

STRESZCZENIE

Analiza sposobów działania preparatów srebra wobec wybranych szczepów *Escherichia coli*

Mateusz Speruda

Sposób działania poszczególnych preparatów srebra zależy od ich formy aplikacyjnej - mogą one występować w postaci zawiesiny jonów lub nanomateriałów. Materiałem wiodącym w badaniach z użyciem metali ciężkich w nanoskali jest srebro, pierwiastek o udokumentowanym działaniu antybakteryjnym wobec szerokiego spektrum drobnoustrojów: bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, grzybów czy wirusów. Dobierając odpowiednią metodę syntezy preparatów srebra można zaprojektować pożądany nanomateriał i tym samym mieć wpływ na jego właściwości fizykochemiczne tj. rozmiar, kształt, porowatość powierzchni, zawartość procentową wykorzystanego surowca czy stopień dysocjacji. Wraz ze zróżnicowaniem właściwości fizykochemicznych preparatów srebra zmienia się ich zakres działania przeciwdrobnoustrojowego. W głównej mierze skupia się on na zakłóceniu wielu procesów metabolicznych bakterii poprzez interakcję z osłonami komórkowymi, elementami cytoplazmy oraz ingerencję w produkcję reaktywnych form tlenu.

Głównym celem rozprawy doktorskiej jest określenie sposobów działania preparatów srebra (PS) o różnych właściwościach fizykochemicznych wobec wybranych szczepów bakterii Gram-ujemnych z gatunku *Escherichia coli*: *E. coli* J53; *E. coli* ATCC 11229 i jej wariantów o zmienionej wrażliwości na preparaty srebra: N i 74B (*E. coli* ATCC 11229 var. N i *E. coli* ATCC 11229 var. 74B); *E. coli* BW25113 oraz jej mutantu opornego na jony srebra (*E. coli* BW25113 AgR). Cel pracy został osiągnięty dzięki realizacji zadań badawczych takich jak monitorowanie integralności błon komórkowych *E. coli* poprzez ocenę żywotności komórek bakteryjnych w populacji po zastosowaniu preparatów srebra (metoda: mikroskopia fluorescencyjna); detekcja i analiza cytometryczna ROS generowanych w komórkach bakteryjnych badanych szczepów *E. coli* po kontakcie z testowanymi PS (metoda: cytometria przepływowa); analiza i identyfikacja zmian w proteomie błony zewnętrznej szczepów *E. coli* poddanych długotrwałej ekspozycji na badane preparaty srebra (metody: elektroforeza 2-DE oraz spektrometria mas); określenie wpływu temperatury na wrażliwość badanych szczepów *E. coli* wobec różnych PS (metoda: oznaczanie MIC). Elementem pracy doktorskiej była optymalizacja metody badawczej dedykowanej oznaczaniu wewnątrzkomórkowego poziomu ATP u badanych szczepów *E. coli* jako markera uszkodzenia komórek (metoda: spektrofotometria).

Wyniki badań wykazały, że zróżnicowanie preparatów srebra (Ag^+ , preparatu N i 74B) pod względem parametrów fizykochemicznych ma wpływ na ich sposób działania wobec komórek *E. coli*. Różnice w działaniu poszczególnych PS dotyczą, m.in. uszkodzenia błon komórkowych, zmian w proteomie oraz rodzaju i ilości ROS generowanych w komórce po kontakcie z preparatem. Pozostałe badania wykazały zwiększenie efektywności antybakteryjnego działania PS w warunkach hipertermii oraz niekompatybilność bioluminescencyjnej metody oznaczania ATP w pracy z preparatami srebra.

Wyniki badań zaprezentowane w niniejszej pracy doktorskiej mają wpływ na rozwój dyscypliny nauki biologicznej poprzez poszerzenie wiedzy na temat aktywności biologicznej i mechanizmów działania preparatów srebra o różnych właściwościach fizykochemicznych wobec bakterii Gram-ujemnych.

ABSTRACT

Analysis of silver nanoformulations' mode of action against selected *Escherichia coli* strains

Mateusz Speruda

Mode of action (MoA) of particular silver formulations (SF) is dependent on its application: it might occur in the form of ion suspension or nanomaterials. Amongst the heavy metals used as a potential biocides in nanoscale, silver is the compound with the well described antibacterial effectiveness against wide spectrum of microorganisms such as bacteria (both Gram-Negative and Gram-Positive strains), fungi and even viruses. Selection of an appropriate synthesis method defines the formed nanomaterials, by affecting its latter physicochemical properties, such as size, shape, porosity, percentage of silver within material or its degree of dissociation. Differences in physicochemical properties of silver formulations affect its MoA against microorganisms, which focuses mainly on disruption of many metabolic processes of bacteria due to interaction with cell membranes, components of the cytoplasm and ROS production.

The main goal of presented PhD thesis was to determine the MoA of separate silver formulations with different physicochemical properties against selected strains of Gram-Negative bacterium, *Escherichia coli*: *E. coli* J53; *E. coli* ATCC 11229 and its variants with changed susceptibility to silver formulations - N and 74B (*E. coli* ATCC 11229 var. N i *E. coli* ATCC 11229 var. 74B); *E. coli* BW25113 and its mutant resistant to Ag^+ (*E. coli* BW25113 AgR). The aim of PhD thesis was achieved through completion of a few planned research tasks such as: examination of the bacterial membranes' integrity due to evaluation of bacterial cells viability in the population treated with silver formulations (method: fluorescence microscopy); detection and cytometric analysis of reactive oxygen species (ROS) generated in *E. coli* cells after contact with the tested SF (method: flow cytometry); analysis and identification of changes in the outer membrane proteome of *E. coli* strains caused by long-term exposure to silver formulations (methods: two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry); determining the influence of temperature changes on the bacterial cells' susceptibility to different SF (method: MIC test). Another important part of this PhD thesis was to optimize a method dedicated for determination of intracellular ATP level (potential marker of membranes' disruption) in the cells of tested *E. coli* (method: spectrophotometry).

The results showed that the diversity of silver formulations (Ag^+ , N and 74B) in terms of physicochemical parameters affects its mode of action against *E. coli* cells. Differences in the MoA of particular SF include, i.a. membranes' disruption, changes in the proteome and the amount of ROS generated in the cell after contact with the silver formulations. Other studies demonstrated an increase in the antibacterial efficacy of SF under hyperthermic conditions and the incompatibility of the bioluminescent ATP determination method when working with silver formulations.

The results from a research presented in this PhD thesis contribute to the development of biological sciences discipline by broadening the knowledge about biological activity and MoA of silver formulations with different physicochemical properties against Gram-Negative bacteria.