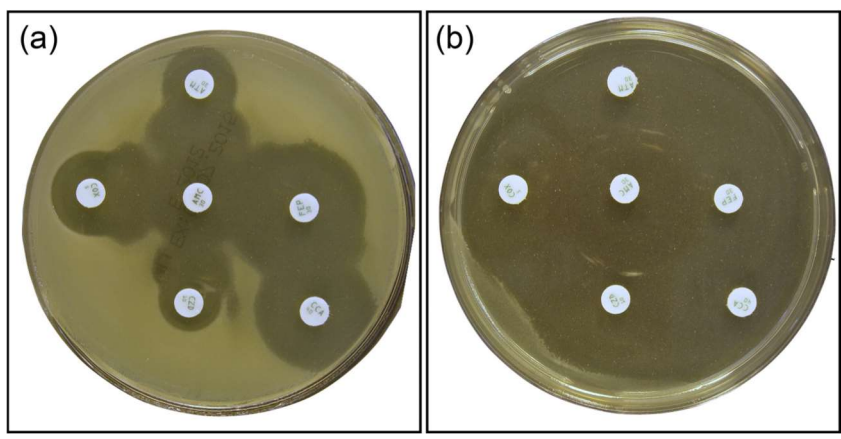
pozitivního výsledku se zvětší inhibiční zóna a rozšíří se směrem k disku, který obsahuje inhibitor. Tvoří se tak charakteristický tvar zóny mezi disky s inhibitorem a bez něj.⁴⁴ Při DDST byly na agarové půdy umístěny disky s COX, ATM, FEP a CZD v požadované vzdálenosti od disku, který obsahoval AMC. Zároveň byl na agar umístěn disk obsahující CCA v požadované vzdálenosti od disku s CZD.

Všechny testy byly vyhodnocovány po 24 hodinové inkubaci při 37 °C. Kombinovaný účinek antibiotik a AgNP byl poté testován tak, že disperze AgNP byla přidána do ještě tekutého agarů v takové koncentraci, která dosahovala poloviční hodnoty MIC, což je dostačující pro zřetelný synergický efekt. Pro ESBL-pozitivní *K. pneumoniae* činila polovina MIC 3 mg/l a pro ESBL-pozitivní *E. coli* 0,4 mg/l.

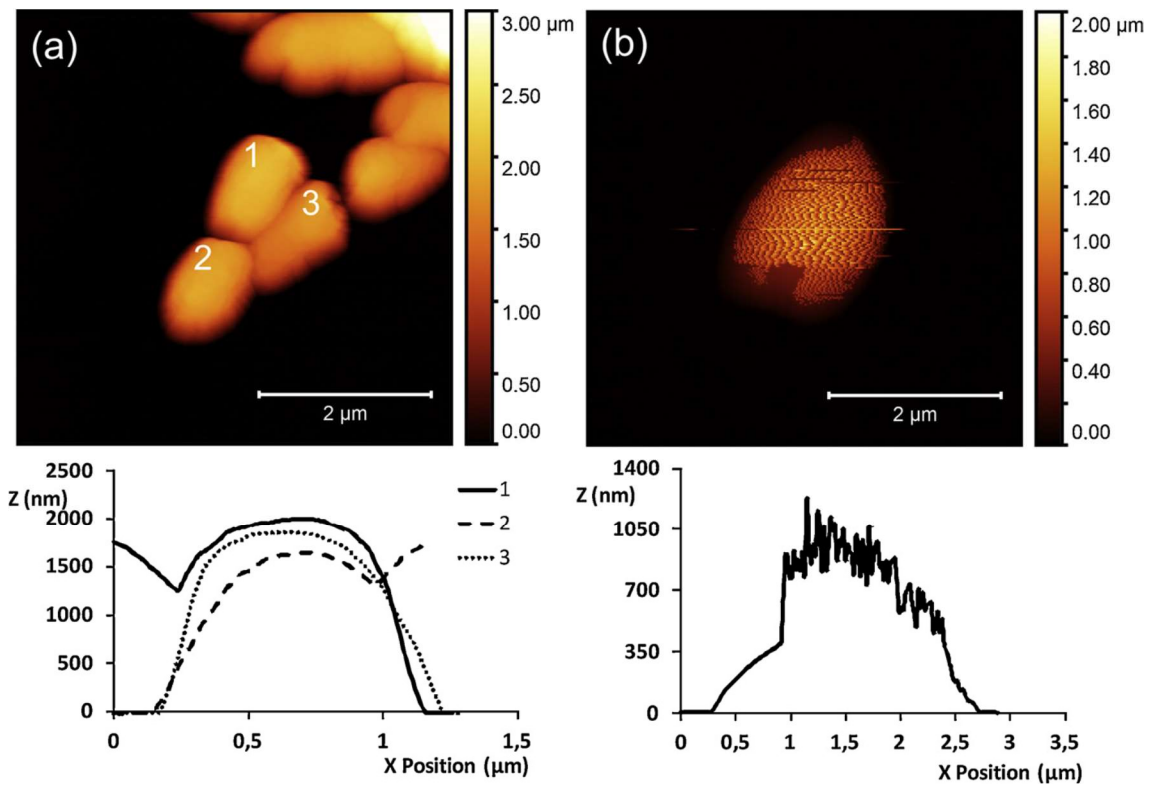
U obou kmenů byly testy pozitivní na produkci beta-laktamáz. Po kultivaci na agaru bez AgNP se objevily typické inhibiční zóny aztreonamu a cefalosporinů protáhlé směrem k amoxicilin/klavulanátu (obr. 5a a 6a). Také inhibiční zóna ceftazidimu/klavulanátu byla zvětšená ve srovnání s inhibiční zónou ceftazidimu. Naopak produkce ESBL nebyla detekovaná, pokud byly bakterie kultivovány na agaru s 0,4 mg/l (ESBL-pozitivní *E. coli*) a 3 mg/l (ESBL-pozitivní *K. pneumoniae*) AgNP. Nebyly pozorovány protáhlé zóny směrem k amoxicilin/klavulanátu a zvětšené zóny ceftazidimu/klavulanátu (obr. 5b a 6b) a jasně byl zřetelný synergický efekt AgNP a antibiotik, jak je zřejmé z velkých inhibičních zón kolem každého antibiotika.



Obrázek 5 zitivní (a) a negativní (b) detekce produkce ESBL ESBL-pozitivní *E. coli* exponované antibiotikům (a) a antibiotikům v kombinaci s AgNP (b).



Obrázek 6. Pozitivní (a) a negativní (b) detekce produkce ESBL ESBL-pozitivní *K. pneumoniae* exponované antibiotikům (a) a antibiotikům v kombinaci s AgNP (b).



Obrázek 7. Snímky z mikroskopu atomárních sil a profil (obr. dole) ESBL-pozitivní *K. pneumoniae* exponované cefotaximu (a) a cefotaximu v kombinaci s AgNP (b).

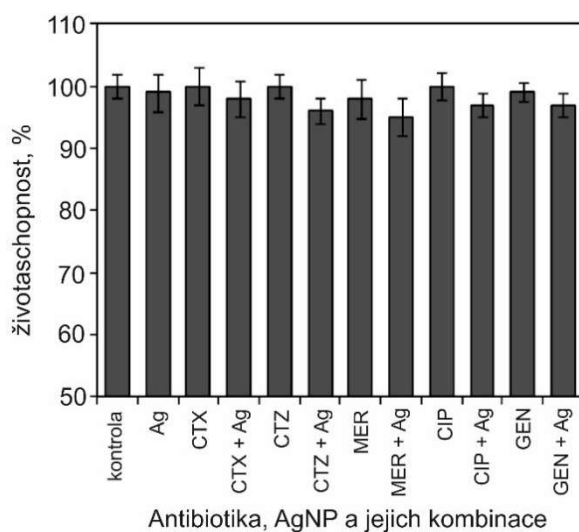
Mechanismus spolupůsobení AgNP a antibiotik založený na obnově aktivity antibiotika byl také potvrzen pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM), jak ukazuje obrázek 7. Pro tyto účely byla ESBL-

pozitivní *K. pneumoniae* kultivována v přítomnosti 1 mg/l cefotaximu a 0,01 mg/l cefotaximu kombinovaného s 1,7 mg/l AgNP v M.-H. médiu při 37 °C po dobu 24 hodin.

Bez aplikace AgNP byly bakteriální buňky vystavené antibiotiku nepoškozené, ale při expozici antibiotiku spolu s AgNP bylo obtížné charakterizovat buněčnou stěnu. To bylo dáno sníženou rigiditou buněčné stěny a tedy obnovením aktivity cefotaximu v subinhibiční koncentraci, který jakožto beta-laktamové antibiotikum, inhibuje tvorbu buněčné stěny. Buňky se také jeví plošší a širší.

I v tomto případě byla hodnocena cytotoxicita antibiotik a AgNP s cílem vyloučit případný negativní vliv na savčí buňky. Cytotoxicita byla hodnocena v koncentracích 4 mg/l AgNP a 2 mg/l antibiotika. Stejně koncentrace byly použity v případě jejich kombinace. Metodika testování cytotoxicity byla stejná jako v předchozí kapitole.

Díky jejich účinnosti při velmi nízkých koncentracích jsou AgNP neškodné a nemají žádný cytotoxický vliv na savčí buňky, jak potvrdil test cytotoxicity na buněčné linii NIH/3T3. AgNP, antibiotika i jejich kombinace v koncentracích 2 mg/l a 4 mg/l nebyly cytotoxické vůči savcím buňkám ve srovnání s kontrolními buňkami. Životaschopnost exponovaných buněk AgNP klesla na 97 % (4 mg/l) a 98 % (2 mg/l) ve srovnání s kontrolou, a tedy nebyl pozorován významný cytotoxický vliv AgNP. Pokud byla antibiotika kombinována s AgNP, životaschopnost savcích buněk mírně klesla na 98 % až 95 % ve srovnání s kontrolou v závislosti na použitém antibiotiku (obr. 8). Jak jsme ukázali, synergický antibakteriální účinek však nastává při mnohem nižších koncentracích stříbra, a proto můžeme jakýkoliv cytotoxický vliv kombinace AgNP s antibiotiky vyloučit pro koncentrace efektivní vůči rezistentním kmenům.



Obrázek 8. Životaschopnost buněk NIH/3T3 exponovaných AgNP, antibiotikům a kombinaci AgNP a antibiotik.

19. Tvorba rezistence bakterií k AgNP a její překonání^k

Tato studie byla provedena s cílem ověřit možnost tvorby rezistence bakterií vůči AgNP. Pro tento účel byly opět použity AgNP s průměrnou velikostí 28 nm o koncentraci 108 mg/l, které byly připraveny modifikovaným Tollensovým postupem. Navíc byla v této studii připravena stejným způsobem disperze AgNP o koncentraci 432 mg/l, pouze byly koncentrace všech reakčních komponent kromě NaOH čtyřnásobné.

Bakterie byly opakovaně (20krát) vystavovány subinhibičním koncentracím AgNP a rovněž AgNO₃ na mikrotitračních destičkách. Disperze AgNP a AgNO₃ o koncentraci 1 mmol/l (108 mg/l stříbra) byly postupně ředěny M.-H. médiem (Becton, Dickinson and Company) na výsledné koncentrace 54, 27, 13,5, 6,75, 3,38, 1,69 and 0,89 mg/l. Po naředění byla poté do jamek očkována inokula o koncentraci 10⁶ CFU/ml. Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin. Po každém inkubačním kroku se zaznamenaly MIC AgNP a AgNO₃. Ihned po 24 hodinách kultivace bylo z jamek obsahujících tři nejvyšší subinhibiční koncentrace stříbra odebráno 10 µl suspenze bakterií v M.-H. médiu a po smíchání přeneseno na krevní agar (TRIOS), který byl inkubován při 37 °C po 24 hodin. Bakterie, které rostly na agaru, byly poté použity jako inokulum o hustotě 10⁶ CFU/ml v dalším kultivačním kroku na mikrotitrační destičce. Výše popsaná procedura se považuje za jeden kultivační krok v použité metodice tvorby rezistence bakterií ke stříbru. Pro stanovení konečných MIC po 20. kultivačním kroku byla aplikována disperze AgNP o koncentraci 432 mg/l. Inhibice růstu ke stříbru senzitivních a rezistentních bakteriálních kmenů byla potvrzena inkubací na agaru, který obsahoval AgNP o koncentracích 20 a 40 mg/l při 35 °C po dobu 24 hodin.

Z narůstajících hodnot MIC AgNP uvedených v tabulce 16 je patrné, že si bakterie v průběhu opakované kultivace při subinhibičních koncentracích postupně vytvářely rezistenci vůči AgNP. Nejrychleji získala rezistenci *E. coli* CCM 3954. Již v šestém kultivačním kroku se MIC zvýšila z původních 3,38 mg/l na 13,5 mg/l a od osmého kroku dosahovala nejvyšší možné koncentrace 54 mg/l (při použití disperze AgNP o koncentraci 108 mg/l). Kmeny *P. aureginosa* CCM 3955 a *E. coli* 013 se staly rezistentní od 13. kroku. Všechny kmeny si poté nadále udržovaly svoji rezistenci při každém přeočkování. Pro kontrolu byla v desátém a dvacátém kroku určena MIC AgNP nebo AgNO₃ inhibující referenční kmeny pro potvrzení vzniku rezistence u opakovaně exponovaných kmenů

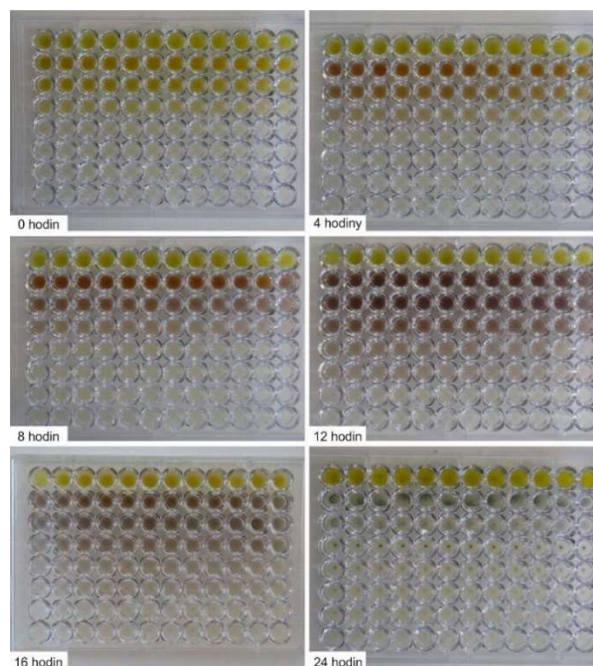
^k Výsledky publikovány v: Panáček, A., Kvítek, L., Smékalová, M., Večeřová, R., Kolář, M., Röderová, M., Dyčka, F., Šebela, M., Pruček, R., Tomanec, O. a Zbořil, R. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology* 13, 65–71 (2018).

Tabulka 16. MIC AgNP u Gram-negativních bakterií určovaná po 20 po sobě jdoucích kultivačních krocích.

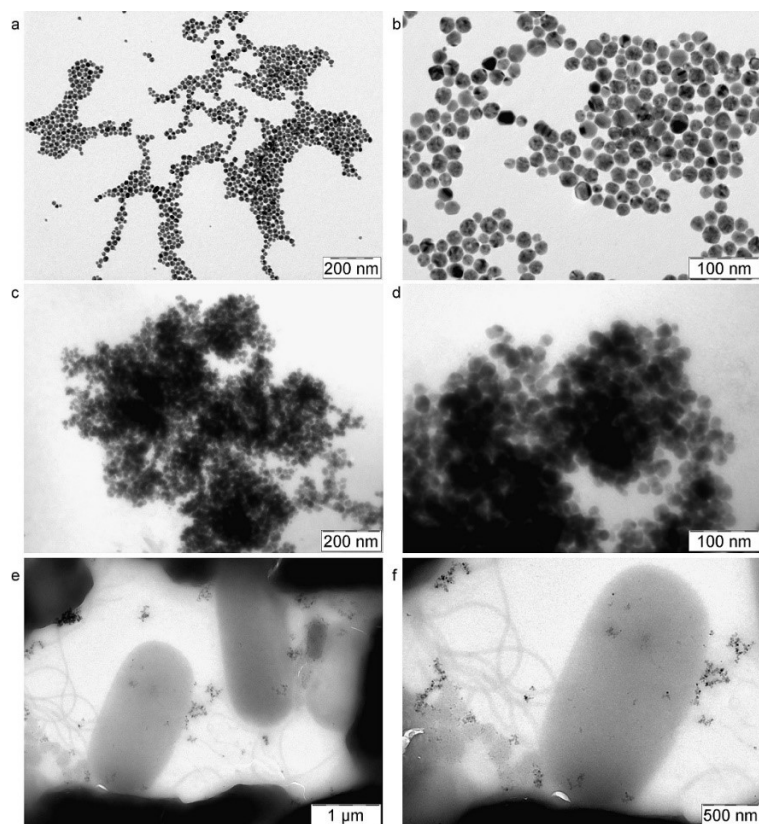
bakterie	MIC [mg/l]									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>E. coli</i> CCM 3954	3,38	6,75	3,38	6,75	6,75	13,50	13,50	54,00	> 54	> 54
<i>P. aeruginosa</i> CCM 3955	1,69	3,38	0,89	1,69	3,38	3,38	1,69	1,69	3,38	3,38
<i>E. coli</i> 013	13,50	27,00	13,50	27,00	13,50	13,50	13,50	13,50	13,50	13,50
bakterie	MIC [mg/l]									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>E. coli</i> CCM 3954	> 54	> 54	> 54	> 54	> 54	> 54	> 54	> 54	> 54	> 54
<i>P. aeruginosa</i> CCM 3955	6,75	27,00	54,00	> 54	54,00	54,00	> 54	54,00	> 54	54,00
<i>E. coli</i> 013	27,00	27,00	54,00	27,00	27,00	54,00	> 54	54,00	> 54	> 54

Při opakované kultivaci bakterií s iontovým stříbrem nedocházelo k nárůstu MIC. V tomto případě tedy nebyla rezistence vyvolána. Navíc u kmenů rezistentních k AgNP nebyly v případě jejich kultivace s AgNO₃ potvrzeny vyšší hodnoty MIC. Bakterie se získanou odolností vůči AgNP jsou stále citlivé k AgNO₃. Je to tedy jasným důkazem toho, že bakteriální rezistence k AgNP je specifická a spojená právě s nanočásticovou podstatou stříbra a že mechanismem rezistence není pouze eliminace uvolněných iontů stříbra.

Postupný vývoj bakteriální rezistence k AgNP byl také doprovázen postupnou agregací a sedimentací AgNP na dně jamek mikrotitrační destičky a změnou barvy disperze ze žluté na hnědou až černou (obr. 9). Naopak v přítomnosti senzitivních bakterií disperze AgNP ředěná M.-H. médiem zůstala žlutohnědá díky zachování povrchového plazmonu, který je typický pro AgNP o velikostech několika jednotek až desítek nm. Agregáčnı́ stabilita AgNP po kultivaci se senzitivními bakteriemi byla prokázána TEM (obr. 10a,b). Naopak v případě rezistentních bakterií docházelo ke tvorbě černého precipitátu tvořeného agregáty AgNP o velikostech řádově stovek nm (obr. 10c,d). Agregace AgNP způsobená rezistentní *E. coli* je dobře viditelná na snímcích z TEM (obr. 10e,f).



Obrázek 9. Postupná agregace a precipitace AgNP na mikrotitrační destičce s *E. coli* 3954 rezistentní k AgNP po 0, 4, 8, 12, 16 a 24 hodinách kultivace. Koncentrace AgNP se postupně snižuje od 54 mg/l k 0,84 mg/l od druhé po osmou řadu. První řada obsahuje disperzi AgNP (108 mg/l) bez bakterií nebo kultivačního média.



Obrázek 10. Vysoká agregační stabilita AgNP po kultivaci s *E. coli* citlivé k AgNP ukázaná na snímcích z TEM (a, b), agregované AgNP po 24 h kultivace s AgNP-rezistentní *E. coli* CCM 3954 (c, d), agregace AgNP způsobená rezistentní *E. coli* CCM 3954 (e, f).

Absorpční spektra AgNP zředěných v M.-H. médiu v poměru 1 : 1 (V/V) před a po kultivaci s AgNP-citlivým a AgNP-rezistentním kmenem *E. coli* CCM 3954 zobrazuje obrázek 11a. Charakteristický pás povrchového plazmonu dobře dispergovaných koloidních AgNP postupně mizí v přítomnosti AgNP-rezistentního kmene *E. coli* CCM 3954 v důsledku agregace AgNP. Naopak v přítomnosti AgNP-citlivého kmene intenzita povrchového plazmonového pásu zůstává nezměněna i po 24 hodinách kultivace (obr. 11a). To naznačuje, že bakterie rezistentní k AgNP vyvolávají jejich agregaci extracelulární sekrecí látky, která zůstává adsorbována na povrchu agregátů. Touto látkou je pravděpodobně látka s vysokou molekulovou hmotností, jako jsou proteiny. Proteinové extrakty připravené za použití různých rozpouštědel byly proto podrobeny analýze hmotnostní spektrometrií (MS) a tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) k identifikaci proteinů, které by mohly být odpovědné za pozorovanou agregaci AgNP.

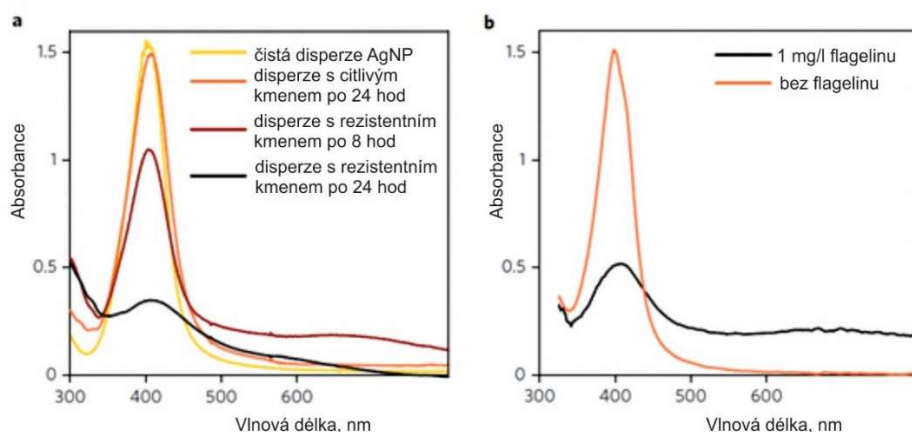
Pomocí MS/MS analýzy se kromě extrakce v 0,1% trifluoroctové kyselině podařilo identifikovat řadu proteinů. Mimo jiné byly nalezeny 30S a 50S ribozomální proteiny a určité enzymy buněčného metabolismu *E. coli*, které signalizují buněčnou lýzu před nebo během extrakce. Nejčastěji vyskytující se protein v extraktu ve 2,5% TFA byl flagelin následovaný fimbriálním proteinem typu 1. Flagelin byl také nejčastěji vyskytujícím se proteinem i při extrakci se zředěným NH_4OH . Tabulka 17 sumarizuje peptidy sekvenované kolizí v MS/MS, které se jednoznačně shodují se sekvencemi flagelinu.

V dalším experimentu byl použit komerčně dostupný flagelin k ověření, zda AgNP budou agregovat po přidání suspenze flagelinu do disperze AgNP. Původní žlutohnědá barva disperze se ihned po přidání flagelinu změnila na šedou (obr. 12a) a po 24 hodinách (37 °C) byly na dně zkumavky pozorovány precipitáty (obr. 12b). UV/Vis spektra AgNP před a po přidání flagelinu jsou velmi podobná spektrům pořízeným před a po kultivaci s AgNP-rezistentní *E. coli* CCM 3954 (obr. 11). Absorpční pás povrchového plazmonu AgNP se v přítomnosti reistentní *E. coli* CCM 3954 postupně snižoval díky agregaci AgNP. V přítomnosti citlivého kmene zůstal pás povrchového plazmonu po 24hodinové kultivaci stejný (obr. 11a).

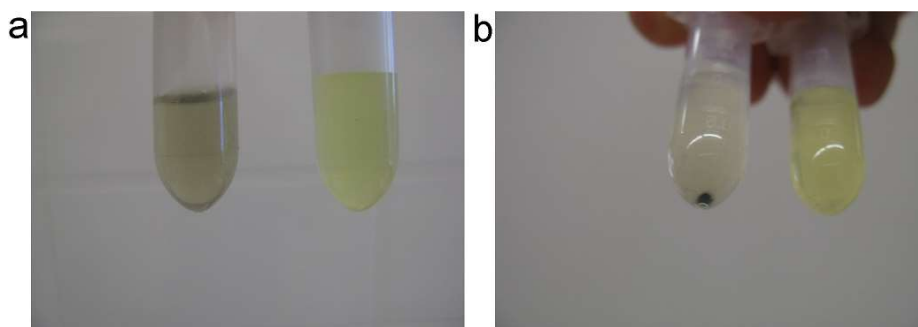
Průměrná velikost AgNP se okamžitě zvětšila z 28 nm na 480 nm následkem tvorby agregátů (DLS analýza). Zeta potenciál po přidání flagelinu se změnil z hodnoty -28 mV na -6,2 mV. Při takto nízké hodnotě zeta potenciálu nejsou repulzivní síly dostatečně vysoké k udržení AgNP v dostatečné vzájemné vzdálenosti.

Tabulka 17. Peptidy identifikované pomocí databáze Swiss-prot.

Číslo peptidu	Přístupové číslo	Protein - Organismus	m/z	Vypočítaná hmotnost	Náboj [z+]	Δ m/z [ppm]	Retenční čas [min]	Skóre	Sekvence
1	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	596,288	1190,5891	2	-23,21	12,93	62,8	K.NQSALSSSIER.L
2	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	572,812	1143,6248	2	-13,39	13,73	55,3	L.SLITQNNINK.N
3	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	720,909	1439,8096	2	-4,29	16,77	121,7	K.AQIIQQAGNSVLAK.A
4	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	581,295	1160,5925	2	-14,65	17,15	79,8	K.ALDEAISSIDK.F
5	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	672,872	1343,7409	2	-8,49	17,57	74,5	N.SLSLITQNNINK.N
6	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	750,357	2248,0931	3	-19,53	17,74	23,2	R.LDSAVTNLNNTTTLNSEAQR.I
7	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	488,923	1463,762	3	-10,12	19,91	20,0	K.ALDEAISSIDKFR.S
8	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	843,451	1684,8996	2	-7,18	20,54	105,2	K.IQVGANDGQTITIDLK.K
9	FLIC_SHIFL	Flagellin - <i>Shigella flexneri</i>	640,315	1278,6456	2	-23,53	21,55	21,1	K.KIDSDTLGLNGF.N
10	FLIC_ECOLI	Flagellin - <i>Escherichia coli</i> K12	596,288	1190,5891	2	-23,21	12,93	62,8	K.NQSALSSSIER.L
11	FLIC_ECOLI	Flagellin - <i>Escherichia coli</i> K12	572,812	1143,6248	2	-13,39	13,73	55,3	L.SLITQNNINK.N
12	FLIC_ECOLI	Flagellin - <i>Escherichia coli</i> K12	720,909	1439,8096	2	-4,29	16,77	121,7	K.AQIIQQAGNSVLAK.A
13	FLIC_ECOLI	Flagellin - <i>Escherichia coli</i> K12	672,872	1343,7409	2	-8,49	17,57	74,5	N.SLSLITQNNINK.N
14	FLIC_ECOLI	Flagellin - <i>Escherichia coli</i> K12	750,357	2248,0931	3	-19,53	17,74	23,2	R.LDSAVTNLNNTTTLNSEAQR.I

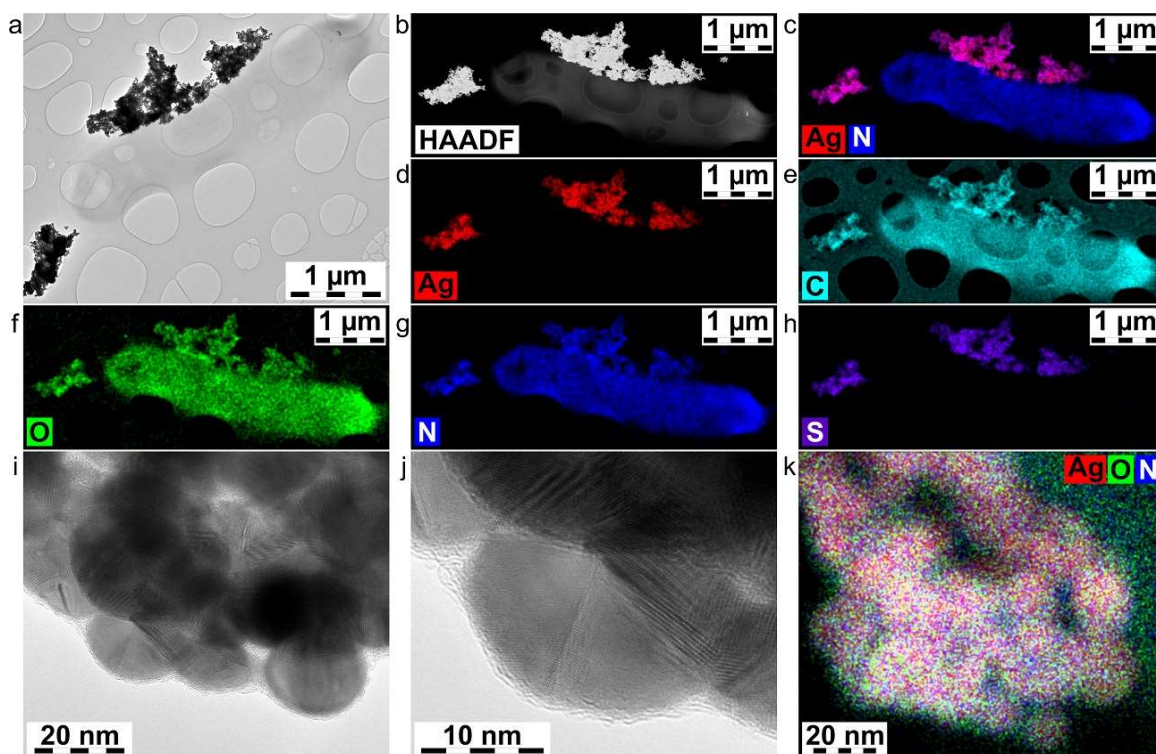


Obrázek 11. UV/Vis absorpční spektra AgNP zředěných M.-H. médiem před a po kultivaci s citlivým a rezistentním kmenem *E. coli* 3954 (a), UV/Vis spektra AgNP zředěných M.-H. médiem před a po přidání flagelinu (b).



Obrázek 12. Vliv přidavku flagelinu k AgNP. Obrázky ukazují okamžitou agregaci AgNP po přidání flagelinu (a, vlevo) a stav po 24 hodinách od přidavku (b, vlevo). Zkumavka vpravo u obou obrázků obsahuje stabilní AgNP bez flagelinu.

Aby se dále potvrdila role flagelinu v agregaci AgNP, byla provedena charakterizace a chemické mapování agregátů stříbra pomocí HRTEM. Obrázky 13a a 13b jasně ukazují agregáty AgNP na povrchu a v těsné blízkosti bakteriální stěny. Chemické mapování odhalilo na povrchu agregátů stříbra přítomnost základních prvků proteinů, jako je uhlík, kyslík, dusík a síra (obr. 13). AgNP tvořící velké agregáty nevstupují dovnitř buňky, jak lze vidět na obrázku 13c a 13d, kde žádné AgNP nejsou uvnitř vidět. Na snímcích z HRTEM je také vidět tenká vrstva flagelinu adsorbovaná na povrchu agregátů (obr. 13i,j).



Obrázek 13. Chemické mapování agregátů stříbra v přítomnosti bakterií. Snímky HRTEM (a) a HAADF (b) agregátů stříbra na povrchu bakteriální buňky. Kombinované chemické mapování stříbra a dusíku (c), d–h jednoprvkové mapování stříbra (d), uhlíku (e), kyslíku (f), dusíku (g) a síry (h), HRTEM snímky stříbrných agregátů, které zobrazují kompaktní organickou vrstvu na povrchu AgNP (i, j) a kombinované chemické mapování stříbra, kyslíku a dusíku (k).

V další části výzkumu jsme se především díky znalosti mechanismu rezistence bakterií k AgNP mohli zaměřit na možnost překonání vyvinuté odolnosti. Zvoleným přístupem byla aplikace inhibitoru bakteriálního flagelinu, který by potlačením produkce proteinu mohl zastavit agregační proces. Je známo, že produkce flagelinu bakteriemi může být inhibována extraktem z kůry granátového jablka (PGRE). Extrakt z kůry granátového jablka (PGRE) byl připraven podle postupu z publikace Asadishad a kol.¹⁰² V případě kultivace *E. coli* CCM 3954 rezistentní k AgNP v přítomnosti AgNP a subinhibitorní koncentrace PGRE 0,6 % (w/w) (MIC PGRE byla určena na 2,5 % (w/w)) se MIC AgNP vůči rezistentní *E. coli* 013 v přítomnosti PGRE snížila z 54 mg/l na 13,5 mg/l a v případě rezistentní *E. coli* CCM 3954 na 6,75 mg/l. *E. coli* CCM 3954 rezistentní k AgNP v přítomnosti AgNP a subinhibitorní koncentrace PGRE tedy nebyla schopna odolávat antibakteriálnímu efektu AgNP, bakterie ztratily svoji získanou rezistenci. MIC AgNP vůči rezistentní *E. coli* 013 se v přítomnosti PGRE snížila na MIC původního citlivého kmene a v případě rezistentní *E. coli* CCM 3954 na srovnatelně nízkou hodnotu MIC citlivého referentního kmene.

Pro ověření stálosti rezistence k AgNP byla *E. coli* rezistentní k AgNP opakovaně inkubována po dobu 120 hodin při 37 °C v 50 ml M.-H. média bez AgNP. Vhodné podmínky ke kultivaci byly zajištěny přeočkováním inokula do čerstvého média po 5, 24, 48, 72 a 96 hodinách. Současně bylo 100 µl bakteriální suspenze naočkováno na M.-H. agarové misky, které byly inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C a kolonie byly použity pro stanovení MIC AgNP. MIC AgNP (108 mg/l) pro AgNP-rezistentní bakterie zůstala stejná i po šesti kultivačních krocích, bakterie si evidentně svoji rezistenci ponechávají. Stabilita rezistence byla dále potvrzena testem s PGRE, kdy po inkubaci rezistentního kmene se subinhibiční koncentrací PGRE zůstala MIC AgNP stále na hodnotě 108 mg/l.

20. Vliv média a stabilizačního činidla na toxicitu AgNP vůči

*Daphnia magna*¹

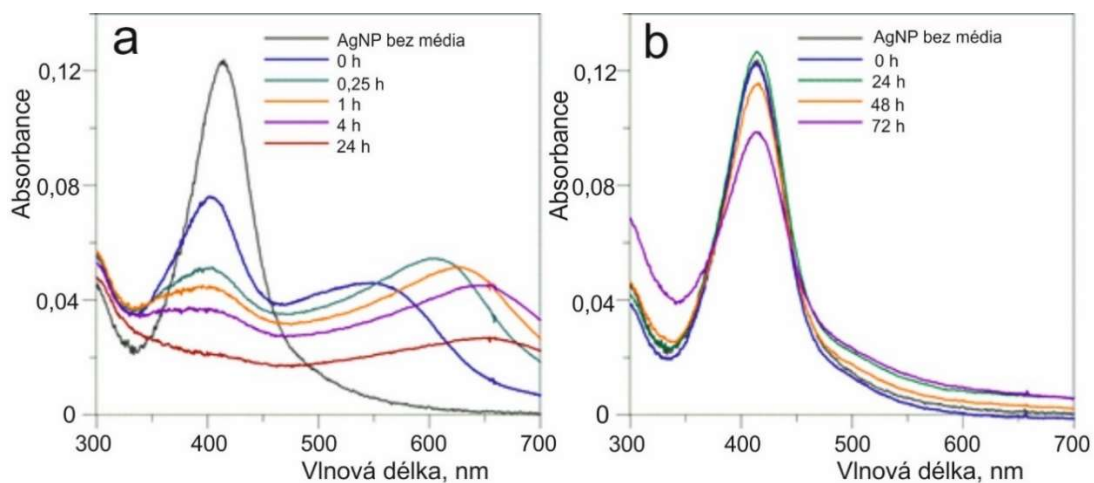
AgNP o průměrné velikosti 28 nm byly syntetizovány Tollensovou metodou, která je detailněji popsána výše. Pro experimenty se stabilizovanými AgNP v neředěném médiu byla do připravené disperze AgNP přidána želatina o konečné koncentraci 0,005 % a v případě ředěného média želatina o konečné koncentraci 0,0001 %.

Monitorování stability AgNP o koncentraci 1 mg/l v neředěném a 2krát ředěném kultivačním médiu M4 bylo založeno na sledování změny polohy plazmonového rezonančního píku lokalizovaného původně u 412 nm.

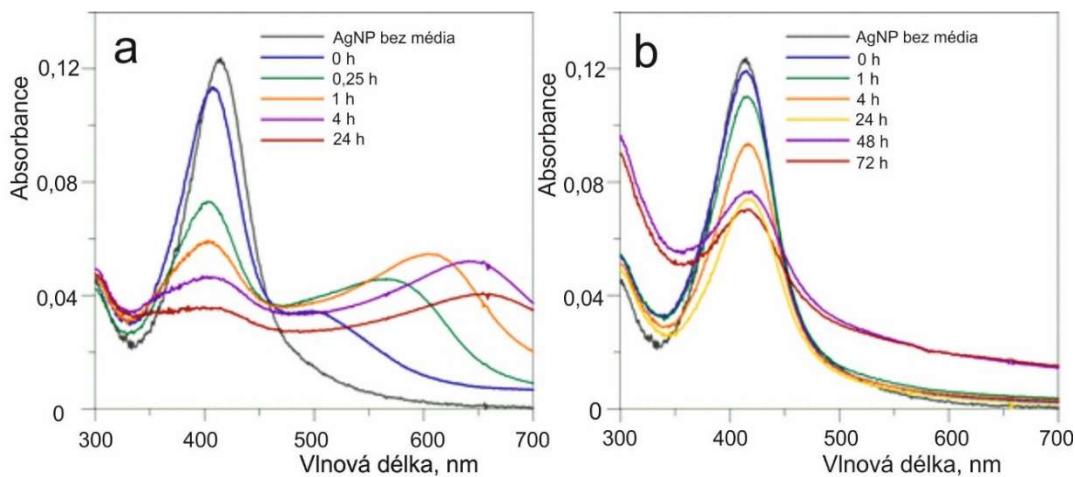
Jakmile se smíchaly AgNP s ředěným i neředěným médiem byla ovlivněna jejich agregační stabilita, jak bylo patrné z UV/Vis spekter a zvýšení průměrné velikosti z 28 nm na 260 nm (obr. 14a a 15a). Barva disperze se změnila ze žlutohnědé na modrošedou. Absorpční pík původních částic s maximem u 412 nm se postupně snižoval a zároveň se objevil sekundární pík u 545 nm (neředěné médium) a 505 nm (2krát ředěné médium) ihned po smíchání s médiem. Pozice sekundárního maxima se v čase posouvala k vyšším vlnovým délkám, což koresponduje s narůstající velikostí částic.¹³ Po 24 hodinách byla stanovena průměrná velikost částic 420 nm. TEM snímky pořízené 24 hodin po smíchání s ředěným i neředěným médiem potvrdily přítomnost velkých aglomerátů, které vznikly z původních malých AgNP (obr. 16). Navíc se v neředěném médiu rekrytalizací zformovaly velké částice o

¹ Přijato jako: **Smékalová, M., Panáček, A., Jančula, D., Maršálek, B., Kolařík, J., Pucek, R., Kvítek, L. a Zbořil, R.** Effects of culture medium conditions on stability, crystallinity and chronic toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. Podáno do redakce časopisu *Applied Materials Today*.

velikostech kolem 200 nm (obr. 16a,b). Tento mechanismus rekrystalizace byl popsán v práci Pucek a kol.¹⁰³



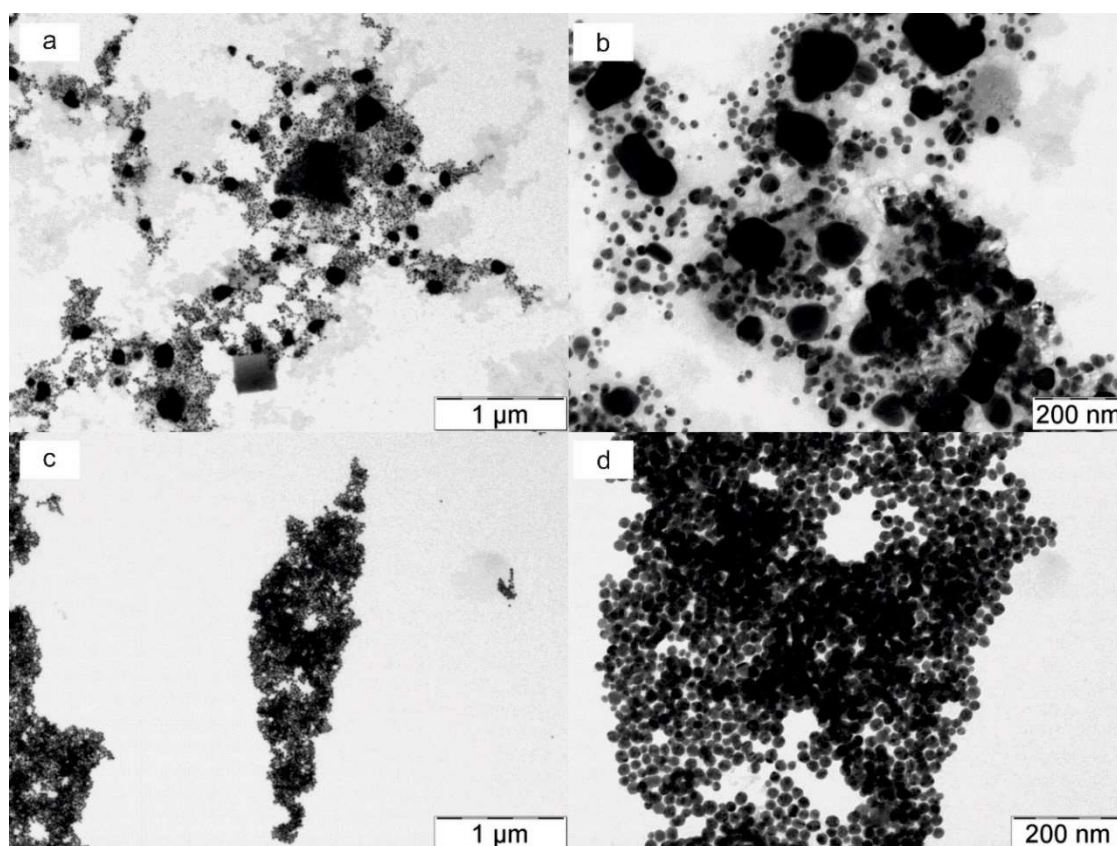
Obrázek 14. UV/Vis absorpční spektra nestabilizovaných AgNP (10 mg/l) v nezředěném médiu M4 zaznamenaná během 24 hodin (a) a AgNP stabilizované 0,005% želatinou v nezředěném médiu M4 zaznamenaná během 72 hodin (b).



Obrázek 15. UV/Vis absorpční spektra nestabilizovaných AgNP (10 mg/l) ve 2krát zředěném médiu M4 zaznamenaná během 24 hodin (a) a AgNP stabilizované 0,0001% želatinou ve 2krát zředěném médiu M4 zaznamenaná během 72 hodin (b).

Aby se předešlo agregaci AgNP v kultivačním médiu, které je koncentrovaným elektrolytem, byly AgNP stabilizovány želatinou. Ke stabilizaci AgNP byly použity velmi nízké koncentrace želatiny, a to 0,005 % pro neředěné médium a 0,0001 % pro 2krát ředěné médium. Želatina o koncentraci 0,005 % úspěšně stabilizovala AgNP, což potvrdila UV/Vis absorpční spektra, kde nebyly pozorovány žádné dramatické změny absorpčního pásu povrchového plasmu (obr. 14b) ve srovnání s nestabilizovanými

AgNP (obr. 14a). Disperze si také držela svoji žlutohnědou barvu. V oblasti od 450 nm do 550 nm byla zaznamenána slabá absorpce, která naznačuje mírný nárůst průměrné velikosti AgNP na 33 nm (obr. 14b), nicméně nebyla pozorována žádná rekrystalizace. Disperze AgNP s 0,0001 % želatiny byla méně stabilní ve srovnání s použitím vyšší koncentrace želatiny. Došlo k postupnému snižování pásu povrchového plazmonu s maximem u 412 nm (obr. 15b) a zvýšení průměrné velikosti částic na 80 nm po 24 hodinách. Po 24 hodinách byla pozorována částečná agregace AgNP stabilizovaných 0,0001 % želatiny následována sedimentací. Takto nízká koncentrace želatiny není dostačující k úplné stabilizaci AgNP, ale zpomaluje agregaci a předchází rekrystalizaci AgNP do větších aglomerátů (za podmínek, při kterých byly testy prováděny).



Obrázek 16. Snímky z TEM velkých aglomerátů stříbra tvořených rekrystalizací a agregací pořízené 24 hodin po smíchání disperze AgNP s neředěným (a, b) a zředěným (c, d) kultivačním médiem.

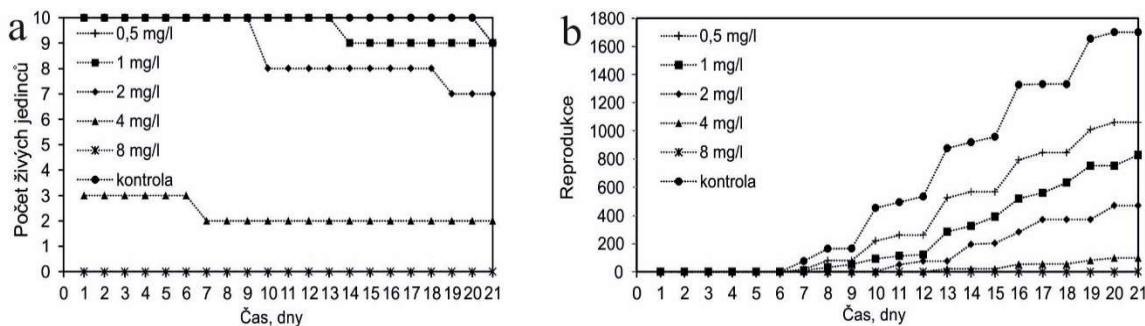
Sladkovodní korýš *D. magna* byl použit jako standardní testovací organismus. Jako kultivační médium bylo připraveno standardní Elendtovo médium M4 (CSN ISO 10706, 2001) obsahující základní anorganické soli a vitamíny. Hodnota pH média byla 7,2.

Při testování chronické toxicity se postupovalo podle směrnice Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) 211 pro testování chemikálií.¹⁰⁴ Deset jedinců rozdělených do deseti kádinek s 50 ml média bylo exponováno po 21 dní. Dafnie byly kultivovány v cyklu 16 hodin světlo a 8 hodin tma při 18–22 °C. Organismy byly denně krmeny řasou *Pseudokirchneriella subcapitata*. Koncentrace nestabilizovaných AgNP v neředěném médiu byly 0,5–8,0 mg/l a stabilizovaných AgNP 0,001–1,000 mg/l. Koncentrace stabilizovaných i nestabilizovaných AgNP ve 2krát zředěném médiu byly 0,03–0,50 mg/l. Jako negativní kontrola bylo použito samotné médium M4. Médium a toxikanty byly měněny za čerstvé každé tři dny. Během 21denní expozice byly každý den zaznamenávány počty přeživších dospělců a počty nově narozených jedinců. Den první reprodukce, celkový počet potomků a délka dospělců na konci testu byla také určena. Nakonec se spočítala hodnota EC₅₀ (koncentrace látky, která způsobí určitý efekt u 50 % testovaných organismů). Pro analýzu statisticky významných rozdílů mezi charakteristikami jedinců z exponované skupiny a kontrolou byl aplikován neparametrický Kruskal-Wallisův test ($p < 0,05$).

Součástí testů chronické toxicity stabilizovaných AgNP bylo i testování chronické toxicity samotné želatiny v příslušných koncentracích 0,0001 % pro 2krát ředěné médium a 0,005 % pro neředěné médium.

Jak se zřetelně ukázalo, nestabilizované AgNP v neředěném médiu měly nejnižší negativní dopad na populaci dafnií ze všech provedených experimentů. Pro testování byly použity vyšší koncentrace AgNP v rozsahu 0,5–8 mg/l (obr. 17a). Počet přeživších postupně klesal s rostoucí koncentrací AgNP. Expozice nejvyšší použité koncentraci 8 mg/l vedla ke 100% mortalitě hned v první den experimentu. Nejnižší použitá koncentrace 0,5 mg/l pak neukázala žádný negativní vliv na dospělé kromě úhynu jednoho jedince 21. den, který taktéž uhynul v kontrolní skupině.

Přestože koncentrace 0,5, 1 a 2 mg/l neměly žádný nebo jen mírný toxický vliv na životaschopnost rodičovských organismů, byla reprodukce silně ovlivněna v celém koncentračním rozsahu AgNP od 0,5 až po 8 mg/l (obr. 17b). S rostoucí koncentrací AgNP byl počet potomků nižší a čas prvního snůšky byl opožděn. Celkový počet potomků na konci experimentu klesl na 62 % kontroly dokonce u nejnižší použité koncentraci 0,5 mg/l. Koncentrace 2 mg/l AgNP způsobila, že se čas první snůšky opozdil o jeden den (kontrola 7,6 dne) a při dvojnásobné koncentraci 4 mg/l dokonce vzrostl na 14,5 dne. Při koncentraci 8 mg/l se pak nevylíhli žádní potomci. Délka dospělců na konci testu postupně klesala s rostoucí koncentrací AgNP z 5 mm (kontrola) na 4,1 mm (4 mg/l). EC₅₀ (reprodukce) byla určena na 1 mg/l AgNP.



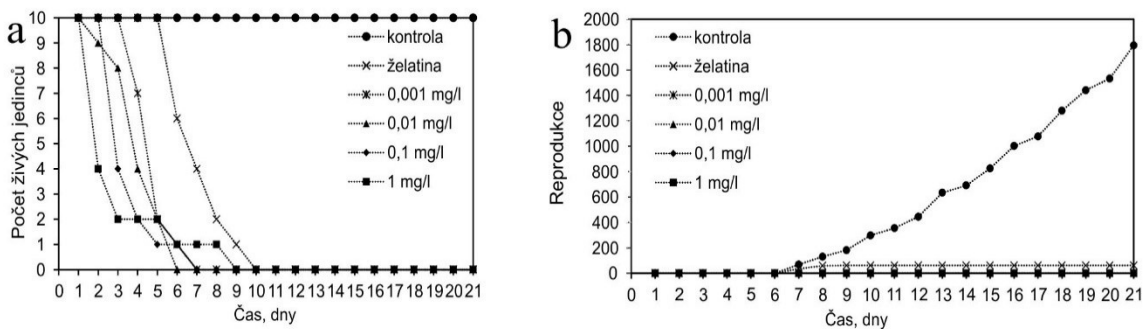
Obrázek 17. Počet přeživších jedinců (a) a potomků (b) *D. magna* exponovaných nestabilizovanému AgNP v neředěném médiu M4 během 21 dní.

Důvodem nízké toxicity byla agregace a rekrystalizace původních malých 28nm AgNP do větších částic. TEM snímky pořízené 24 hodin po smíchání AgNP s médiem potvrdily, že původní malé částice byly přítomny spolu s částicemi nově zformovanými rekrystalizací o průměru kolem 200 nm (obr. 16a,b). Oxidační činidla a koordinační ligandy hrají klíčovou roli v procesu rekrystalizace, protože způsobují tzv. (oxidative etching) oxidační leptání a rozpouštění AgNP, které podporuje růst nových krystalů.^{87,103,105}

Aby mohla být studována toxicita AgNP v jejich původní neovlivněné velikosti, AgNP byly stabilizovány želatinou. Želatina o koncentraci 0,005 % zcela zabránila agregaci v neředěném médiu během 3denního experimentu (obr. 14b). Stabilizované AgNP projevily mnohem vyšší toxicitu než nestabilizované AgNP, jak potvrdil pokles počtu přeživších dospělců během testu chronické toxicity (obr. 18a). Toxicita byla zaznamenána již během prvních tří dnů testování, kdy třetí den byla pozorována 80% mortalita pro nejvyšší testovanou koncentraci AgNP 1 mg/l, 60% pro 0,1 mg/l a 20% pro 0,01 mg/l. Nejnižší koncentrace 0,001 mg/l neprojevila žádný toxický vliv během těchto tří dnů, nicméně počet dospělců klesl čtvrtý den na 7 a dokonce na jednoho jedince 6. den a 100% mortality bylo dosaženo 7. den. Od devátého dne nezbyl žádný přeživší jedinec v přítomnosti AgNP ve všech testovaných koncentracích.

Překvapivě se želatina během testování chronické toxicity také projevila toxicky. Jedinci vystavení čisté želatině o koncentraci 0,005 % postupně umírali mezi 6. a 10. dnem (obr. 18a).

V přítomnosti stabilizovaných AgNP se nenarodili žádní potomci. Želatina také značně ovlivnila reprodukci dafnií (obr. 18b). Potomci v přítomnosti čisté želatině dosáhli celkového počtu pouze 61 oproti kontrolní skupině s počtem 1794 potomků.

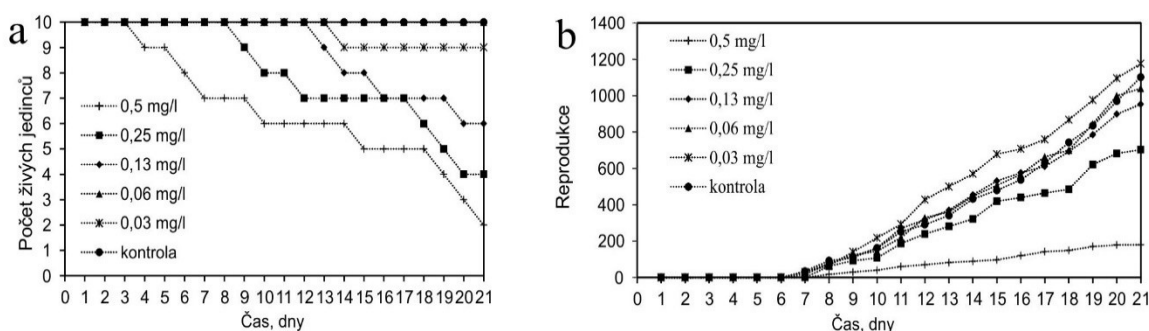


Obrázek

18. Počet přeživších jedinců (a) a potomků (b) *D. magna* exponovaných stabilizovanému AgNP 0,005% želatinou v neředitelném médiu M4 během 21 dní.

Nestabilizované AgNP ve 2krát zředěném médiu byly více toxické (obr. 19) než nestabilizované AgNP v nezředěném médiu (obr. 17). S rostoucí koncentrací AgNP postupně ubýval počet přeživších dospělců a při nejvyšší použité koncentraci 0,5 mg/l byl po 21 dnech pouze dva. Expozice AgNP o koncentracích 0,06 mg/l a 0,03 mg/l nebyly pro dospělé letální kromě jednoho jedince 14. den vystavenému 0,03 mg/l AgNP.

Při všech testovaných koncentracích AgNP také postupně klesal počet potomků (obr. 19b). Oproti 1102 potomkům, kteří se narodili v kontrole bez AgNP, klesl celkový počet potomků na konci testu na 180 v přítomnosti 0,5 mg/l AgNP. Ačkoliv uhynul jeden jedinec při 0,03 mg/l počet potomků byl při této koncentraci AgNP nejen nepatrně vyšší (1176) než u 0,06 mg/l (1040) ale navíc byla pozorována hormeze. Nebyla však ovlivněna ani doba první snůšky ani délka dospělců u žádné ze skupin. Vypočítaná EC_{50} AgNP pro reprodukci byla 0,32 mg/l.

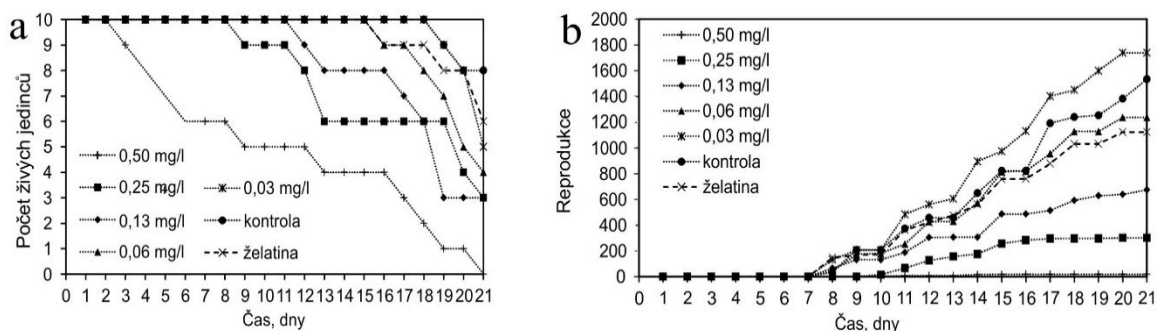


Obrázek 19. Počet přeživších jedinců (a) a potomků (b) *D. magna* exponovaných nestabilizovanému AgNP ve 2krát zředěném médiu M4 během 21 dní.

Dafnie postupně umíraly při vystavení celému rozsahu koncentrací AgNP stabilizovaných 0,0001% želatinou od 0,03 mg/l do 0,5 mg/l (obr. 20a). Na konci testu s AgNP o koncentraci 0,5 mg/l

nepřežil žádný dospělec a počet potomků byl pouze 19. Koncentrace 0,25 mg/l AgNP byla přirozeně toxicitější než následujících 0,13 mg/l kromě vyššího počtu přeživších dospělců 19. a 20. den. Nicméně při obou koncentracích byl stejný konečný počet dospělců, tedy tři. AgNP o koncentraci 0,06 mg/l byly mírně toxické, kdy jeden jedinec zemřel 16. den a pouze 4 jedinci přežili na konci testu. Nejnižší koncentrace AgNP 0,03 mg/l také vedla ke smrti jednoho jedince 19. den a na konci testu zbylo 5 jedinců. Mírnou toxicitu vykazovala také želatina ke konci testu, nikoli však v rozsahu, který by ovlivnil interpretaci toxicity samotných AgNP (obr. 20a).

V koncentračním rozsahu AgNP od 0,5 mg/l do 0,06 mg/l byl zaznamenán také postupný pokles celkového počtu potomků s rostoucí koncentrací AgNP (obr. 20b). Taktéž byla pozorována hormeze v nejnižší použité koncentraci AgNP 0,03 mg/l, kdy celkový počet potomků dosáhl 1739 oproti 1534 jedincům v kontrolní skupině. Ačkoliv želatina měla za následek méně mrtvých dospělců než AgNP o koncentraci 0,06 mg/l (1237), celkový počet potomků byl ve skupině za přítomnosti želatiny nižší (1123). Vypočítaná EC_{50} AgNP pro reprodukci byla 0,16 mg/l. Doba první snůšky se v žádné ze skupin statisticky významně nelišila od kontrolní skupiny (8,8 dne). Délka dospělců se významně lišila od kontroly po expozici 0,25 mg/l AgNP, kdy se snížila ze 4,8 mm na 3,3 mm.



Obrázek 20. Počet přeživších jedinců (a) a potomků (b) *D. magna* exponovaných stabilizovanému AgNP 0,0001% želatinou ve 2krát zředěném médiu M4 během 21 dní.

Závěr

Dizertační práce prezentuje ve své teoretické i praktické části poznatky z oblasti biologické aktivity nanočástic stříbra vůči eukaryotním a prokaryotním organismům. Práce na jedné straně vyzdvihuje antimikrobiální vlastnosti AgNP a jejich synergické působení s antibiotiky vůči citlivým a vysoce rezistentním bakteriím a zároveň na straně druhé varuje před možností vzniku bakteriální rezistence podobně jako u antibiotik a před jejich toxikologickými a ekotoxikologickými riziky.

Pro studium biologických vlastností byly převážně aplikovány kulovité AgNP s průměrnou velikostí 28 nm, které byly syntetizovány ověřenou a spolehlivou metodou vycházející z Tollensovy reakce, která spočívá v redukci amoniakálního komplexu stříbra redukujícími sacharidy. Pro posouzení vlivu velikosti AgNP na společný antibakteriální účinek s antibiotiky byly navíc připraveny částice s menší průměrnou velikostí 8 nm redukcí silnějším činidlem tetrahydridoboritanem sodným.

První část experimentální práce je zaměřena na studium společného antibakteriálního účinku AgNP v kombinaci s antibiotiky. Dosažené výsledky této studie prokázaly, že AgNP posilují účinek celé řady antibiotik proti různým druhům nejen lidských, ale i zvířecích Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií, a to nezávisle na mechanismu účinku a chemické struktuře použitých antibiotik. Pozitivní výsledky přineslo testování synergie nejen vůči bakteriím citlivým k antibiotikům, ale i vůči multirezistentním enterobakteriím. Synergický antibakteriální efekt AgNP v kombinaci s antibiotiky vůči citlivým i rezistentním bakteriím byl dosažen při velmi nízkých koncentracích, řádově až v desetinách mg/l stříbra. Takto nízké koncentrace AgNP v kombinaci s antibiotiky nevykazovaly cytotoxický účinek vůči savčím buňkám a nepředstavují tak toxikologické riziko pro vyšší organismy. Navíc v případě rezistentních bakterií došlo k obnovení citlivosti bakterií k antibiotikům v kombinaci s AgNP, jinými slovy byla úspěšně překonána bakteriální rezistence vůči antibiotikům, pokud se aplikovala společně s AgNP.

V druhé části experimentální práce se podařilo vyvolat a následně objasnit mechanismus rezistence bakterií *E. coli* a *P. aeruginosa* k AgNP po opakované expozici subinhibičním koncentracím AgNP. Rezistence k AgNP byla indukována poměrně snadno a brzy, již ve 13. kultivačním kroku vykazovaly testované bakterie zvýšenou odolnost vůči AgNP. Příčinou indukované rezistence je produkce proteinu flagelinu, který způsobuje agregaci AgNP za vzniku rozměrných sedimentujících částic stříbra, které nevykazují antibakteriální účinnost. Tento doposud v odborné literatuře nepopsaný objev má obrovský význam nejen v prevenci vzniku rezistence bakterií, ale i v oblasti eliminace vysoce infekčních bakterií.

Poslední část práce popisuje výsledky studie vlivu koncentrace živného média a stabilizačních činidel na stabilitu a dlouhodobou toxicitu AgNP vůči organismus *D. magna*. AgNP bez dodatečné povrchové stabilizace snadno a rychle podléhají agregaci díky vysoké iontové síle živného média a následně až rekrytalizaci do větších útvarů doprovázené ztrátou toxicity. Naopak v případě aplikace živného média s poloviční koncentrací a v případě želatinou stabilizovaných AgNP byla jejich toxicita k *D. magna* výrazně vyšší vzhledem k zachování malého rozměru a tím vysoké biologické aktivity AgNP.

Summary

Theoretical and practical part of dissertation thesis discussed discoveries related to biological activity of silver nanoparticles against eukaryotic and prokaryotic organisms. On the one hand, the thesis is focused on antimicrobial properties of AgNPs and their synergistic action with antibiotics against highly resistant bacteria and, on the other hand, deals with possible occurrence of bacterial resistance to AgNPs similar to antibiotics and their toxicological and eco-toxicological risks.

For study of biological properties, spherical AgNPs with mean diameter of 28 nm were applied. AgNPs were synthesized by reliable method derived from Tollen's reaction, which is based on reduction of ammonia complex of silver by reducing saccharides. Also, smaller AgNPs with mean diameter of 8 nm was prepared by reduction with stronger reducing agent sodium borohydride for assessment of size effect on antibacterial activity.

The first part of experimental work is focused on study of combined antibacterial action of AgNPs with antibiotics. The results proved that AgNPs enhance the activity of many antibiotics against different species of human and animal Gram-positive and Gram-negative bacteria. This enhancement was shown with no dependence on mechanism of action or chemical structure of antibiotics. Positive results of synergy testing was shown not only against bacteria sensitive to antibiotics but also against multi-resistant Enterobacteriaceae. Synergic antibacterial effect of AgNPs in combination with antibiotics against both, sensitive and resistant bacteria, was achieved in very low concentrations, in the order from tenths to units of mg/l. These concentrations of AgNPs does not exhibit toxic effects against mammalian cells and does not pose a toxicological risk for higher organisms. Moreover, in the case of resistant bacteria, restoration of sensitivity to antibiotics caused by combination of AgNPs was shown.

The second part of experimental work deals with resistance of bacteria to AgNPs. Resistance to AgNPs was successfully induced in *E. coli* and *P. aeruginosa* and mechanism of this resistance was elucidated. The resistance was caused by exposition the bacteria to sub-inhibitory concentrations of AgNPs and was observed only after 13 exposition steps, when bacteria exhibit increased tolerance to AgNPs. The observed induced resistance is based on production of protein flagellin, which causes aggregation of AgNPs and formation of large particles of silver, which sediment and does not exhibit antibacterial activity. This phenomenon, which has never been described in literature before, has importance in prevention of emergence of resistance and in the elimination of highly infectious bacteria.

The last part of work describes the influence of culture medium concentration and surface stabilizers to stability and long-term toxicity of AgNPs against crustacean *D. magna*. AgNPs without

additional surface stabilization subject to fast aggregation as result of high ionic strength of culture medium. The aggregation is accompanied with recrystallization to bigger particles and loss of toxicity. On the contrary, in case of using 2-fold diluted medium and AgNPs stabilized by gelatine, the toxicity against *D. magna* was significantly higher, because small diameter and AgNP biological activity was unaffected.

Seznam použitých zkratek

AFM	mikroskopie atomárních sil
AgNP	nanočástice stříbra
AMC	amoxilin + klavulanát
AMI	amikacin
AMP	ampicilin
AmpC	cefalosporinázy
AMS	ampicilin/sulbaktam
ATM	aztreonam
AZT	aztreonam
BHI	bujón z mozkosrdcové infuze
CCA	ceftazidim + klavulanát
CFU	jednotky tvořící kolonie
CIP	ciprofloxacin
CLI	klindamycin
CLSI	Institut pro klinické a laboratorní standardy
CMP	chloramfenikol
COL	kolistin
COT	kotrimoxazol
COX	cefotaxim
CPM	cefepim
CPR	cefoperazon
CRX	cefuroxim
CReSA	centrum pro výzkum nemocí zvířat
CTZ	ceftazidim
CXT	cefoxitin
CZD	ceftazidim
CZL	cefazolin
DDST	diskový difuzní test s inhibítorem betalaktamáz
DLS	dynamický rozptyl světla
DLVO	teorie stability lyofobních koloidů (dle jmen: Derjagin, Landau, Verwey a Overbeek)
EC ₅₀	koncentrace látky, která způsobí určitý efekt u 50 % testovaných organismů
EPS	extracelulární polymerní látky
ERY	erytromycin
EUCAST	Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti
FEP	cefepim
FIC	frakční inhibiční koncentrační index
GEN	gentamicin
HAADF	detektor elektronů difraktovaných pod velkými úhly
HRTEM	transmisní elektronová mikroskopie s vysokým rozlišením
KPC	karbapenamázy
LD ₅₀	dávka látky, která je smrtelná pro 50 % testovaných organismů
M.-H.	Müller-Hinton
MER	meropenem
MIC	minimální inhibiční koncentrace
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
OFL	ofloxacin

OXA	oxacilin
OXO	oxolinová kyselina
PAA	kyselina polyakrylová
PEG	polyethylenglykol
PEN	penicilin
PGRE	extrakt z kůry granátového jablka
PIP	piperacilin
PPT	piperacilin/tazobaktam
PVP	polyvinylpyrrolidon
SDS	dodecyl sulfát sodný
TEI	teikoplanin
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TET	tetracyklin
TFA	kyselina trifluoroctová
VAN	vankomycin

Reference

1. Jana, N. R. & Pal, T. Growing small metal particle as redox catalyst. *Curr. Sci.* 75, 145–149 (1998).
2. Baliyan, A., Usha, S. P., Gupta, B. D., Gupta, R. & Sharma, E. K. Localized surface plasmon resonance–based fiber-optic sensor for the detection of triacylglycerides using silver nanoparticles. *J. Biomed. Opt.* 22, 1 (2017).
3. Furno, F. et al. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: A new approach to prevention of infection? *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 1019–1024 (2004).
4. Peiris, S., McMurtrie, J. & Zhu, H.-Y. Metal nanoparticle photocatalysts: emerging processes for green organic synthesis. *Catal. Sci. Technol.* 6, 320–338 (2016).
5. Panáček, A. et al. Polyacrylate-Assisted Size Control of Silver Nanoparticles and Their Catalytic Activity. *Chem. Mater.* 26, 1332–1339 (2014).
6. Pecora, R. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *J. Nanoparticle Res.* 2, 123–131 (2000).
7. Soukupová, J., Kvítek, L., Panáček, A., Nevěčná, T. & Zbořil, R. Comprehensive study on surfactant role on silver nanoparticles (NPs) prepared via modified Tollens process. *Mater. Chem. Phys.* 111, 77–81 (2008).
8. Verwey, E. J. W. & Overbeek, J. T. G. Theory of the stability of lyophobic colloids. *The Journal of physical and colloid chemistry* 51, 631–636 (1947).
9. Brown, M. A., Goel, A. & Abbas, Z. Effect of Electrolyte Concentration on the Stern Layer Thickness at a Charged Interface. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 55, 3790–3794 (2016).
10. Sharma, V. K., Yngard, R. a & Lin, Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv. Colloid Interface Sci.* 145, 83–96 (2009).
11. Panáček, A. et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem. B* 110, 16248–16253 (2006).
12. Panáček, A. et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 30, 6333–6340 (2009).
13. Kvítek, L. et al. Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *J. Phys. Chem. C* 112, 5825–5834 (2008).
14. Kvítek, L. et al. Initial Study on the Toxicity of Silver Nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. *J. Phys. Chem. C* 113, 4296–4300 (2009).
15. Sujitha, V. et al. Green-synthesized silver nanoparticles as a novel control tool against dengue virus (DEN-2) and its primary vector *Aedes aegypti*. *Parasitol. Res.* 114, 3315–3325 (2015).
16. Knetsch, M. L. W. & Koole, L. H. New strategies in the development of antimicrobial coatings: The example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 3, 340–366 (2011).
17. Vasilev, K., Cook, J. & Griesser, H. J. Antibacterial surfaces for biomedical devices. *Expert Rev. Med. Devices* 6, 553–567 (2009).
18. Samuel, U. & Guggenbichler, J. P. Prevention of catheter-related infections: The potential of a new nano-silver impregnated catheter. *Int. J. Antimicrob. Agents* 23, 75–78 (2004).
19. Chaloupka, K., Malam, Y. & Seifalian, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 28, 580–588 (2010).
20. Shrivastava, S. et al. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* 18, 225103 (2007).
21. Das, B. et al. Green-synthesized silver nanoparticles kill virulent multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains: A mechanistic study. *BLDE Univ. J. Heal. Sci.* 1, 89–101 (2016).
22. Zhang, G., Liu, Y., Gao, X. & Chen, Y. Synthesis of silver nanoparticles and antibacterial property of silk fabrics treated by silver nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* 9, 1–8 (2014).
23. Ersoy, M. S. & Onder, E. Electroless silver coating on glass stitched fabrics for electromagnetic shielding applications. *Text. Res. J.* 84, 2103–2114 (2014).

24. Mecha, C. A. & Pillay, V. L. Development and evaluation of woven fabric microfiltration membranes impregnated with silver nanoparticles for potable water treatment. *J. Memb. Sci.* 458, 149–156 (2014).
25. Willcox, M. D. P., Hume, E. B. H., Vijay, A. K. & Petcavich, R. Ability of silver-impregnated contact lenses to control microbial growth and colonisation. *J. Optom.* 3, 143–148 (2010).
26. Lubick, N. Nanosilver toxicity: Ions, nanoparticles - Or both? *Environmental Science and Technology* 42, 8617 (2008).
27. Xiu, Z. M., Zhang, Q. B., Puppala, H. L., Colvin, V. L. & Alvarez, P. J. J. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Lett.* 12, 4271–4275 (2012).
28. Cabisco, E., Tamarit, J. & Ros, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* 3, 3–8 (2000).
29. Jung, W. K. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2171–2178 (2008).
30. Lara, H. H., Ayala-Núñez, N. V., Ixtepan Turrent, L. D. C. & Rodríguez Padilla, C. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 615–621 (2010).
31. Feng, Q. L. et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* 52, 662–668 (2000).
32. Holt, K. B. & Bard, A. J. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺. *Biochemistry* 44, 13214–13223 (2005).
33. Morones, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346–2353 (2005).
34. Martínez-Castañón, G. A., Niño-Martínez, N., Martínez-Gutierrez, F., Martínez-Mendoza, J. R. & Ruiz, F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J. Nanoparticle Res.* 10, 1343–1348 (2008).
35. Agnihotri, S., Mukherji, S. & Mukherji, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv.* 4, 3974–3983 (2014).
36. Lu, Z., Rong, K., Li, J., Yang, H. & Chen, R. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24, 1465–1471 (2013).
37. Pal, S., Tak, Y. K. & Song, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1712–1720 (2007).
38. Kalan, L. & Wright, G. D. Antibiotic adjuvants: multicomponent anti-infective strategies. *Expert Rev. Mol. Med.* 13, e5 (2011).
39. Li, P., Li, J., Wu, C., Wu, Q. & Li, J. Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 1912–1917 (2005).
40. Jain, J. et al. articles Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use. *Mol. Pharm.* 6, 1388–1401 (2009).
41. Brown, A. N. et al. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2768–2774 (2012).
42. Ghosh, S. et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *Int. J. Nanomedicine* 7, 483–496 (2012).
43. Hwang, I., Hwang, J. H., Choi, H., Kim, K.-J. & Lee, D. G. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *J. Med. Microbiol.* 61, 1719–26 (2012).
44. Habash, M. B., Park, A. J., Vis, E. C., Harris, R. J. & Khursigara, C. M. Synergy of Silver Nanoparticles and Aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5818–5830 (2014).
45. Kora, A. J. & Rastogi, L. Enhancement of antibacterial activity of capped silver nanoparticles in combination with antibiotics, on model gram-negative and gram-positive bacteria. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2013, 871097 (2013).

46. Choudhury, P. & Kumar, R. Multidrug- and metal-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from *Penaeus monodon* of the coastal waters of deltaic Sundarban. *Can. J. Microbiol.* 44, 186–9 (1998).
47. Wagner, S., Gondikas, A., Neubauer, E., Hofmann, T. & Von Der Kammer, F. Spot the difference: Engineered and natural nanoparticles in the environment-release, behavior, and fate. *Angewandte Chemie - International Edition* 53, 12398–12419 (2014).
48. Aminov, R. I. Horizontal Gene Exchange in Environmental Microbiota. *Front. Microbiol.* 2, 158 (2011).
49. Pereira, S. et al. Using extracellular polymeric substances (EPS)-producing cyanobacteria for the bioremediation of heavy metals: do cations compete for the EPS functional groups and also accumulate inside the cell? *Microbiology* 157, 451–458 (2011).
50. Bonnefoy, V. & Holmes, D. S. Genomic insights into microbial iron oxidation and iron uptake strategies in extremely acidic environments. *Environ. Microbiol.* 14, 1597–1611 (2012).
51. Ferris, F. G. & Beveridge, T. J. Binding of a paramagnetic metal cation to *Escherichia coli* K-12 outer-membrane vesicles. *FEMS Microbiol. Lett.* 24, 43–46 (1984).
52. Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B. P. & Das, N. Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review. *J. Environ. Manage.* 146, 383–399 (2014).
53. Miller, C. D. et al. Copper and cadmium: responses in *Pseudomonas putida* KT2440. *Letts. Appl. Microbiol.* 49, 775–783 (2009).
54. Zhang, X. et al. Global transcriptome analysis of hexavalent chromium stress responses in *Staphylococcus aureus* LZ-01. *Ecotoxicology* 23, 1534–1545 (2014).
55. Poirier, I., Hammann, P., Kuhn, L. & Bertrand, M. Strategies developed by the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* BA3SM1 to resist metals: A proteome analysis. *Aquat. Toxicol.* 128–129, 215–232 (2013).
56. Jelenko, C. Silver Nitrate Resistant *E. Coli* : Report of Case THE MODERN revival of the use of silver in its nitrate form or a colloidal preparation began with the work of Moyer and his. (1964).
57. Hobman, J. L. & Crossman, L. C. Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *J. Med. Microbiol.* 64, 471–497 (2015).
58. Asiani, K. R. et al. SilE is an intrinsically disordered periplasmic molecular sponge involved in bacterial silver resistance. *Mol. Microbiol.* 101, 731–742 (2016).
59. Hendry, A. T. & Stewart, I. O. Silver-resistant Enterobacteriaceae from hospital patients. *Can. J. Microbiol.* 25, 915–921 (1979).
60. Gupta, A., Matsui, K., Lo, J. F. & Silver, S. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat. Med.* 5, 183–188 (1999).
61. Silver, S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 341–353 (2003).
62. Li, X. Z., Nikaido, H. & Williams, K. E. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J. Bacteriol.* 179, 6127–32 (1997).
63. Nies, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 313–339 (2003).
64. Silver, S., Phung, L. T. & Silver, G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 627–634 (2006).
65. Li, X. Z., Nikaido, H. & Williams, K. E. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J. Bacteriol.* 179, 6127–6132 (1997).
66. Gunawan, C., Teoh, W. Y., Marquis, C. P. & Amal, R. Induced adaptation of *Bacillus* sp. to antimicrobial nanosilver. *Small* 9, 3554–60 (2013).
67. Khan, S., Mukherjee, A. & Chandrasekaran, N. Silver nanoparticles tolerant bacteria from sewage environment. *J. Environ. Sci.* 23, 346–352 (2011).
68. Graves, J. L. et al. Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. *Front. Genet.* 6, 1–13 (2015).
69. Park, M. V. D. Z. et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* 32, 9810–7 (2011).
70. Zhang, T., Wang, L., Chen, Q. & Chen, C. Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles. 55, 283–291 (2014).

71. Johnston, H. J. et al. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 328–346 (2010).
72. Hsin, Y.-H. et al. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol. Lett.* 179, 130–139 (2008).
73. Krajewski, S. et al. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood. *Acta Biomater.* 9, 7460–7468 (2013).
74. Navarro, E. et al. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* 42, 8959–64 (2008).
75. Burchardt, A. D. et al. Effects of Silver Nanoparticles in Diatom *Thalassiosira pseudonana* and Cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11336–11344 (2012).
76. Jiang, H. S., Qiu, X. N., Li, G. B., Li, W. & Yin, L. Y. Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 1398–1405 (2014).
77. Choi, J. E. et al. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 100, 151–9 (2010).
78. Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F. & Popovic, R. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 80–5 (2012).
79. Oukarroum, A., Barhoumi, L., Pirastru, L. & Dewez, D. Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 902–7 (2013).
80. Zhao, C. M. & Wang, W. X. Size-dependent uptake of silver nanoparticles in *daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11345–11351 (2012).
81. Wang, W. Biokinetic Uptake and Efflux of Silver Nanoparticles in *Daphnia magna*. 44, 7699–7704 (2010).
82. Allen, H. J. et al. Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2742–50 (2010).
83. Gaiser, B. K. et al. Effects of silver and cerium dioxide micro- and nano-sized particles on *Daphnia magna*. *J. Environ. Monit.* 13, 1227 (2011).
84. Park, S.-Y. & Choi, J.-H. Geno- and Ecotoxicity Evaluation of Silver Nanoparticles in Freshwater Crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Eng. Res.* 15, 23–27 (2010).
85. Poynton, H. C. et al. Toxicogenomic responses of nanotoxicity in *Daphnia magna* exposed to silver nitrate and coated silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6288–96 (2012).
86. Asghari, S. et al. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. *J. Nanobiotechnology* 10, 14 (2012).
87. Yang, J., Zhang, Q., Lee, J. Y. & Too, H. P. Dissolution-recrystallization mechanism for the conversion of silver nanospheres to triangular nanoplates. *J. Colloid Interface Sci.* 308, 157–161 (2007).
88. El Badawy, A. M. et al. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticle suspensions. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1260–1266 (2010).
89. Stebounova, L. V., Guio, E. & Grassian, V. H. Silver nanoparticles in simulated biological media: A study of aggregation, sedimentation, and dissolution. *J. Nanoparticle Res.* 13, 233–244 (2011).
90. Erickson, R. J. et al. Effects of Laboratory Test Conditions on the Toxicity of Silver To Aquatic Organisms. *Environmental Toxicol. Chem.* 17, 572–578 (1998).
91. Römer, I. et al. Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests. *J. Chromatogr. A* 1218, 4226–4233 (2011).
92. Tejamaya, M., Römer, I., Merrifield, R. C. & Lead, J. R. Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7011–7017 (2012).
93. Römer, I. et al. The critical importance of defined media conditions in *Daphnia magna* nanotoxicity studies. *Toxicol. Lett.* 223, 103–108 (2013).
94. Munger, M. a et al. In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. *Nanomedicine* 10, 1–9 (2014).

95. Lee, J. H., Mun, J., Park, J. D. & Yu, I. J. A health surveillance case study on workers who manufacture silver nanomaterials. *Nanotoxicology* 6, 667–669 (2012).
96. Vlachou, E. et al. The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: a study of systemic silver absorption. *Burns* 33, 979–85 (2007).
97. Zhang, S. et al. Reduced cytotoxicity of silver ions to mammalian cells at high concentration due to the formation of silver chloride. *Toxicol. Vitro* 27, 739–744 (2013).
98. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, CLSI document VET01-A3 (formerly M31-A3). (2008).
99. Carlson, C. et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B* 112, 13608–19 (2008).
100. Rao, C. N. R., Kulkarni, G. U., Thomas, P. J. & Edwards, P. P. Size-dependent chemistry: properties of nanocrystals. *Chemistry* 8, 28–35 (2002).
101. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015. Available at: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
102. Asadishad, B., Hidalgo, G. & Tufenkji, N. Pomegranate materials inhibit flagellin gene expression and flagellar-propelled motility of uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073. *FEMS Microbiol. Lett.* 334, 87–94 (2012).
103. Pucek, R. et al. Re-crystallization of silver nanoparticles in a highly concentrated NaCl environment—a new substrate for surface enhanced IR-visible Raman spectroscopy. *CrystEngComm* 13, 2242 (2011).
104. OECD. Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. OECD Guidel. Test. Chem. - Eff. Biot. Syst. Section 2, 23 (2012).
105. Long, R., Zhou, S., Wiley, B. J. & Xiong, Y. Oxidative etching for controlled synthesis of metal nanocrystals: atomic addition and subtraction. *Chem. Soc. Rev.* 43, 6288–310 (2014).

Seznam publikací

Monika Smékalová, Virginia Aragon, Aleš Panáček, Robert Pucek, Radek Zbořil a Libor Kvítek. Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. *The Veterinary Journal* 209, 174–179 (2016).

Monika Smékalová, Aleš Panáček, Daniel Jančula, Blahoslav Maršálek, Jan Kolařík, Robert Pucek, Libor Kvítek a Radek Zbořil. Culture medium induced aggregation and re-crystallization of silver nanoparticles reduces their toxicity. Podáno do redakce časopisu *Applied Materials Today*.

Aleš Panáček, Libor Kvítek, **Monika Smékalová**, Renata Večeřová, Milan Kolář, Magdalena Röderová, Filip Dyčka, Marek Šebela, Robert Pucek, Ondřej Tomanec a Radek Zbořil. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology* 13, 65–71 (2018).

Aleš Panáček, **Monika Smékalová**, Renata Večeřová, Kateřina Bogdanová, Magdaléna Röderová, Milan Kolář, Martina Kilianová, Šárka Hradilová, Jens P. Froning, Markéta Havrdová, Robert Pucek, Radek Zbořil a Libor Kvítek. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant *Enterobacteriaceae*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 142, 392–399 (2016).

Aleš Panáček, **Monika Smékalová**, Martina Kilianová, Robert Pucek, Kateřina Bogdanová, Renata Večeřová, Milan Kolář, Markéta Havrdová, Grażyna Anna Płaza, Joanna Chojniak, Radek Zbořil a Libor Kvítek. Strong and Nonspecific Synergistic Antibacterial Efficiency of Antibiotics Combined with Silver Nanoparticles at Very Low Concentrations Showing No Cytotoxic Effect. *Molecules* 21(1), 26 (2016).

Adéla Galandáková, Jana Franková, Nikol Ambrožová, Klára Habartová, Veronika Pivodová, Bohumil Zálešák, Klára Šafářová, **Monika Smékalová** a Jitka Ulrichová. Effects of silver nanoparticles on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Human and Experimental Toxicology* 35(9), 946–957 (2016).