

**Софийски Университет „Св. Климент Охридски”**

**Биологически Факултет**

**Катедра „Обща и промишлена микробиология”**



**Драгомира Светлозарова Даскалова**

**Антимикробна активност на наноструктурни материали**

**АВТОРЕФЕРАТ**

Професионално направление 4.3. Биологически науки (Микробиология)

**Научни ръководители: доц. д-р И. Иванова**

**доц. д-р О. Ангелов**

София 2019

Дисертационният труд съдържа 178 страници формат А4, 8 таблици и 79 фигури. В библиографската справка са включени 432 литературни източника, от които 3 на кирилица и 429 на латиница.

Материалите, обект на изследване в този дисертационен труд са изработени и предоставени както следва от:

- Нанопрахове и и колаген базирани нанокompозити – от Проф. Тодорка Владкова, ХТМУ, София.
- Тънки филми – от доц. д-р Орлин Ангелов, ЦІСЕНЕИ, БАН

Експерименталната работа е извършена в лаборатория „Бионанотехнологии” на Катедра „Обща и промишлена микробиология” , БФ, СУ”Св. Климент Охридски” и Лабораторния комплекс на URBM, Univetsity of Namur, Belgium (Изследователска база за биология на микроорганизмите към Университет Намюр, Белгия) по време на мобилност по програма Еразъм +.

Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на катедра „Обща и промишлена микробиология” към БФ на СУ”Св. Климент Охридски” проведено на 29.11.2019 г и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед .....на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски”.

Научно жури:

1. ....
2. ....
3. ....
4. ....
5. ....

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... от .....часа в сградата на Биологически факултет към СУ”Св. Климент Охридски”.

Материалите по защитата се намират на сайта на Биологически Факултет и катедра „Обща и промишлена микробиология”

## I. Въведение

Нанотехнологиите са свързани с материали, системи и процеси, поне едно от измеренията на които е под 100 nm. Нанотехнологиите правят революция в електрониката, земеделието, хранително-вкусовата промишленост и медицината чрез нови техники като прецизно земеделие, повишаване способността на растенията да усвояват хранителни вещества, по-ефективно и целенасочено използване на суровини, ефективни системи за обработка, съхранение и опаковане на хранителни продукти, диагностика и контрол на болести, таргетно лечение. Нарастващата устойчивост на патогенните микроорганизми срещу антибиотици е обект на много изследвания [Wood & Moellering 2003; Singh, 2013; Tirumalai et al., 2019] и доклади на Европейската мрежа за наблюдение на антибиотичната устойчивост [EARS-Net] и Световната Здравна Организация [WHO Report, 2014]. Злоупотребата и липсата на ефективен контрол върху лечението с антибиотици, както и способността на бактериите бързо да се адаптират и развият, заплашва човечеството с повторно навлизане в ера на неконтролируеми инфекции: ерата на т.нар. резистентни супермикроби - “superbugs”. Много инфекциозни причинители и изолати от околната среда не се повлияват от съществуващите антимикробни средства и прилаганите лекарствени дози [Cartelle et al., 2004; del Mar Tomas et al., 2005; Bou et al., 2002]. Това излага на висок риск деца, възрастни хора, пациенти с хронични заболявания и имунни нарушения. Причините за нарастващата устойчивост към антибиотици са различни: от самолечение до повишено използване на антибиотици при животните като стимулатор на растежа [Gestal et al., 2014]. Съществуват множество доказателства за все по-често възникващи инфекции от изолати от околната среда и коменсали (опортюнистични патогени) [Yao et al., 2005; Fernández et al., 2015; Messelhäußer et al., 2018]. Вниманието на научната общност е насочено към проучването на различни нанотехнологични продукти като алтернатива на антибиотичите и по-ефективни антимикробни средства [Singh et al., 2015].

В тази работа сме изследвали антимикробния ефект прахообразни наноматериали, колаген-базирани нанокомпозиции и тънки филми, както и реакцията на бактерии към стреса вследствие на тяхното въздействие.

## **II. Цел и задачи**

**Цел** на настоящата дисертация е:

Да се изследва антимикробния ефект на прахообразни, колагенови и тънкослойни материали и механизмите им на действие върху представители на Грам-положителни, Грам-отрицателни бактерии и дрожди.

За постигане на така поставената цел са определени следните задачи:

1. Изследване на токсичността на различни прахообразни материали върху Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии.
2. Изследване на антимикробен ефект на колаген-базирани нанокomпозити върху Грам-положителни, Грам-отрицателни бактерии и дрожди от род *Candida*.
3. Изследване на антимикробен ефект на тънки поликомпонентни филми върху бактерии от родовете *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas* и *Escherichia*.
4. Проследяване на експресията на гени, включени в медната хомеостаза на *E. coli* ATCC10536 в присъствие на медни и сребърни соли.
5. Проследяване на генната експресия при *E. Coli* ATCC10536 в присъствие на тънки филми, съдържащи мед и сребро.
6. Изследване стабилността на покритията, получени с магнетронно ко-разпрашаване.

### III. Материали и методи

#### 3.1. Наноматериали

Обект на изследване на настоящия дисертационен труд са три групи наноматериали, посочени в таблица 1. Нанопраховете и колаген базираните нанокомпозити са химически синтезирани чрез зол-гел техники и са предоставени от проф. Ктд. Т. Владкова от лаборатория Полимери при ХТМУ, София. Тънките филми са отложени чрез радио-честотно магнетронно разпрашаване. Те са разработени и предоставени за изследване на антимикробните им свойства от доц. д-р Орлин Ангелов, ЦЛ СЕНЕИ, БАН.

**Таблица 1.** Видов и компонентен състав на използвани за изследване за антимикробна активност наноструктурни материали

Нанопраховете	Колаген - базирани нанокомпозити	Еднокомпонентни и многокомпонентни тънки филми
SiO <sub>2</sub>	coll/ZnTiO <sub>3</sub>	Ag
RGO	coll/Ag/ZnO/ZnTiO <sub>3</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ; Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :Ag Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :Sm
Ag/RGO	coll/ZnTiO <sub>3</sub> /SiO <sub>2</sub> /RGO	TiO <sub>2</sub> ; TiO <sub>2</sub> :Nb; TiO <sub>2</sub> :Ag; TiO <sub>2</sub> :W; TiO <sub>2</sub> :(N <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> )
SiO <sub>2</sub> /Ag/RGO	coll/RGO	TiO <sub>2</sub> :Ag:Cu
	coll/Ag/RGO	TiO <sub>2</sub> :SiO <sub>2</sub> :Ag
	coll/Ag/SiO <sub>2</sub> /RGO	

Част от тънките филми, изследвани за антимикробна активност, са с еднакъв компонентен състав, но различни технологични параметри на отлагане. Различията могат да се видят в таблица 2.

**Таблица 2.** Компонентен състав и технологични параметри на синтеза на тънки филми, използвани за изследване на антимикробна активност

Вид тънък филм TiO <sub>2</sub> :Ag:Cu	T <sub>s</sub> , °C	P <sub>s</sub> , W	отгряване	Дебелина, nm
TiO <sub>2</sub> :Ag:Cu S <sub>Ag</sub> =40 mm <sup>2</sup> , S <sub>Cu</sub> =80 mm <sup>2</sup>	Room Temperature(RT)	150	Отгreti и така отложени	52
TiO <sub>2</sub> :Ag:Cu S <sub>Ag</sub> =40 mm <sup>2</sup> , S <sub>Cu</sub> =80 mm <sup>2</sup>	RT	50	Отгreti и така отложени	188
TiO <sub>2</sub> :Ag:Cu S <sub>Ag</sub> =40 mm <sup>2</sup> , S <sub>Cu</sub> =80 mm <sup>2</sup>	RT	50	Отгreti и така отложени	61
TiO <sub>2</sub> :Ag:Cu S <sub>Ag</sub> =60 mm <sup>2</sup> , S <sub>Cu</sub> =100 mm <sup>2</sup>		50	Отгreti и така отложени	86
TiO <sub>2</sub> :Ag:Cu S <sub>Ag</sub> =60 mm <sup>2</sup> , S <sub>Cu</sub> =100 mm <sup>2</sup>	RT	50	Отгreti и така отложени	60
TiO <sub>2</sub> :Ag:Cu S <sub>Ag</sub> =100 mm <sup>2</sup> , S <sub>Cu</sub> =180 mm <sup>2</sup>	RT	50	Отгreti и така отложени	80
TiO <sub>2</sub> :Ag:Cu S <sub>Ag</sub> =190 mm <sup>2</sup> , S <sub>Cu</sub> =180 mm <sup>2</sup>	RT	50	Отгreti и така отложени	80
TiO <sub>2</sub> :SiO <sub>2</sub> :Ag S <sub>SiO<sub>2</sub></sub> =750 mm <sup>2</sup> , S <sub>Ag</sub> = 40 mm <sup>2</sup>	RT	50	Отгreti и така отложени	100
TiO <sub>2</sub> :SiO <sub>2</sub> :Ag S <sub>SiO<sub>2</sub></sub> =750 mm <sup>2</sup> , S <sub>Ag</sub> = 100 mm <sup>2</sup>	RT	50	Отгreti и така отложени	200

### 3. 2. Изготвяне на тънки филми

Тънките слоеве се приготвят чрез радиочестотно магнетронно ко-разпрашаване на TiO<sub>2</sub> мишена и пластини от Cu, Ag и SiO<sub>2</sub>, поставени в ерозионната зона на TiO<sub>2</sub> мишена. Тънките слоеве се отлагат при стайна температура върху стъклени подложки (20x20x1 mm), които предварително се третират с Piranha etch (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) = 1: 1, за да се осигури добра адхезия на тънките слоеве към субстрата. Оборудването за магнетронно разпрашване е Алкател DION 450, 13.56 MHz, снабдено с ротационна и дифузионна вакуумни помпи и цилиндрична камера за отлагане на тънки филми. Пластините SiO<sub>2</sub> са с площ 750 mm<sup>2</sup>, докато площта на Ag-пластини е

40, 60, 100 и 190 nm<sup>2</sup>, за да се променя съдържанието на Ag в тънките филми. Процесът на разпрашаване се провежда в аргонова атмосфера (0,8 Pa) с мощност от 50 W. Дебелината на различните покритията е в диапазон 52 - 188 nm.

**- Сканиращ електронен микроскоп (SEM) и Електронно дисперсионна спектроскопия (EDX)**

SEM наблюдение се провежда, за да се отчете морфологията на изследваните покрития, докато EDX се използва за установяване на процентното съдържание и повърхностното разпределение на елементите в 10 микрометров слой. SEM / EDX анализите са извършени с използване на SEM апарат Lira / TEScan, Bruker, Германия, оборудван с Quantax 200 EDX детектор съгласно метод на *Pachauri et al., 2013*.

**- Рентгенова фотоелектронна спектроскопия (XPS)**

Съдържанието на Ag като атомни % се изчислява от площта на пиковете Ag 3d<sub>3/2</sub> и Ag 3d<sub>5/2</sub> от XPS спектрите по метод, описан от *Franinovic, (2012)*.

**3. Тест- микроорганизми**

В хода на експериментите са използвани микроорганизми, предоставени от Националната Банка за Промислени микроорганизми и Клетъчни Култури (НБПМКК), Националният Център по Заразни и Паразитни Болести (НЦЗПБ), Лабораторните колекции на БФ при СУ и URBM при Университет Намюр, Белгия. Тест-микроорганизмите, използвани за целите на настоящия дисертационен труд са представени в таблица 3.

**Таблица 3.** Тест-микроорганизми

Грам-отрицателни бактерии	<i>Escherichia coli</i> 3548 от НБПМКК (ATCC 10536; NCTC 10418) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 от НЦЗПБ <i>E. coli</i> DH10B (K12)- URBM Cell Culture Collection, Unamur <i>Avian Pathogenic E. coli</i> APEC - URBM Cell Culture Collection, Unamur <i>Salmonella enterica</i> 4333 от НБПМКК <i>Pseudomonas putida</i> 1090 от НБПМКК (ATCC 12633) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 от НЦЗПБ
Грам-положителни бактерии	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 от НЦЗПБ <i>Staphylococcus epidermidis</i> 3486 от НБПМКК (ATCC 12228)
Дрожди	<i>Candida lusitanae</i> 74-4, от Лаборатория Приложна микробиология, БФ, СУ

- **Хранителни среди за култивиране на тест микроорганизмите**

**3.2. Методи за изследване на антимикробната активност на наноматериали**

**3.2.1. Дифузия в агар**

**3.2.2. Криви на бактериалния растеж**

**3.2.3. Оценка на жизнеспособността на третираните бактериални клетки с флуоресцентен микроскоп**

**3.2.4. СЕМ за оценка на морфологични промени на бактериите при контакт с тънки филми**

**3.2.5. Определяне на „стрес-ефект“ върху моделни щамове *E. coli* с различни концентрации от  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{AgNO}_3$  и техни комбинации**

**Таблица 4.** Концентрации на  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{AgNO}_3$  и техни комбинации, за определяне на „стрес-ефект“ върху моделни щамове *E. coli*: *E. coli* ATCC 10536, *Avian Pathogenic E. coli* (APEC) и *E. coli* K12(DH10B)

$\text{CuSO}_4$	$\text{AgNO}_3$	$\text{CuSO}_4 + \text{AgNO}_3$
4 mM	50 $\mu\text{M}$	2 mM $\text{CuSO}_4$ + 10 $\mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3$
3 mM	25 $\mu\text{M}$	2 mM $\text{CuSO}_4$ + 5 $\mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3$
2 mM	15 $\mu\text{M}$	2 mM $\text{CuSO}_4$ + 1 $\mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3$
1,8 mM	10 $\mu\text{M}$	1 mM $\text{CuSO}_4$ + 10 $\mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3$
1,5 mM	5 $\mu\text{M}$	1 mM $\text{CuSO}_4$ + 5 $\mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3$
1,2 mM	1 $\mu\text{M}$	1 mM $\text{CuSO}_4$ + 1 $\mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3$
1 mM	-	1 mM $\text{CuSO}_4$ + 2 $\mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3$
		1 mM $\text{CuSO}_4$ + 5 $\mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3$
		1 mM $\text{CuSO}_4$ + 15 $\mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3$
		1,8 mM $\text{CuSO}_4$ + 1 $\mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3$
		1,8 mM $\text{CuSO}_4$ + 2 $\mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3$

**3.2.6. Пламъчна атомно-абсорбционна спектрометрия (FAAS)**

**3.2.7. RT-qPCR – Обратна транскриптазна Полимеразно Верижна Реакция за изследване на устойчивост на *E. coli* ATCC 10536 към метали**



**Таблица 5.** Праймери за таргетни и референтни гени, изследвани в хода на работа

ген	секвенция	Вид
CueO_C2	F – GCAATCTACCCACAACACGC R - GCTGGCAATCACATACAGCG	Таргетни гени
CueO_C1	F – TCCCTGATTTGCTCACGACC R - ATTGCCGTTATAGCCCCAGG	
CueO_C4	F – ATTGGCGCAGGTCAGTCTAC R - AACGTCGTCTCTTCCGTCAG	
CueO_C10	F – TCCATATTCACGGCACCCAG R - TGTTCCTTTCGGTGCGTTGTG	
CueO_C15	F – ATCTACCCACAACACGCTGC R - CGTCGCTGGCAATCACATAC	
CusA_C3	F – CGGTTTCTCACAGTTTGCGG R - GGCAGCTTACCCTGTACCTG	
CusA_C1	F – CGCTCAATAAAAGTTGGCGGG R - TTTTTCGAGCATACTCGCCG	
CusA_C9	F – GGATCCGTGGCAAAATTCCG R - TATTGAGCGGCCAGAGAACC	
CusA_C7	F – CTGGCTTTATTGCCCTTGCC R - GCGGATTATTCAACGACGGC	
CusA_C6	F – TACGCTCATTGCAGGACTGG R - TACTTCGGCGAGACTGATGC	
CusF_C2	F – CATGAGCGAAGTACAACCGC R - GCAGCAATCGGATCGTGATG	
CusF_C9	F – CCATGAGCGAAGTACAACCG R - ATCGGATCGTGATGGATGGTG	
16s_C10	F – ACGTTACCCGCAGAAGAAGC R - TGACTTAACAACCGCCTGC	Референтни гени
16s_C8	F – AAGTACTTTCAGCGGGGAGG R - TTCCGATTAACGCTTGCACC	
16s_C12	F – GTCGCAAGACCAAAGAGGGG R - CAGACCAGCTAGGGATCGTC	
16s_C6	F – TGGCTCAGATTGAACGCTGG R - CCTCCATCAGGCAGTTTCCC	
mreB_C14	F – GCGTTCTGGTTTGTGTACCG R - AACCACCATAGAACCGGTCG	
mreB_C13	F – AACTGGCTTCCGACATCTCC R - ATCATTTCCAGCGCTTTGCC	
cysG_C4	F – TGGTTGCTCTGCCTATTCGG R - GCTCGCCACCGGTTTTTAAG	
cysG_C13	F – TGACGGTACGCTCACACAAC R - GTTCAGTTTATCGCGCAGGC	
cysG_C10	F – AGGTTGCTGTTAGACGCAGG R - CATCATCCGTCGCTGCAATC	
hcaT_C6	F – ACCATCGGCCTGTTATTGGG R - AAATCAGGCGGGAAGGATCG	
hcaT_C12	F – AGTCATCCGTTTACAGGCGG R – TGAGGGAACAACTTTCGGGC	

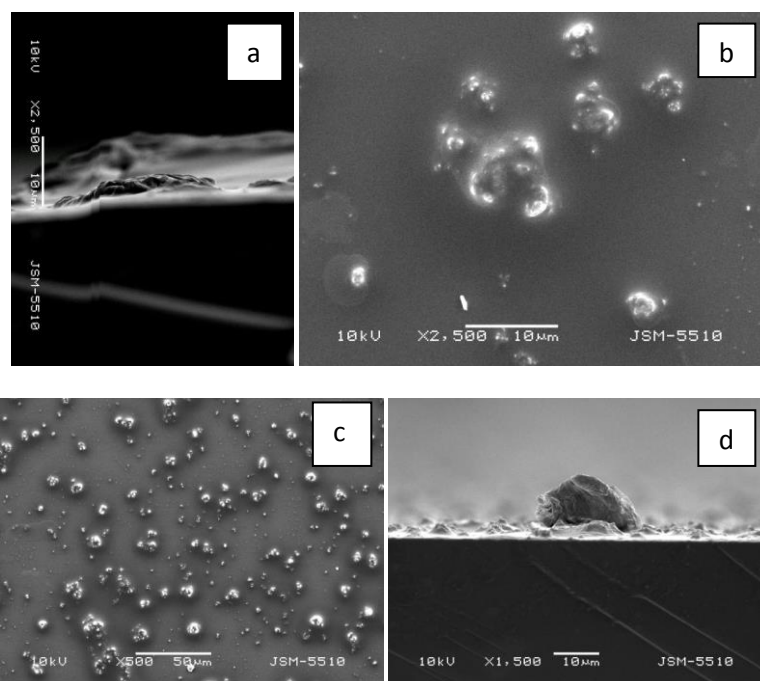
#### IV. Резултати и дискусия

##### 4.1. Физико-химични характеристики на тънките слоеве, синтезирани чрез магнетронно разпръскване

Известно е, че микробната адхезия зависи от повърхностни характеристики на покритието като химичен състав, хидрофилен/хидрофобен баланс, повърхностна енергия, топография и грапавост [Speranza et al., 2004; Ploux et al., 2010; Song et al., 2015].

##### 4.2. Топография на тънките слоеве, наблюдавана със сканиращ електронен микроскоп (SEM)

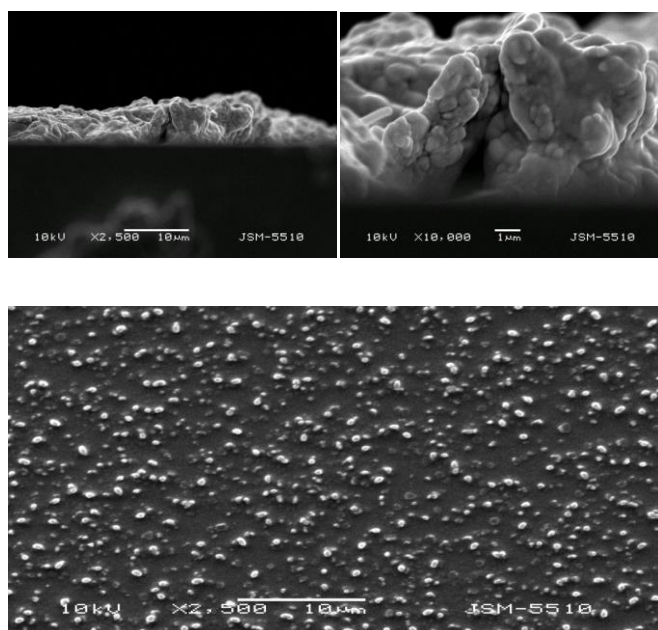
Топографията на синтезираните покрития, получени чрез магнетронно ко-разпръскване са изследвани със сканиращ електронен микроскоп (SEM). Този метод се използва за изучаване процесите на кристализация и влиянието на повърхностната структура.



Фиг. 1. SEM изображение на тънък филм  $\text{TiO}_2:\text{Cu}:\text{Ag}$  ( $S_{\text{Cu}}=180 \text{ nm}^2$ ;  $S_{\text{Ag}}=190 \text{ nm}^2$ ; дебелина на покритието 80 nm): а) профил на тънък филм при 2500X увеличение; б) анфас на същите структури при 2500X увеличение; в) анфас на тънък филм при 500X увеличение; г) профил на същите структури при 1500X увеличение.

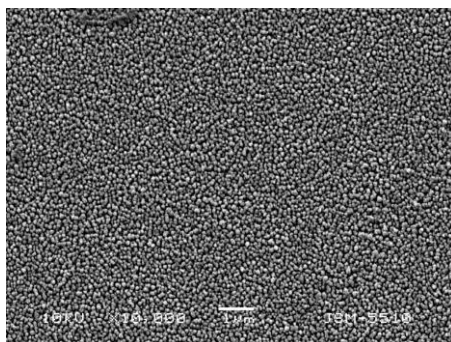
Снимки на изследваните тънки филми  $\text{TiO}_2:\text{Cu}:\text{Ag}$  и  $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2:\text{Ag}$  с антибактериален ефект са представени на фиг.1-3, от които се откриват различия в структурата на покритията. От изображенията, показващи топографията на тънкослойните покрития, се вижда формиране на неравности (грапавини), съставени от  $\text{TiO}_2$  и легиращите елементи Cu и Ag, без да е възможно само чрез това изследване да се конкретизира пространственото разпределение на Cu и Ag по

отделно. От напречното сечение на изследваните тънки филми се откриват ясно множеството релефни участъци, различни по големина. Те способстват прикрепването на бактериите към слоя (фиг1-2).



Фиг. 2. SEM изображение на тънък филм  $\text{TiO}_2$ : Cu: Ag ( $S_{\text{Cu}}=80 \text{ mm}^2$ ;  $S_{\text{Ag}}=40 \text{ mm}^2$ ; дебелина на покритието 188 nm).

Снимките от сканиращия електронен микроскоп показват сравнително нехомогенно разпределение на наночастиците от легиращите елементи Cu и Ag по повърхността на подложката  $\text{TiO}_2$  при различни площи на пластините мед и сребро по време на отлагането на слоевете и различна дебелина на получения слой. При слоеве с по-големи площи на разпръскване на легиращите елементи се наблюдават по-големи по размери частици - над 10 микрометра, докато при покритията, получени при по-малка площ на разпръскване на легиращите елементи повърхностните неравности са с по-малки размери, близки до размерите на бактериалните клетки. Възможно е именно така наблюдаваната топография да е причина за различния по сила антимикуробен ефект на изследваните филми. Добавянето на  $\text{SiO}_2$ , обикновено използван във фармацевтичната практика като помощно вещество при приготвянето на лекарства, променя напълно топографията на изследваните филми, което се демонстрира от следващите снимки, показващи хомогенна зърнеста структура на покритието. Площите на пластините за разпръскване на легиращите елементи определят концентрацията им в тънкия филм, което също е от значение за антимикуробния ефект.

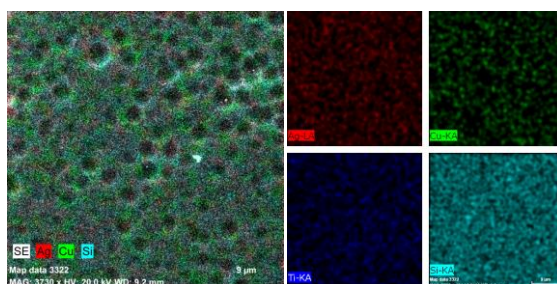


Фиг. 3. SEM изображение на тънък филм  $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2:\text{Ag}$  ( $S_{\text{SiO}_2}=750\text{ mm}^2$ ;  $S_{\text{Ag}}=40\text{ mm}^2$ ; дебелина на покритието 100 nm).

#### 4.1.2. Рентгенова фотоелектронна спектроскопия (XPS) и Енергийно-дисперсионна рентгенова спектроскопия (EDX)

Електронно дисперсионните спектроскопски (EDX) анализи потвърждават получаването на очакваните Ag-легирани  $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2$  композитни покрития ( $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2:\text{Ag}$ ) с разнообразно Ag съдържание. Определено е съдържанието на среброто и тенденцията е към увеличение на количеството Ag при увеличаване на площите на разпрашаване. Оценка на съдържанието на компонентите в изследваните покрития в повърхностния 10 nm слой е извършена чрез XPS анализи. В тънките филми  $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2:\text{Ag}$  съдържанието на Ag в at.% се увеличава (9.66, 14.36 и 19.75) с увеличаване на площта на разпрашаване от 40, 60 до 100  $\text{mm}^2$  на Ag пластини.

SEM/EDX анализ е проведен за покрития  $\text{TiO}_2:\text{Cu}:\text{Ag}$  ( $S_{\text{Cu}}=80\text{ mm}^2$ ;  $S_{\text{Ag}}=40\text{ mm}^2$ ) след еднократно и двукратно престояване в среда Лурия-Бертани с експоненциална култура *E.coli* ATCC 10536 в рамките на 4 часа. От снимките се вижда разпределението на отделните елементи в състава на покритието.



Фиг. 4. SEM/EDX изображения на разпределението на елементите на повърхността на тънък филм  $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2:\text{Ag}$  ( $S_{\text{SiO}_2}=750\text{ mm}^2$ ;  $S_{\text{Ag}}=40\text{ mm}^2$ ; дебелина на покритието 100 nm) – малките снимки; формиран биофилм- голямата снимка в ляво.

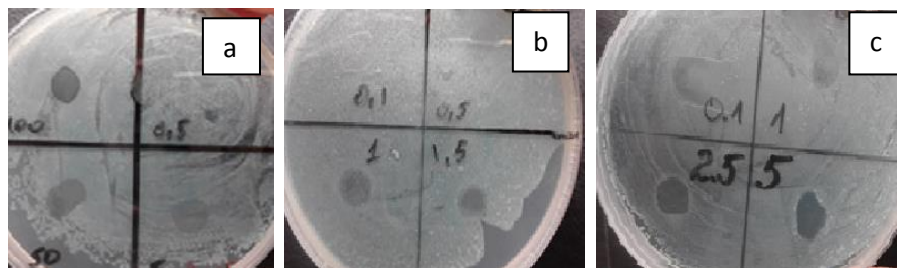
Представените карти на разпределението на химичните елементи от SEM/EDX анализа (фиг. 4) в състава на слоя  $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2:\text{Ag}$  ( $S_{\text{SiO}_2}=750\text{ mm}^2$ ;  $S_{\text{Ag}}=40\text{ mm}^2$ ) показват тяхното

сравнително равномерно присъствие по цялата повърхност на слоя, но с различна плътност (яркостта на оцветяването в различните точки). Вижда се и формиране на неравности по повърхността с различно съдържание на отделните химични елементи, което определя възможност за закрепване на бактериите върху слоя и излагането им на действието на различните химични елементи в състава на слоя. Тъй като съдържанието на мед и сребро е сравнително ниско и намалява след двукратен и трикратен престой в бактериалната суспензия, върху покритието се формира биофилм от *E.coli* ATCC 10536.

## 4.2. Антимикробно действие

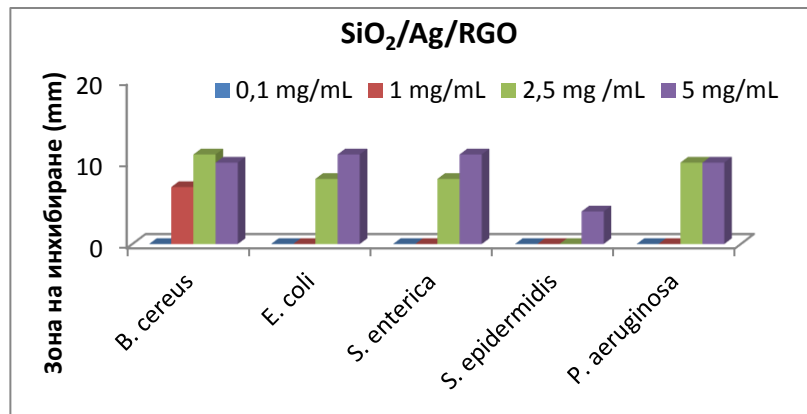
### 4.2.1. Качествено определяне на антимикробно действие на дисперсии от наночастици и колаген базирани нанокомпозити

Антимикробното действие се определя качествено чрез метода на дифузия в агар. Следващите изображения са примери, отчитащи ефекта или липсата на такъв за един моделен тест микроорганизъм, подложен на третиране с различни по компонентен състав дисперсии от наночастици. Скрининговият метод е приложен за всички изследвани наноматериали като показател за потенциала на тестваните наночастици срещу 5 вида Грам (+), Грам (-) бактерии и дрожди. Избраните снимки демонстрират наличието на контактно инактивиране на бактериалните клетки само при високите тестови концентрации, проявено чрез просветляване на плътния бактериален растеж единствено в зоната на накапване.



Фиг. 5. Въздействие на дисперсии от наночастици: (a) RGO; (b) Ag/RGO и (c) Ag/ SiO<sub>2</sub>/RGO върху *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Установена е концентрационна зависимост при повечето от третираните бактерии и синергичен ефект като резултат от поликомпонентния състав на дисперсиите от наночастици.



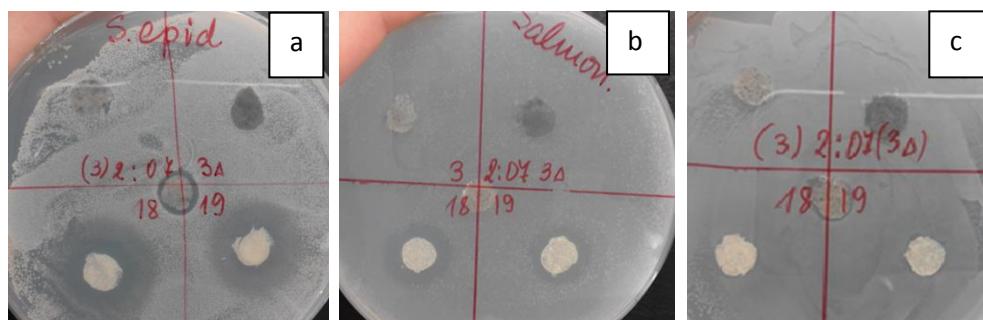
**Фиг. 6.** Антимикробен ефект на дисперсии от наночастици  $\text{SiO}_2/\text{Ag}/\text{RGO}$ . Стойностите са усреднени от три повторения с отклонение  $\pm 0,5$  mm.

Високите концентрации, съответно 5mg/mL за  $\text{SiO}_2/\text{Ag}/\text{RGO}$ ; 1,5 mg/mL за Ag/RGO и 100 mg/mL за RGO, имат антибактериален ефект, който се изразява в контактното убиване на тест микроорганизмите, показател за което е зоната на инхибиране в областта на капката с размери 8-10 mm. В присъствието на Ag/RGO и  $\text{SiO}_2/\text{Ag}/\text{RGO}$  най-чувствителен е *B.cereus* ATCC 11778. Фактът, че RGO няма потискащ или биоциден ефект при самостоятелно приложение доказва ефективността на сребърните наночастици и дава основание да се разграничат повече механизми на действие. В случаите на антимикробен ефект на RGO се касае за контактното инактивиране на Грам-отрицателни бактериални видове, характеризиращи се с по-тънка клетъчна стена. Дебелият пептидогликанов слой при Грам-положителните бактерии вероятно осигурява по-голяма устойчивост на механични увреждания от острите ръбове, характерни за представителите на графеновото семейство. Изключение е *E. coli* ATCC 10536 с известната ѝ висока устойчивост към метали, потвърдена и в изследванията със Ag/RGO. От друга страна именно резултатите с *E. coli* ATCC 10536 дават основание да се твърди, че включването на  $\text{SiO}_2$  в композитния състав на изследваните дисперсии от наночастици води до повишен антибактериален ефект в зоната на контакт, чрез подобряване разпределението на сребърните наночастици и засилване на тяхното действие. Заслужава внимание фактът, че единствено *B.cereus* ATCC 11778 демонстрира чувствителност при по-ниската концентрация на нанодисперсиите от Ag/RGO и  $\text{SiO}_2/\text{Ag}/\text{RGO}$ . Както е известно, металните наночастици, особено среброто, имат афинитет към протеини, липиди, въглехидрати и др. биомолекули. Взаимодействието се осъществява главно при а) азотния и/или въглеродния край в аминокиселини и протеини, б) и/или тиолови групи (-SH) и дисулфидни връзки (R-S-S-R) в ензими и/или в) слабата киселинно-основна реакция от биомолекулите със S и P [Prabhu et al., 2012, Eckhart et al., 2013, Gopinath et al., 2015]. Най-външният слой на спорите – екзоспориумът е съставен главно от протеини, които съставляват около 50 % от сухото тегло, последвани от липиди, въглехидрати и фосфор. Тези протеини са особено богати на съдържащите сяра аминокиселини цистеин и метионин. Следователно се очаква свързване на наночастиците от сребро със сяра-съдържащите протеини в споровата



обвивка и последващо нарушаване на целостта и образуване на ямки, каквито са докладвани от *Gopinath et al.*, [2016]. Същите автори сравняват ефективността на сребърни наночастици и потенциала им като алтернатива на познатите спороцидни агенти. Тяхното изследване нарежда сребърните наночастици на трето място по ефективност след микровълновите лъчи и формалдехида. Като се вземе предвид неприменимостта на последните в много случаи от медицинската практика, сребърните наночастици са обещаващ антимикробен и спороциден агент. Трябва да се отбележат и многократно по-ниските концентрации на сребро, които са по-ефективни в сравнение с конвенционалните химични реагенти и  $\text{AgNO}_3$  [*Gopinath et al.*, 2016].

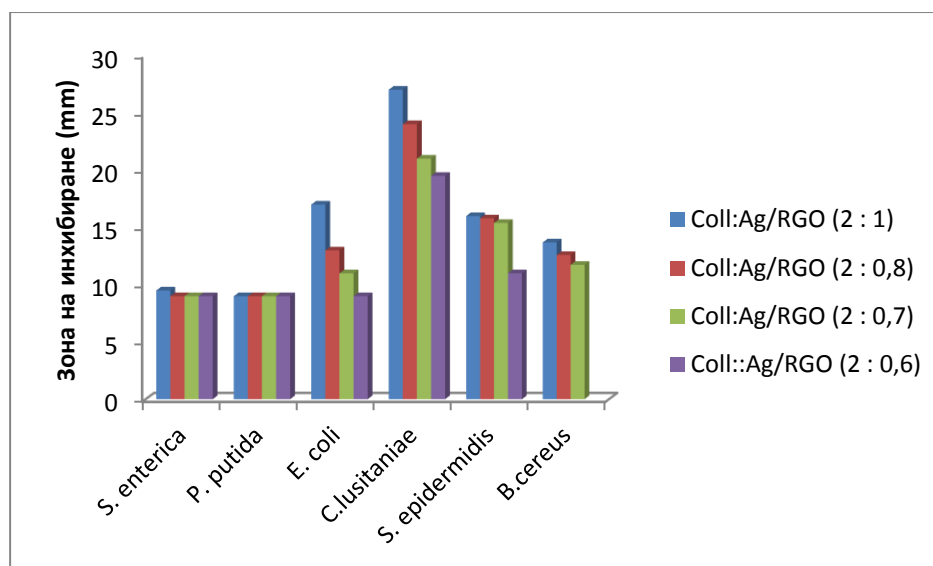
Доказалите антимикробно действие наноматериали в много случаи са алтернатива за третиране на различни локални инфекции, дължащи се на ендопротезиране. Ето защо е разбираемо усилието да се включат подобни материали в медицинската практика. За целта са изследвани различни колаген базирани нанокомпозити, съчетаващи биосъвместимостта на биологичен материал като колагена, модифициран с импрегниране на метални наночастици, метални/неметални оксиди и представители на графеновото семейство. Проследени са ефектите на различни по състав и съотношение с колагена нанокомпозити, като е използван диск-дифузионния вариант на метода. Обобщени резултати са представени на фигури от 7 до 10. Избран е снимков материал, показващ както контактно инактивиране на мястото на тестовия диск, така и по-големи стерилни зони, доказващи ефект въз основа на разтваряне на част от наноматериалите и дифундиране в хранителната среда.



**Фиг. 7.** Въздействие на колаген-базирани нанокомпозити с различен състав: (3) – GO; (3Δ) – RGO; (18) –  $\text{ZnTiO}_3/\text{RGO}/\text{SiO}_2$  в съотношение 2:0,8 и (19) –  $\text{ZnTiO}_3/\text{RGO}/\text{SiO}_2$  в съотношение 2:0,6 срещу (a) *S. epidermidis* ATCC 12228; (b) *S. enterica* 4333 и (c) *E. coli* ATCC 10536, в средата – контрола от колагенова матрица.

Колагенът е предпочитан материал при съчетаване с антимикробни агенти за постигане на добра биосъвместимост [*Kanayama et al.*, 2014] и има изразен антимикробен потенциал, което се потвърждава и от *Abdillahi et al.*, (2012) и *Lima et al.*, (2014).

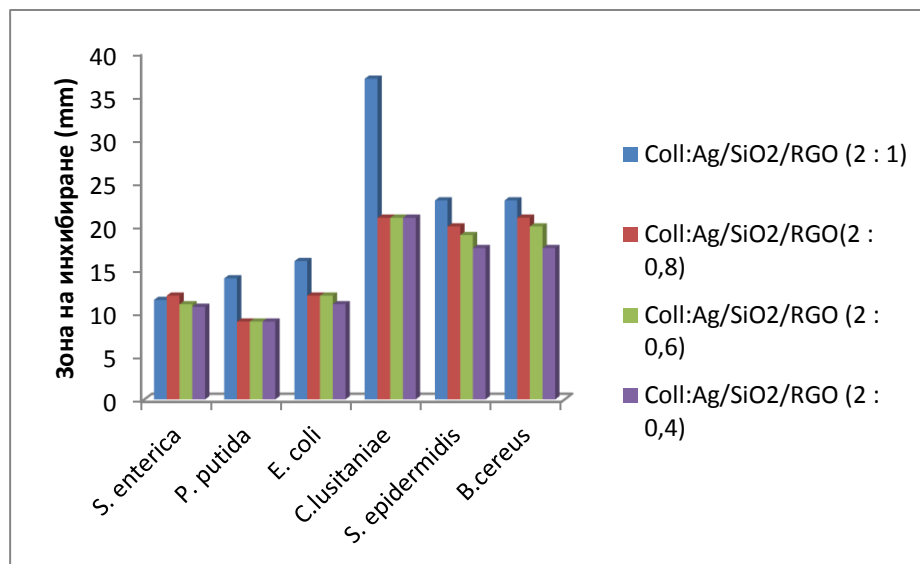
Стерилните зони от 10 mm при третиране с Coll:RGO са само в зоната на контакт. От бактериите единствено *B. cereus* ATCC 11778 демонстрира по-висока чувствителност. Силно изразен потискащ ефект обаче е отчетен за представителя на дрождите – *C. lusitaniae* 74-4. Тази тенденция е наблюдавана и за останалата част от изследваните материали с изключение на Coll:ZnTiO<sub>3</sub>:SiO<sub>2</sub>:RGO.



Фиг. 8. Антимикробен ефект на Coll: Ag/RG. Стойностите са усреднени от три повторения с отклонение  $\pm 0,5$  mm.

От фиг. 8 се вижда, че при включването на Ag в компонентния състав на колагеновите матрици стерилните зони на тест бактерии *E. coli* ATCC 10536 и *S. epidermidis* ATCC 12228 са по-големи. Запазва се тенденцията за концентрационна зависимост, като при по-високите концентрации на антимикробните агенти са регистрирани и по-големи стерилни зони. Подобни резултати при използване на наночастици в колаген са докладвани от други автори [Gaidau et al., 2009; Cardoso et al., 2014]. Предполага се, че това се дължи на електростатичните взаимодействия между положително заредените колаген-базирани сребърни нанокomпозити (AgNP/ Coll) и отрицателно заредените бактериални мембрани. Може да се каже, че формата, размерът и положителният зета потенциал на AgNP/ Coll повишават активността срещу Грам-отрицателни (*Escherichia coli*) и Грам-положителни (*Staphylococcus aureus*) бактерии.



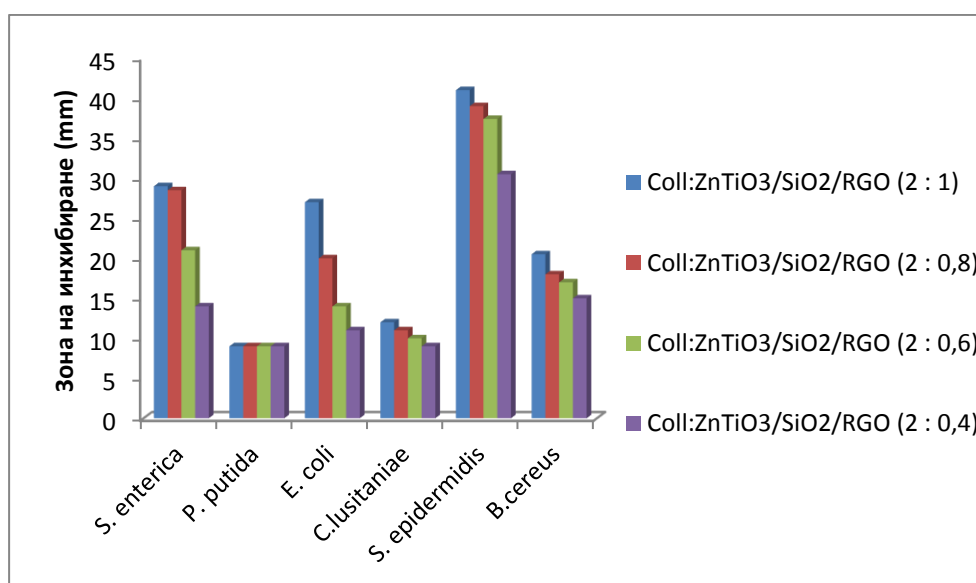


Фиг. 9. Антимикробен ефект на Coll:Ag/SiO<sub>2</sub>/RGO. Стойностите са усреднени от три повторения с отклонение  $\pm 0,5$  mm.

Ефектът на синергизъм при поликомпонентния състав се вижда от фиг. 9, в корелация с предишните изследвания с дисперсии от наночастици от Ag/SiO<sub>2</sub>/RGO (фиг.6). Оказва се, че Грам-положителните бактерии са по-чувствителни към този вид наноматериали в сравнение с Грам-отрицателните, съдейки по големината на стерилните зони. Една от вероятните причини може да е включването на RGO в компонентния състав, за който е потвърден по-изразен ефект срещу Грам-положителните бактерии и от други автори [Akhavan & Chaderi, 2010; Krishnamoorthy et al., 2012]. Наблюдаваната диференциална токсичност се дължи на много фактори, като основната разлика между Грам-отрицателните и Грам-положителните бактерии е тяхната клетъчна стена. Външната мембрана защитава пептидоглюкановия слой от химическо въздействие. Трябва да се спомене, че токсичността, причинена от наночастици върху бактериите зависи не само от повърхностните структури, но и от други фактори, включително ензимната активност на клетките [Premanathan et al., 2011]. Антимикробната активност на нанолитовете GO се дължи на генерирането на хидроксилни радикали вследствие на свободните електронни двойки на O<sub>2</sub>, които присъстват на повърхността на GO и могат да действат като сорбционен център за водните молекули от бактериалните обвивки [Krishnamoorthy et al., 2012].

Резултатите показват като най-чувствителен микроорганизъм – еукариотната *C. lusitaniae* 74-4, филогенетично близка до *C. albicans* (фиг. 21- фиг. 23). Може да се предполага, че повишаването на чувствителността е резултат от синергичното действие на наночастиците с антибиотика, влизащ в състава на хранителната среда YGC (0,1mg/mL). Основание за това дават редица изследвания върху бактерии, доказващи синергизъм при комбинирането на антибиотик с наночастици [Hwang et al., 2012; Kumar et al., 2016; Mosselhy et al., 2016] от една страна, както и

скорошно проучване на *Blanco et al., (2017)*, за заместващо антигъбично лечение с комбинирано приложение на някои от конвенционалните антибиотици с хлорамфеникол. Други автори също потвърждават антигъбичен ефект на хлорамфеникол [*Day et l., 2009; Joseph et al., 2015*]. В посочените статии прави впечатление високата концентрация на антибиотика (10-200 mg/mL), използвана в техните експерименти. В настоящото изследване може да се предполага, че наночастиците способстват за механичното увреждане на клетъчната стена при взаимодействие на дрождевите клетки с острите ръбове на графена, където са отчетени най-големи стерилни зони. По този начин се облекчава достъпа на антибиотика до вътреклетъчните компоненти като рибозомите и митохондриите. Известно е действието на антибиотика като компрометиращ белтъчната биосинтеза [*Mondal, 2017*]. Това е допълнително потвърждение за повече от един механизми на микробна инактивация при използване на наноматериали. При сравнение на стерилните зони, докладвани в литературата при третиране на бактерии с хлорамфеникол и наблюдаваните в настоящото изследване, е очевидно синергичното действие от комбинацията на антибиотик с наночастици [*Shul'govskaia et al.,1980*]. Това изследване е първо за комбинирано действие на наночастици с хлорамфеникол върху дрожди.

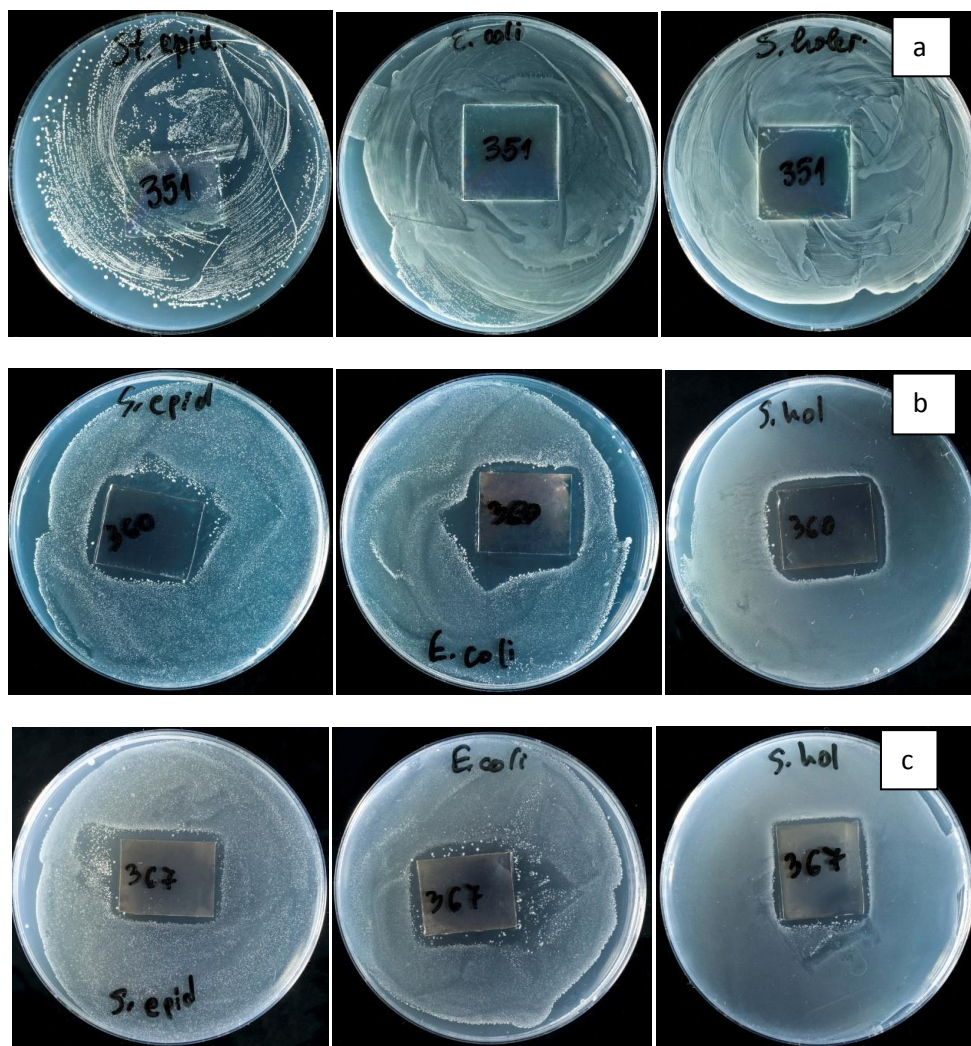


Фиг. 10. Антимикробен ефект на Coll: ZnTiO<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub>/RGO. Стойностите са усреднени от три повторения с отклонение  $\pm 0,5$  mm.

При включването на ZnTiO<sub>3</sub> в състава на композита Coll: ZnTiO<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub>/RGO прави впечатление ефектът, който има този материал срещу *S. epidermidis* ATCC 12228 (фиг.10). За силно изразена чувствителност на *S. epidermidis* към Zn-базирани наночастици, сравнени с Cu и Ag NPs докладват и *Abinaya et al., (2017)*. Този резултат е обнадеждаващ, като се вземе предвид участието на този условен патоген във вторични инфекции, дължащи се на ендопротезиране или други кожни наранявания и изгаряния. В много случаи стафилококите се третират трудно в резултат на устойчивостта си към редица антибиотици последна поколение.

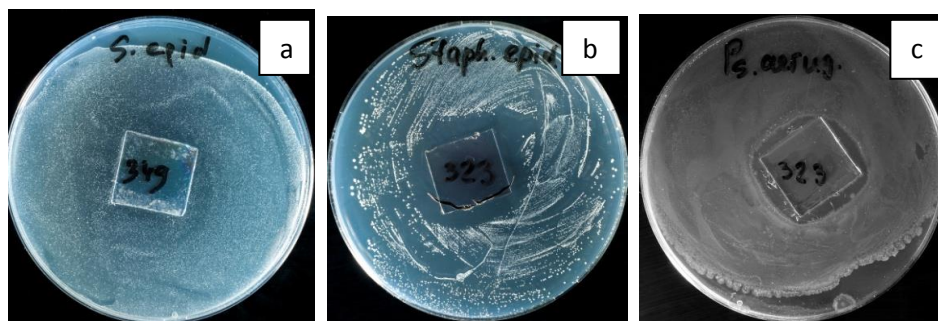
#### 4.2.2. Качествено определяне на антимикробно действие на тънки филми

На следващите фигури (фиг.11 и фиг.12) са показани част от резултатите за влиянието на тънки филми, синтезирани чрез радиочестотно магнетронно ко-разпрашаване върху изпитваните тест микроорганизми. Този подход е приложен като скринингов за всички тестови проби, но на показаните снимки избирателно са посочени покрития, които нямат ефект към някои от третираните бактерии; може да се види контактно инактивиране, както и стерилна зона около стъклената матрица с тънкослойно покритие. Избраните снимки показват още ефекта от покрития с еднакъв компонентен състав при различни технологични условия на синтез (фиг. 11 б и с). Този компонентен състав с широкоспектърния си ефект би имал шанс за различни медицински приложения.



Фиг. 11. Ефект на тънки филми върху различни микроорганизми – (a) -  $\text{TiO}_2:\text{N}$  (неотгрити,  $h$  60 nm); (b)  $\text{TiO}_2:\text{Cu}_{(100\text{ nm}^2)}:\text{Ag}_{(60\text{ nm}^2)}$  и дебелина на покритието 60 nm, но без отгряване (360) на втори ред и с отгряване (367)- трети ред (с).

На фиг. 11 (а) се вижда, че тънък филм 351 с компонентен състав  $\text{TiO}_2\text{:N}$  (неотгreti, дебелина на покритието – 60 nm) няма потискащ ефект върху *S. epidermidis* ATCC 12228. В присъствие на същия тънък филм *E. coli* ATCC 10536 и *S. enterica* 4333 демонстрират чувствителност единствено в зоната на контакт, както се вижда от стерилната зона под стъклената пластинка. Следващите изображения показват ефекта върху горепосочените бактерии в присъствие на тънък филм с идентичен компонентен състав  $\text{TiO}_2\text{:Cu}_{(100\text{ nm}^2)}\text{:Ag}_{(60\text{ nm}^2)}$  и дебелина на покритието 60 nm, но съответно без (360) и с отгряване/термична обработка (367). От снимките е видно, че и в двата случая се наблюдава антибактериален ефект, като при покритията без отгряване той е по-ясен, което дава основание проучванията с този компонентен състав да бъдат продължени и задълбочени. От изследваните чрез дифузия в агар тънкослойни покрития двукомпонентния тънък филм  $\text{TiO}_2\text{:Ag}$  също демонстрира антибактериален ефект при две от тестваните бактерии, а именно *S. epidermidis* ATCC 12228 и *P. aeruginosa* ATCC 27853. На фиг. 12 е демонстриран ефектът от добавянето на сребро, в сравнение със самостоятелното приложение на  $\text{TiO}_2$ , при който бактериалния растеж не се повлиява.



Фиг. 12. *S. epidermidis* ATCC 12228 (а, b) в присъствие на тънки филми  $\text{TiO}_2$  (а) и  $\text{TiO}_2\text{:Ag}$  (b) и *P. aeruginosa* ATCC 27853 (c) в присъствие на  $\text{TiO}_2\text{:Ag}$  (323).

Останалите изследвани за антимикробен ефект покрития, описани в материали и методи, не показаха антимикробен потенциал в хода на скрининговите тестове чрез дифузия в агар.

#### 4.2.3. Криви на бактериалния растеж в присъствие на тънки филми

Резултатите от метода дифузия в агар за част от покритията с обещаващ антимикробен ефект дават основание да се задълбочат изследванията в динамика. Кривите на растежа на бактериите в присъствие на тънки филми са проследени чрез моделиране на процеса на десорбция на йони от наноматериали, което позволява модифициране на стандарта за оценка антимикробния потенциал на пластмасови и други непорьозни покрития (ISO 22196:2007), и се прилага при оценка на наноматериали [Verghese et al., 2013]. Литературни данни сочат, че този стандарт търпи множество модификации от различни изследователски групи [Wiegand et al.,

2018], от което може да се заключи, че все още няма утвърден работещ стандарт за изследване на антимикробна активност на наноматериали. Съпоставим иновативен подход в оценяването на тънки филми е приложен и от *Norambuena et al.*, (2017).

Проследен е ефектът от третирането на бактериите с тънки филми в различни времеви точки, с което се определя ефективното време на дезинфекция. Този показател е от особена важност за самопочистващи се повърхности за помещения и изделия с повишен риск от микробно натоваарване. Дизайнът на експериментите се основава на един от известните с ефективността си подходи за оценка, какъвто е нефелометричният метод, стоящ в основата на автоматизираните системи за изследване динамиката на микробното инхибиране [*Jorgensen et al.*, 2009; *Wiegand et al.*, 2012, 2015]. Тези експерименти позволяват също да се оцени и сравни ефектът от самостоятелно приложение на метални частици или комбинация от тях, с което се доказва синергично действие в някои случаи. Така инхибирането на бактериалния растеж в динамика позволява да се отчете ефекта от освобождаването на йони от наночастиците в културалната среда, представляващ ключов механизъм на действие срещу бактериите. Получените резултати показват времето на задържане на бактериалната популация в присъствието на тънки филми с конкретни технологични показатели. Така става възможно да се правят изводи за влиянието на технологичните параметри върху антибактериалния ефект.

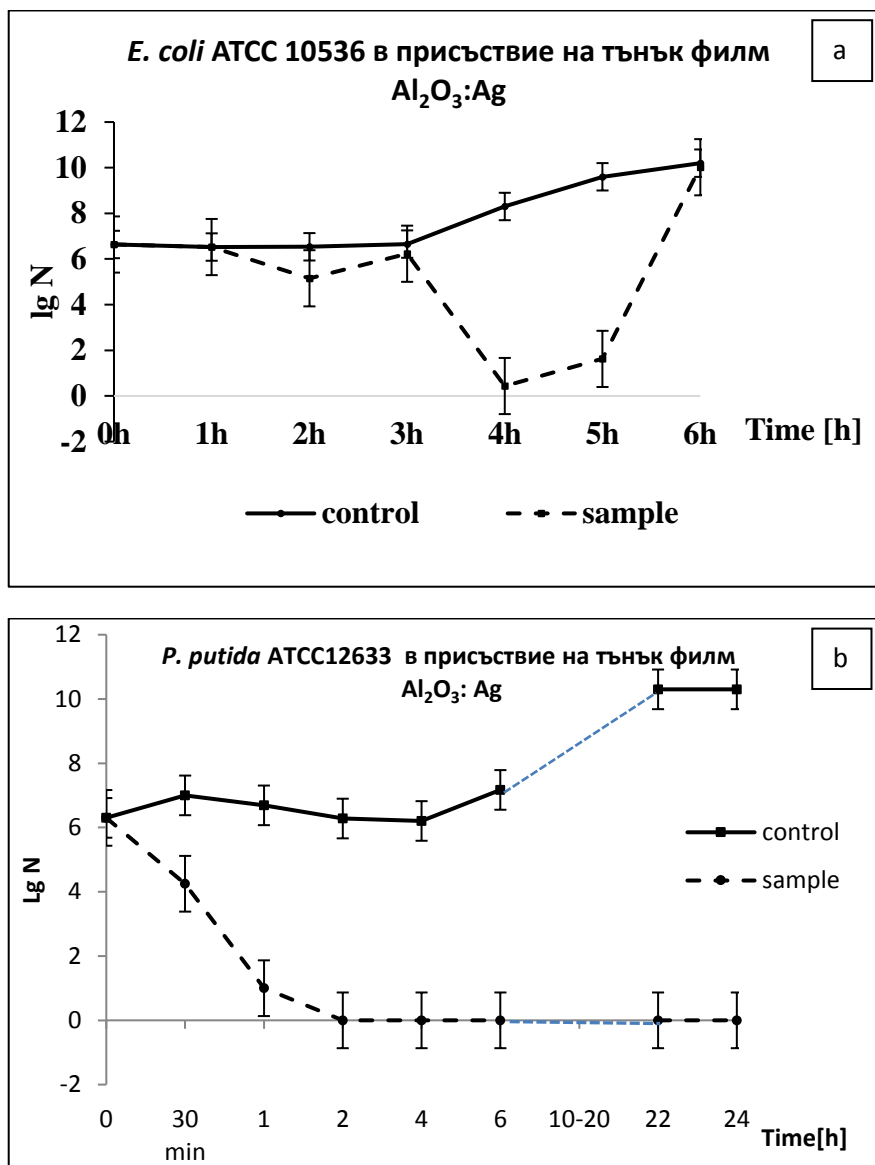
Проследено действието на тънък филм  $\text{Al}_2\text{O}_3$  върху *E. coli* ATCC 10536 и природния изолат *P. putida* ATCC 12633, за който в последните години има данни, че все по-често предизвиква инфекции [*Lombardi et al.*, 2002; *Carpenter et al.*, 2008; *Bennet et al.*, 2009]. Установено е незначително потискане на размножаването на *P. putida* ATCC 12633 в рамките на 2 – 4 час от началото на експеримента и на *E. coli* ATCC 10536 между 4 и 6 час. На 24-ия час проби и контроли са с близки стойности и висока бактериална плътност, което характеризира този тънък филм като напълно неефективен спрямо двете тествани бактерии. Други автори [*Sikora et al.*, 2018] също докладват за временно потискане на бактериалния растеж от различни по състав наноразмерни метални оксиди и последващо адаптиране на микроорганизмите и интензивно размножаване към 24 час.

Тънки филми Ag с дебелина на слоя от 8 nm потискат растежа на *E. coli* ATCC 10536 в рамките на 4 часа, последвани от експоненциален растеж. При *P. putida* ATCC 12633 се наблюдава значително по-силно потискане и по-ниска бактериална плътност, като тенденцията се запазва до 6-ия час от експеримента, което определя бактерията като по-чувствителна към този тънък филм и доказва видово-специфична реакция.

Проведен е експеримент с двукомпонентен тънък филм със състав  $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Ag}$  с *E. coli* ATCC10536 (фиг. 13 a) и *P. putida* ATCC 12633 (фиг. 13 b). Потвърдено е синергичното действие на този компонентен състав, установено и от други автори [*Chen M. et al.*, 2007]. Резултатите



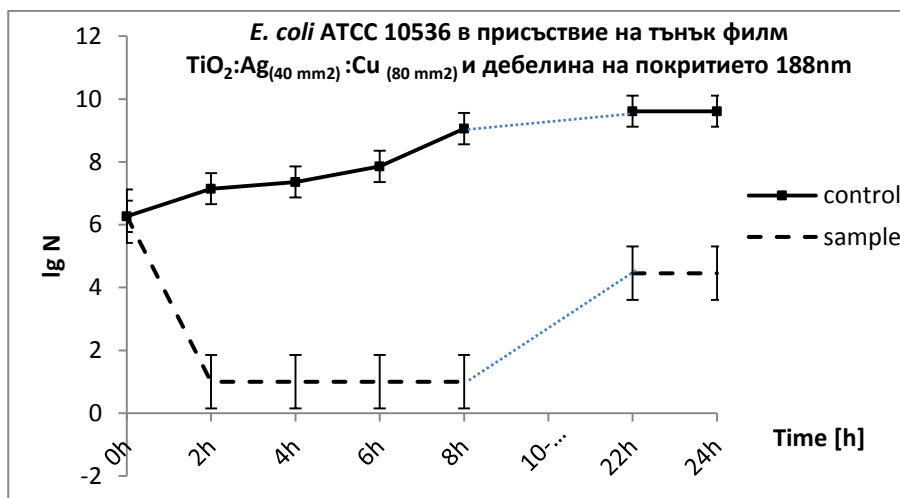
доказват чувствителността на *P.putida* ATCC 12633, която загива на 2-ия час от началото на експеримента. Интензивно намаляване на бактериалната популация от *E. coli* ATCC 10536 се наблюдава само до 4-ия час от началото на третирането, като след това от единични жизнеспособни клетки бактериалната популация се възстановява напълно до 24-ия час с експоненциален растеж. Наблюдаваните резултати биха могли да се обяснят със специфичните стрес отговори на *E. coli* към среброто и ефлуксните помпи, регулиращи нивото на метално съдържание в клетките [Stoyanov & Brown, 2003].



Фиг. 13. Развитие на *E. coli* ATCC 10536 (a) и за *P.putida* ATCC 12633 (b) в присъствие на тънък филм  $Al_2O_3:Ag$  с  $h=8nm$ .

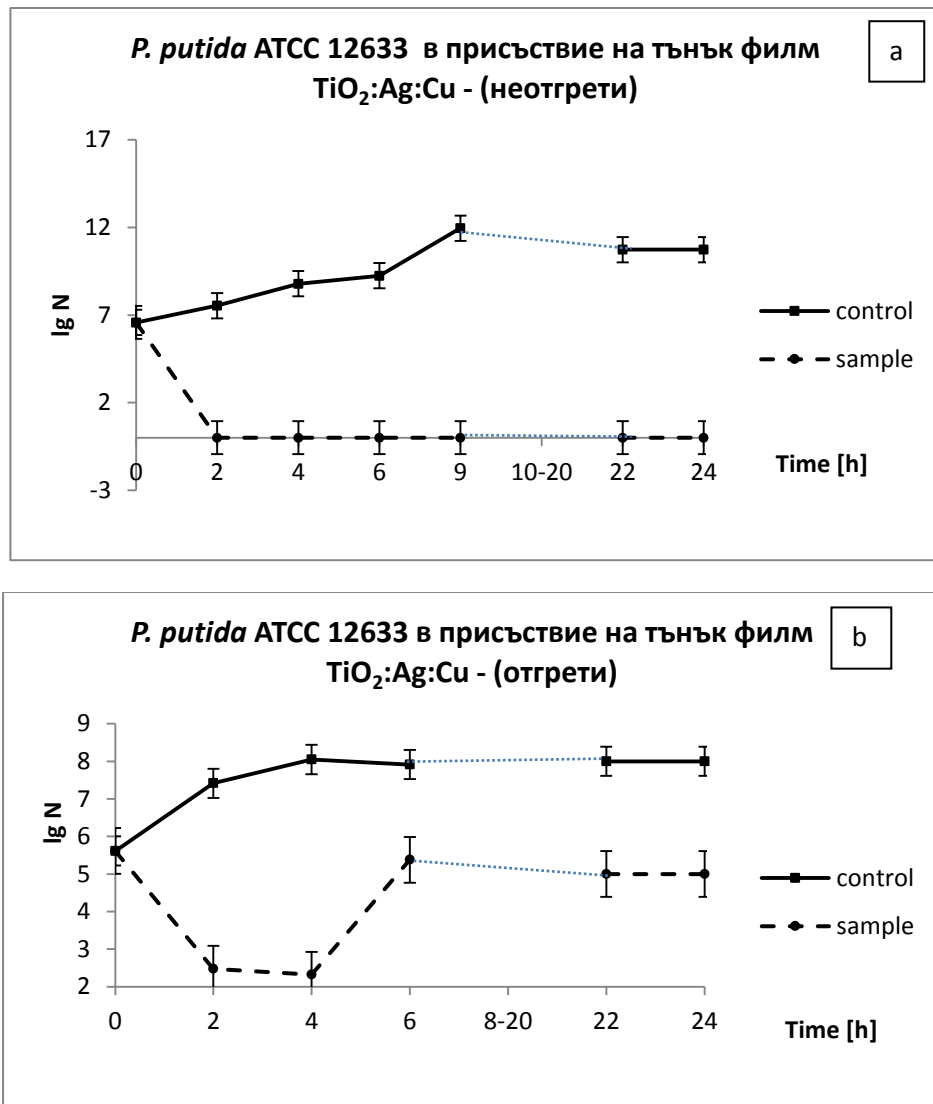
Компонентният състав  $\text{TiO}_2\text{:Ag:Cu}$  на тънкослойните покрития демонстрира широкоспектърно антимикробно действие при проведените скринингови изследвания. Всички технологични параметри на тънките филми с този компонентен състав са представени в раздел „Материали и методи”, като те включват различни площи на разпрашаване на допантите, условия на отгряване и дебелина на покритието. Разликите в технологичните параметри повлияват антимикробния ефект. Сходни резултати докладва *Norambuena et al.*, (2017), за които обект на изследване са  $\text{TiO}_2\text{:CuO}$  тънки филми, синтезирани чрез DC магнетронно разпрашаване с увеличаващо се процентно съдържание на  $\text{CuO}$  в покритията.

Резултатите за  $\text{TiO}_2\text{:Ag}_{(40\text{ mm}^2)}\text{:Cu}_{(80\text{ mm}^2)}$  с дебелина на покритието 52 nm, разпрашени при стайна температура без отгряване и такива с отгряване при  $530^\circ\text{C}$  срещу *E. coli* ATCC 10536 и *P. putida* ATCC 12633 определят като по-ефективно това, разпрашено при стайна температура. Влиянието на дебелината на покритието е оценено със същите площи на разпрашаване на сребро и мед, но със 188 nm дебелина на тънкия филм (фиг. 14). Ефектът на задържане в развитието на *E. coli* ATCC 10536 е наблюдаван до 8-ия час, след което бактериите се размножават, докато при по-тънкото покритие няма задържане на растежа. Резултатите са представени на фиг. 14.



**Фиг. 14.** Развитие на *E. coli* ATCC 10536 в присъствие на тънък филм  $\text{TiO}_2\text{:Ag:Cu}$  - с дебелина от 188 nm.

Разликата в ефективността на покритието в зависимост от технологичните условия на отгряване се потвърждава и при другата тест-бактерия *P. putida* ATCC 12633. Неотгритите тънки филми напълно инактивират бактериалните клетки в рамките на 2 часа от началото на експеримента, докато отгритите покрития се характеризират с бактериостатичен ефект, изразен в потискане на растежа до 4-ия час. Резултатите са показани на фиг. 15 (a) и (b).

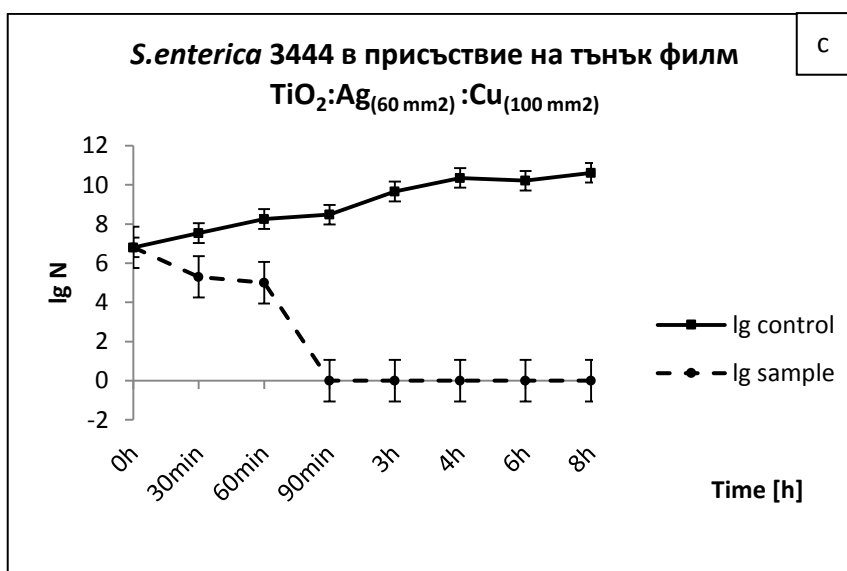
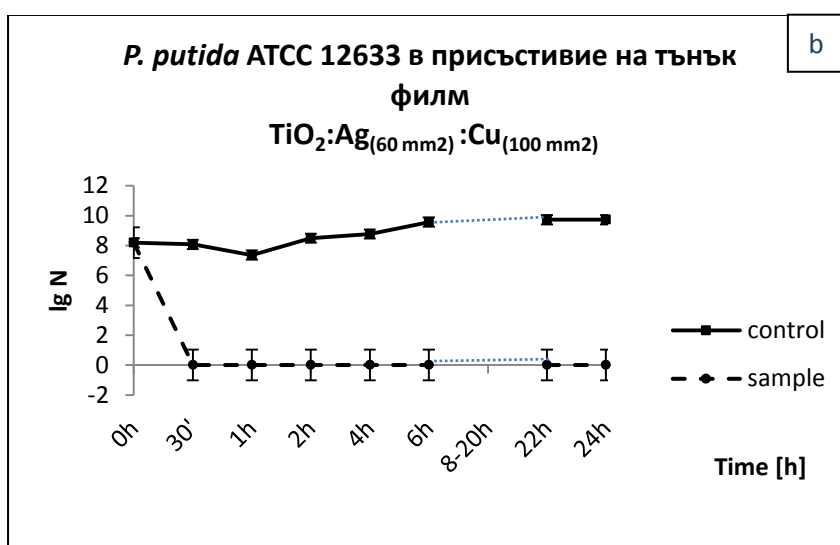
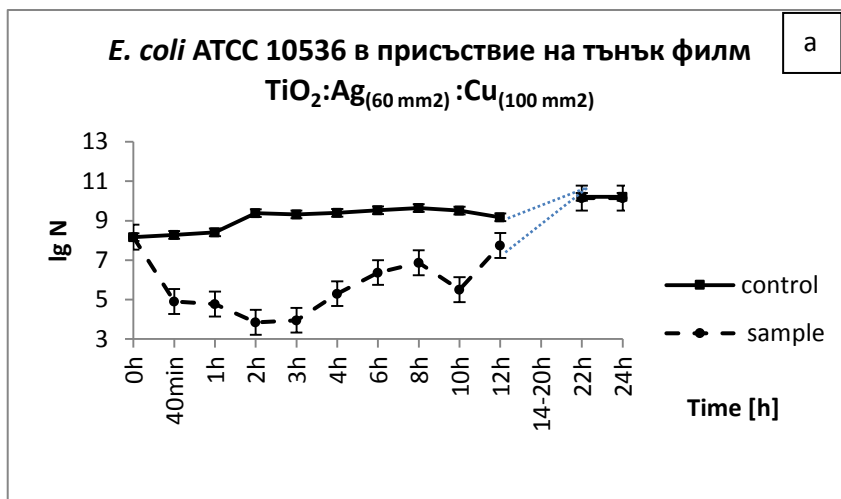


Фиг. 15. Развитие на *P.putida* ATCC 12633 в присъствие на тънък филм TiO<sub>2</sub>:Ag:Cu - (a) неотгрети и (b) отгрети слоеве.

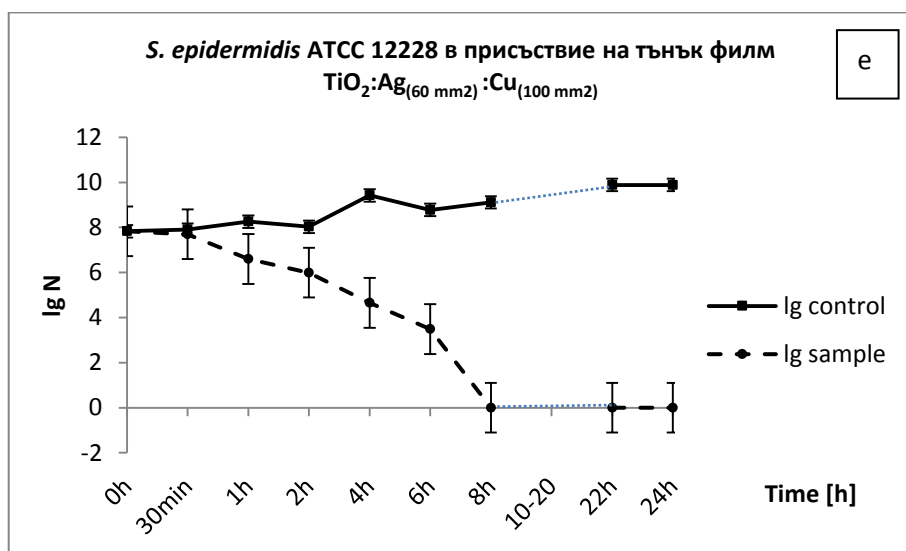
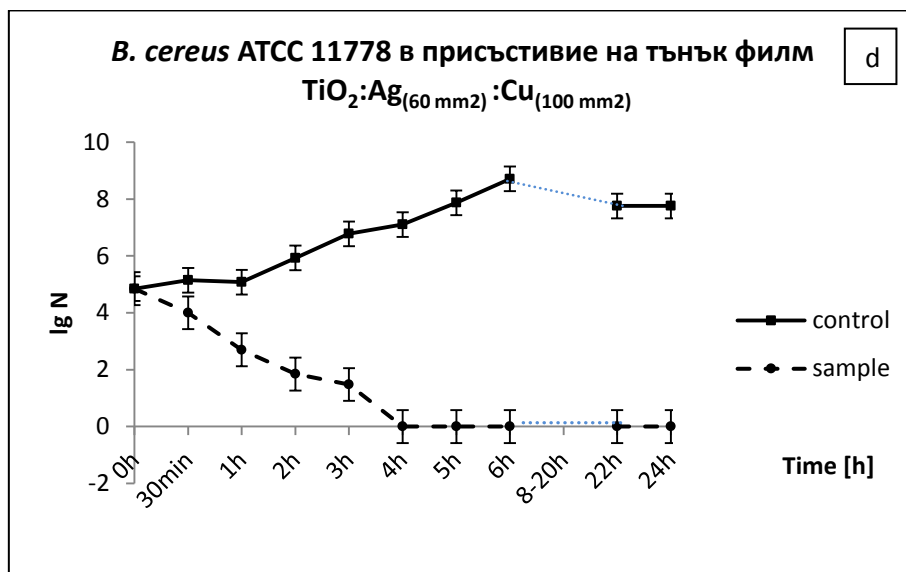
Съчетаването на Cu и Ag показва синергичен антимикробен ефект при ниски/нетоксични концентрации на металите за тъканни култури, докладвано от *Garza-Cervantes al., (2017)*. Открита е повишена пропускливост на клетките при суб-инхибиторни концентрации на среброто, когато се прилага в комбинация с Cu, Ni и Zn. Те установяват при експериментите за цитотоксичност, че изследваните комбинации имат голям потенциал при лечението на локални инфекции.

Следващ етап от изследването на антимикробната активност на тънки филми е за същият компонентен състав, но с по-големи площи на разпръскване и с повече тест-бактерии. Сравнено беше действието на неотгрети филми TiO<sub>2</sub>:Ag<sub>(60 mm<sup>2</sup>):Cu<sub>(100 mm<sup>2</sup>)</sub> и дебелина на покритията 60 nm срещу *E. coli* ATCC 10536, *P. putida* ATCC 12633, *S. enterica* 4333, *B. cereus* ATCC 11778 и *S. epidermidis* ATCC 12228 (фиг.16).</sub>





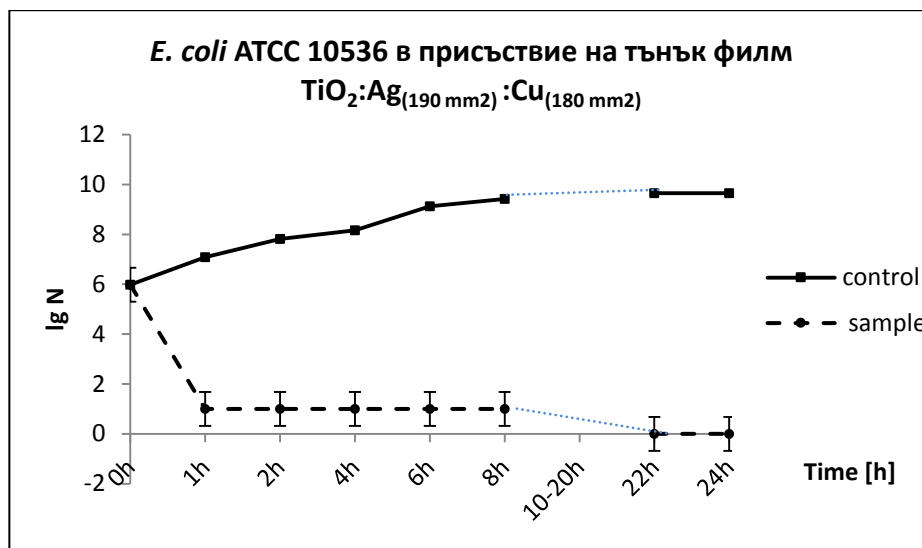
Фиг. 16А. Развитие на *E. coli* ATCC 10536 (a), *P. putida* ATCC 12633 (b) и *S. enterica* 4333 (c) в присъствие на тънки филми TiO<sub>2</sub>:Ag:Cu - с разпрашителна площ на допантите Ag (60 mm<sup>2</sup>) и Cu (100 mm<sup>2</sup>).



Фиг. 16Б. Развитие на *B. cereus* ATCC 11778 (d) и *S. epidermidis* ATCC 12228 (e) в присъствие на тънки филми TiO<sub>2</sub>:Ag:Cu - с разпрашителна площ на допантите Ag (60 mm<sup>2</sup>) и Cu (100 mm<sup>2</sup>).

Както показват графиките, тънкият филм с този компонентен състав и съответните концентрации на допантите постига желаня бактерициден ефект за повечето от тестваните бактерии. Изключение прави *E. coli* ATCC 10536, което дава основание по-нататъшните изследвания с този компонентен състав да бъдат проведени само с най-устойчивия бактериален шам. Проследен е и ефектът на тънки филми с различно съдържание на сребро и мед, като бактерициден ефект е постигнат единствено при покритията с най-високи стойности на легиращи елементи (фиг.17). Останалите тънки филми се характеризират с нарастване във времето на

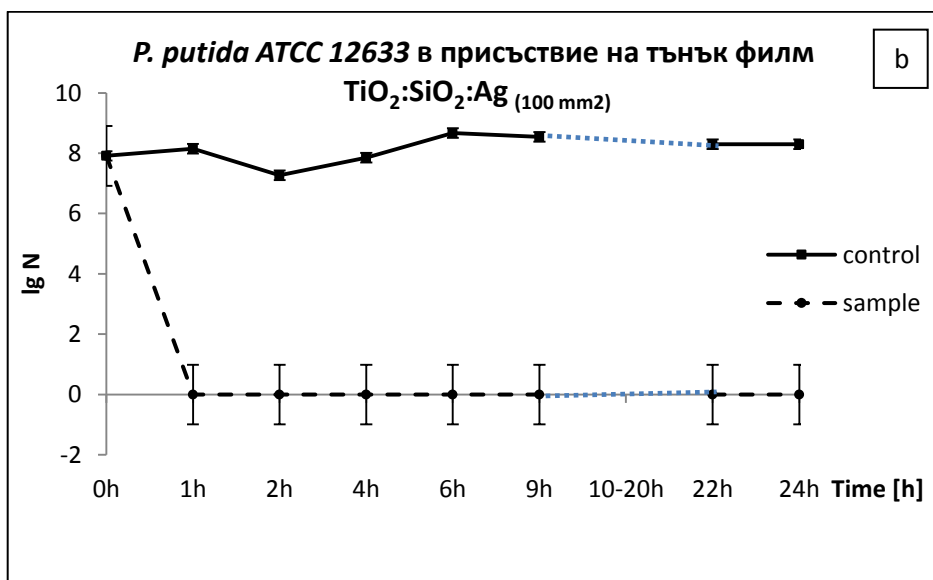
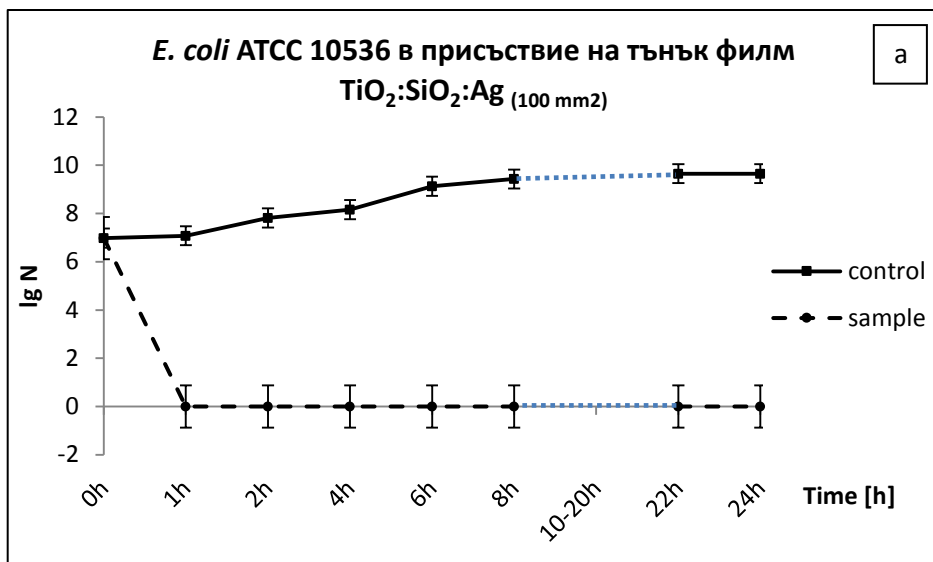
задържане на бактериалния растеж и постепенно намаляване на достигната оптична плътност на бактериалната суспензия в контакт с тънките филми.



Фиг. 17. Развитие на *E.coli* ATCC 10536 върху тънък филм  $\text{TiO}_2:\text{Ag}(\text{190 mm}^2):\text{Cu}(\text{180 mm}^2)$  - с увеличена разпрашителна площ на допантите Ag ( $190 \text{ mm}^2$ ) и Cu ( $180 \text{ mm}^2$ ).

От особен интерес са резултатите, получени от изследваните за антимикробна активност тънки филми  $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2:\text{Ag}$  (фиг. 18) с оглед на времето за пълното инактивиране бактериите. На третиране са подложени Грам-отрицателните бактерии *E.coli* ATCC 10536 и *P. putida* ATCC 12633, като тестваните тънки филми са съответно с площ на разпрашаване на среброто от 40 и  $100 \text{ mm}^2$  и дебелина на покритията 100 и 200 nm.

Бактерициден ефект при *E.coli* ATCC 10536 и *P. putida* ATCC 12633 е установен в рамките на 1 час от началото на експеримента с изразен по-бърз ефект за  $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2:\text{Ag}$  с площ на разпрашаване на Ag =  $100 \text{ mm}^2$ . Резултатите са представени на фиг. 18.

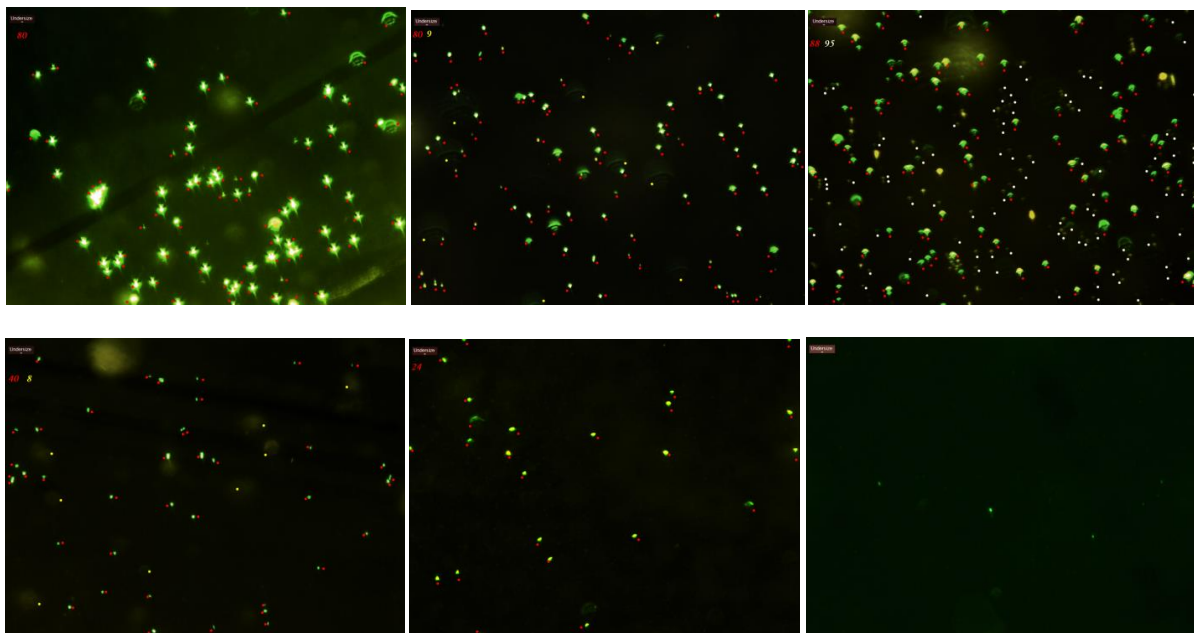


Фиг. 18. Развитие на *E. coli* ATCC 10536 (a) и *P. putida* ATCC 12633 (b) в присъствие на тънък филм TiO<sub>2</sub>:SiO<sub>2</sub>:Ag с площ на разпръскване на Ag 100 mm<sup>2</sup>.

Бързият бактерициден ефект, постигнат при третирането на *E. coli*, демонстрирала най-висока устойчивост към другите тънкослойни покрития, дава основание тънкият филм TiO<sub>2</sub>:SiO<sub>2</sub>:Ag да се оцени като най-ефективен от всички изследвани за антимикробна активност слоеве.

#### 4.2.4. Оценка на жизнеспособността на бактериални клетки след третиране с тънки филми

Тестван е в динамика щам *S. enterica* 4333 в експоненциална фаза на развитие, подготвен както е описано в раздела „Материали и Методи“.



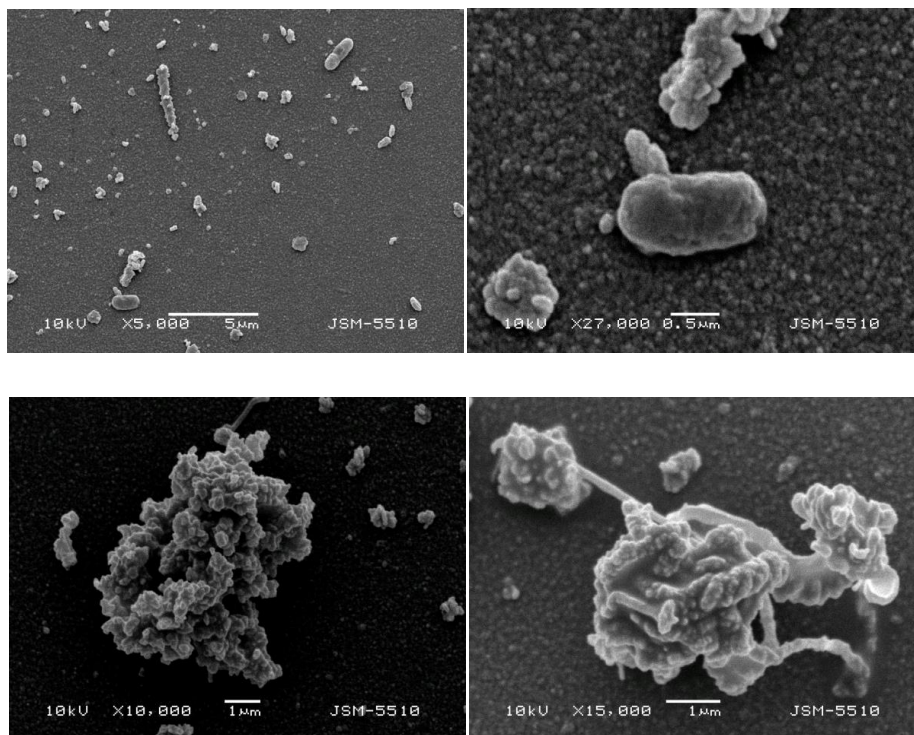
**Фиг. 19.** Флуоресцентно – микроскопски снимки на *S. enterica* 4333 върху контролно стъкло на 30-та, 60-та и 90-та минута от началото на експеримента (горен ред изображения) и след престой върху тънък филм  $\text{TiO}_2:\text{Ag}:\text{Cu}$ ,  $S_{\text{Ag}}=60 \text{ mm}^2$ ,  $S_{\text{Cu}}=100 \text{ mm}^2$  (долен ред изображения) в същите времеви точки.

Микроскопските снимки на третираните клетки спрямо контролите потвърждават резултатите от приложените култивационни методи на анализ. Наблюдава се тенденцията за нарастването на количеството клетки в контролния вариант в хода на експеримента и силното потискане до почти пълно лизиране на живите клетки, оцветени със Syto9 при пробите (фиг.19). На 90-тата минута от експеримента се наблюдават единични клетки в пробата, за които може да се твърди, че не могат да се размножават поради увреждане, потвърдено и от класическия метод на култивиране, при който няма регистрирани колонии след втория час от началото на експеримента. Получените резултати са статистически обработени на база три независими преброявания на клетките.

#### 4.2.5. Морфологични промени на бактериалните клетки при контакт с тънки филми

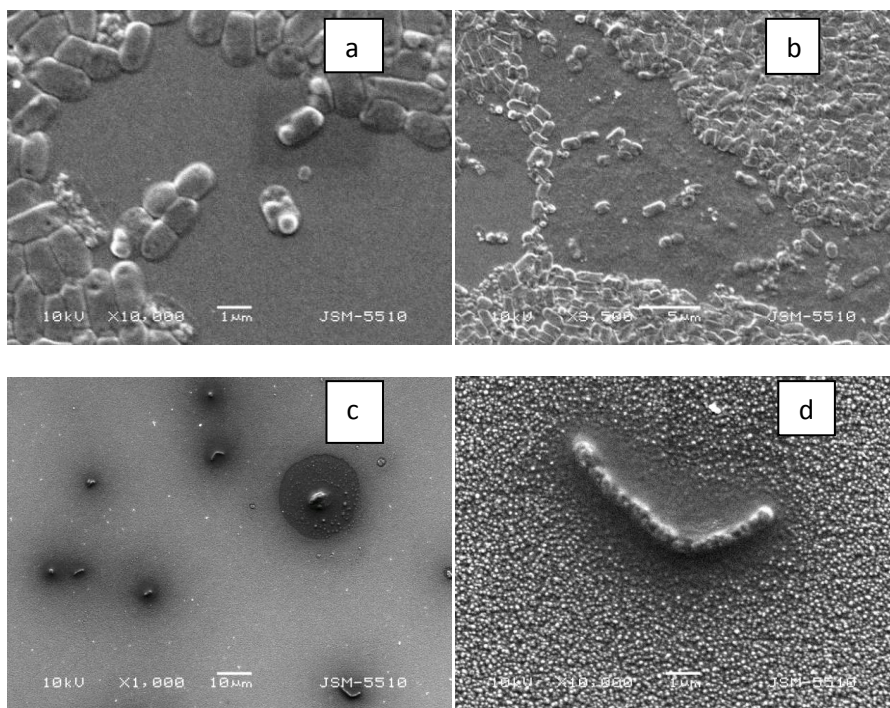
Оценени са тънки филми  $\text{TiO}_2:\text{Cu}:\text{Ag}$  и  $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2:\text{Ag}$  при различни технологични параметри на отлагане и са използвани *E.coli* ATCC 10536 и *P.putida* ATCC 12633 като представителни тест микроорганизми.

От проведените изследвания с увеличаващи се концентрации на легиращите елементи (Cu и Ag), беше установено, че при използването на  $\text{TiO}_2:\text{Cu}:\text{Ag}$  (площи на разпръскване  $S_{\text{Cu}}=180 \text{ mm}^2$ ;  $S_{\text{Ag}}=190 \text{ mm}^2$ ) се постига бактерициден ефект за *E. coli* ATCC 10536, потвърдено и от снимките на фиг. 20.



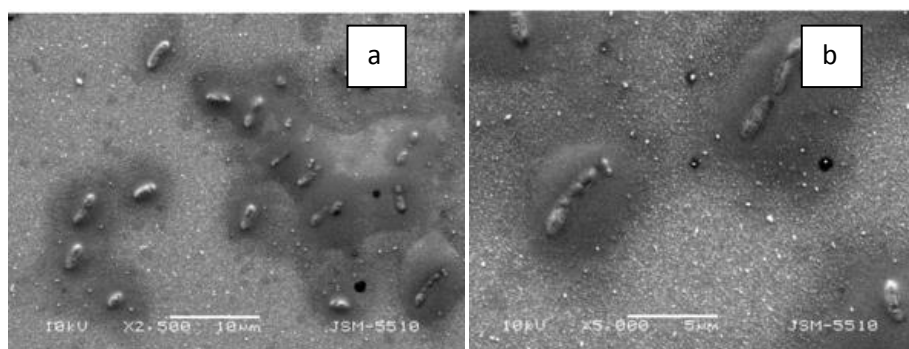
**Фиг. 20.** *E. coli* ATCC 10536 в присъствие на  $\text{TiO}_2:\text{Cu}_{180 \text{ mm}^2}:\text{Ag}_{190 \text{ mm}^2}-80 \text{ nm}$ .

Като по-ефективно покритие, отчитайки времето, необходимо за обезвреждане на *E. coli* ATCC 10536, може да се посочи  $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2:\text{Ag}$ . Този компонентен състав с площ на разпръскване на Ag от  $100 \text{ mm}^2$ , и дебелина на покритието  $200 \text{ nm}$  води до пълно инактивиране на *E. coli* ATCC 10536 в рамките на 1 ч от началото на експеримента. От изображенията на фиг. 21 може да се потвърди разрушаването на клетъчната мембрана от изследваните наноматериали, като се отчете тъмната зона около бактериалните клетки, вероятно от изтекло клетъчно съдържимо.



Фиг. 21. *E. coli* ATCC 10536 в контролни условия (a и b) и в присъствие на тънки филми  $\text{TiO}_2\text{:SiO}_2\text{:Ag}$ ;  $S_{\text{Ag}} = 100 \text{ mm}^2$  и дебелина на покритието 200 nm (c и d).

За допълнителни наблюдения на ефекта от тънките филми върху морфологията на бактериалните клетки е избран *P. putida* ATCC 12633. На фиг.22 и 23 са регистрирани морфологичните увреждания при този микробен вид в присъствие на тънки филми  $\text{TiO}_2\text{:Cu}_{(100 \text{ mm}^2)}\text{:Ag}_{(60 \text{ mm}^2)}$  и  $\text{TiO}_2\text{:SiO}_2\text{:Ag}_{(100 \text{ mm}^2)}$ .



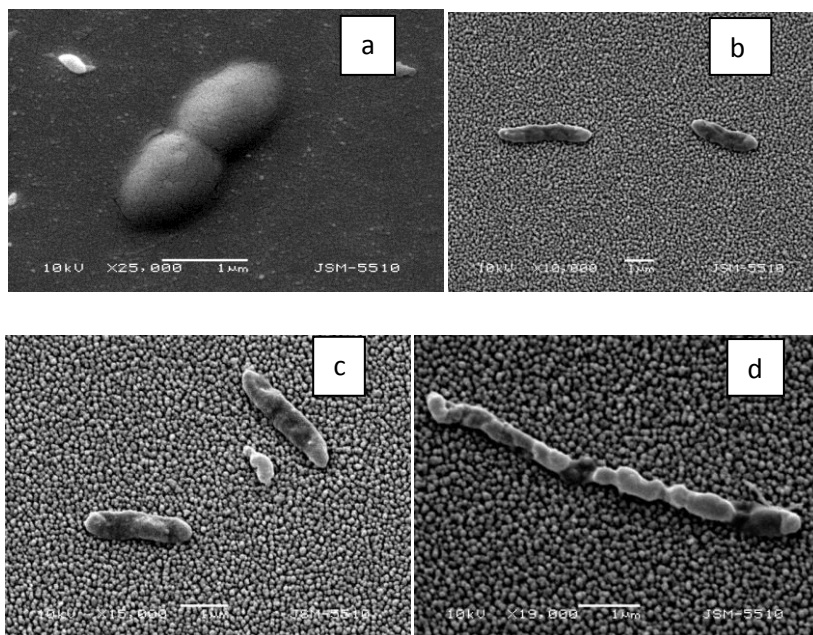
Фиг. 22. Клетки *P. putida* ATCC 12633 върху тънък  $\text{TiO}_2\text{:Ag:Cu}$  филм наблюдавани със сканиращ електронен микроскоп при различни увеличения: а) 2500 пъти; б) 5000 пъти.

Сканиращите изображения (фиг.22) с електронен микроскоп разкриват силно нарушена клетъчна обвивка вместо гладка повърхност при *Pseudomonas* в контролния вариант (фиг. 23 а) и изтичане на клетъчното съдържимо (тъмни зони около клетките), което показва нарушаване на целостта на клетъчната обвивка, последвано от клетъчна смърт (фиг. 22). Резултатите са



доказателство за механичното разрушаване от наночастиците и увреждане от ROS, както е установено от други автори [Sondi u Salopek-Sondi, 2004].

При изследвания на компонентен състав ( $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2:\text{Ag}$  - 100 nm) на покритията прави впечатление, че бактериалните клетки са силно увредени спрямо контролата, но не се наблюдават тъмните зони, образувани от изтичане на клетъчно съдържимо, характерни за *E. coli* ATCC 10536, което отново потвърждава различните механизми на действие на изследваните тънки филми (фиг 23).



**Фиг. 23.** *P.putida* върху контролно съткло (a) и върху тънък филм от  $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2:\text{Ag}$  100nm (b, c, d) при различни увеличения

Наблюденият на фиг. 23 ефект е регистриран след приключване на 24-часовите експерименти, но ефективното време на дезинфекция е в рамките на 4 ч при покритията  $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2:\text{Ag}$  с дебелина от 100 nm и 1 час при тънките филми с дебелина на слоя 200 nm, установено при проследяване на растежа в динамика.

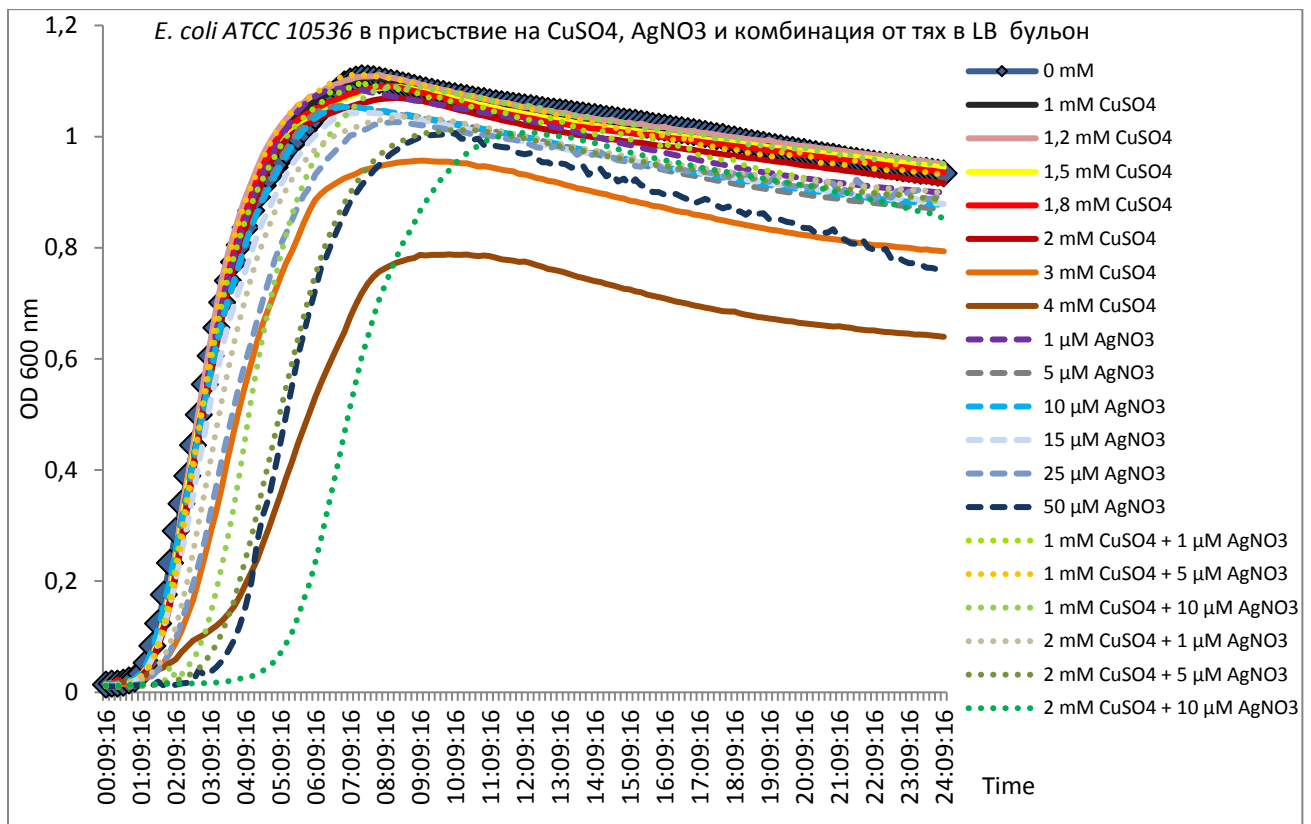


**Фиг. 24.** *Pseudomonas putida* в присъствието на тънки филми  $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2:\text{Ag}$  с дебелина 200 nm и площ на разпръскване на среброто –  $100 \text{ mm}^2$



#### 4.2.6. „Стрес-ефект” върху моделни щамове *E.coli* с различни концентрации $\text{CuSO}_4$ , $\text{AgNO}_3$ и техни комбинации

Определен е ефектът на инхибиране на *E. coli* ATCC 10536, изразен в удължаване на лаг фазата и намаляване на достигнатата оптична плътност в стационарната фаза като резултат от третиране с  $\text{CuSO}_4$  с концентрации между 1mM и 4 mM. Оценено е също влиянието на концентрации от 1 $\mu\text{M}$  до 50  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , както и различни комбинации от  $\text{CuSO}_4$  (1mM и 2 mM) със  $\text{AgNO}_3$  (1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$ ) върху бактериалния растеж. Доказано е синергичното действие на Cu и Ag. Резултатите са представени на фиг. 25 за всички експериментални условия.



Фиг. 25. Влияние на  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{AgNO}_3$  и различни техни комбинации върху *E. coli* ATCC 10536

Подобни резултати за задържащи, но не бактерицидни концентрации на медта могат да бъдат намерени в изследванията на *Grey and Steck, (2001)*. Бактерициден ефект се постига при 6 mM  $\text{CuSO}_4$ , което е установено от *Gupta et al., (1995)*. Бактериостатичното и бактерицидно действие на медните йони в разтвори с намаляващи концентрации е обект на изследване и за *Ishida (2017)*.

Известен е фактът, че когато микроорганизмите не са в естествената си среда, съдържаща различни органични и неорганични добавки, толерантността им към токсиканти зависи от самите

химични вещества, а не от вида микроорганизъм. Това е потвърдено от *Suppi et al., (2015)* които заместват хранителната среда с дейонизирана вода и установяват сходни токсични концентрации при представители на бактерии, дрожди и микроводорасли.

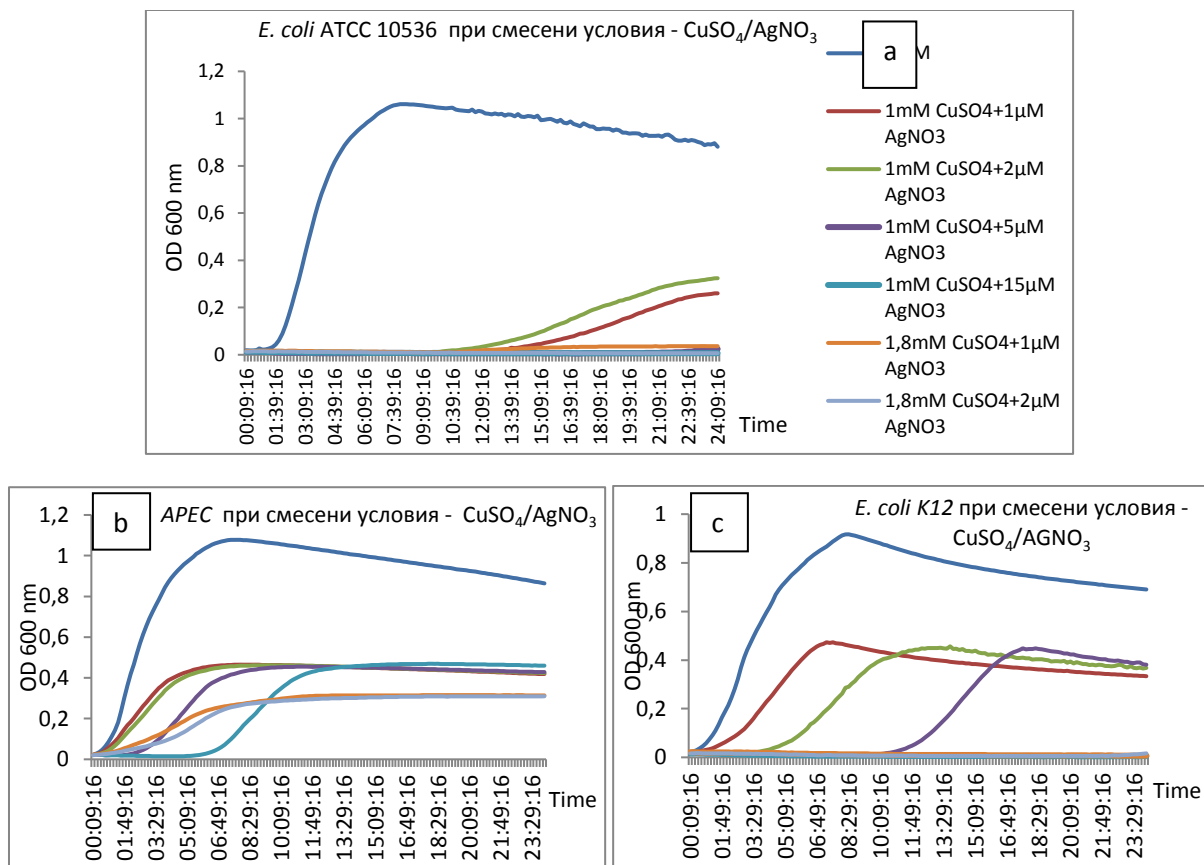
Освен това редица естествени и синтетични хелатиращи агенти могат да намалят токсичността на металите. Тя може да се намали и от обикновените компоненти на хранителни среди [*De Leersnyder et al., 2018*]. Други автори [*Leitao u Sa-Correia, 1997*] установяват, че растежът на *Pseudomonas aeruginosa* в присъствието на потискащи концентрации на мед се подобрява чрез увеличаване концентрациите на органичните вещества в средата.

Проведено беше паралелно изследване с три моделни щама *E. coli*: *E. coli* ATCC 10536, *Avian Pathogenic E. coli* (APEC) и *E. coli* K12 (DH10B) в модифицирана Luria-Bertani течна хранителна среда (LB broth). Резултати от подобни изследвания за установяване влиянието на компонентния състав на средите върху токсичността на метали, метални частици от нанокomпозитни материали и метални йони могат да се намерят в проучванията на *Stauber & Florence, (1989)*; *Farrell et al., (1993)*; *Rathnayake et al., (2013)*; *Anochie & Ike, (2016)*; *De Leersnyder et al., (2018)*.

Сравнителни експерименти за определяне чувствителността на различни щамове *E. coli* не е нов подход в научните изследвания. Като представителен за настоящото изследване е приет *E. coli* ATCC 10536, характеризиращ се с висока устойчивост. *Ruparelia et al., (2008)* при сравняване на 4 щама *E. coli*, третирани с медни и сребърни наночастици установява *E. coli* ATCC 10536 и *E. coli* ATCC 8739 като най-устойчиви в сравнение с *E. coli* MTCC 1302 и добре известния патогенен щам *E. coli* ATCC 25922, показали по-висока чувствителност в техните изследвания. Интересно е да се добави, че *Avian Pathogenic E. coli* (APEC), причинява заболявания предимно при домашни птици, но съществува връзка между APEC и инфекциите при хора [*Le Strangea et al., 2017*; *Hussain et al., 2017*]. Този щам се характеризира с висока устойчивост и общ вирулентен фактор с *Uro-pathogenic E. coli* (UPEC) [*Vincent et al., 2010*; *Nordstrom et al., 2013*].

От друга страна *E. coli* K12 дава положителни резултати при стандартните тестове за идентификация на вида и се използва като представителен в редица изследователски лаборатории [*Bachmann, 1996*]. Известно е, че именно този щам отваря пътя на съвременната молекулярна биология, когато Ледерберг провежда експериментите си за генетичен обмен с *E. coli* K12 [*Morange et al., 2000*]. Затова е важно да сравним използвания в нашите изследвания щам *E. coli* ATCC 10536 с чувствителността на *E. coli* K12 и *Avian Pathogenic E. coli* (APEC), като се проследи влиянието на компонентния състав на хранителната среда върху токсичността на металите.

На фиг. 26 са показани резултатите от комбинирането на различни концентрации  $\text{CuSO}_4$  и  $\text{AgNO}_3$ , както е посочено в „Материали и методи“. Прави впечатление изразената разлика в чувствителността на изследваните моделни щамове *E. coli*, като най-силен антимикробен ефект със задържане се наблюдава при *E. coli* – ATCC 10536 (фиг.50а). Този щам се потиска до 12 и 14 час от комбинациите 1mM  $\text{CuSO}_4$  + 1  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  и 1mM  $\text{CuSO}_4$  + 2  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ . Всички останали концентрации проявяват бактерициден ефект. За вида *E. coli* K12 токсични се оказват 1,8 mM  $\text{CuSO}_4$  в комбинация с 1  $\mu\text{M}$  и 2  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  и 1 mM  $\text{CuSO}_4$  + 15  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ . В присъствие на 1 mM  $\text{CuSO}_4$  и вариации на 1, 2 и 5  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  се наблюдава задържане в развитието на тест бактерията съответно до 2, 4 и 10 час от експеримента (фиг.26 с). Най-устойчивата за тези експериментални условия е *Avian Pathogenic E. coli*, при който не се постига бактерициден ефект с изследваните комбинации от разтвори на  $\text{CuSO}_4$  и  $\text{AgNO}_3$ .



Фиг. 26. Ефект на  $\text{CuSO}_4$  +  $\text{AgNO}_3$  върху три щамове *E. coli* – ATCC 10536 (а), APEC (б) и *E. coli* K12 (с) в модифицирана LB течна хранителна среда

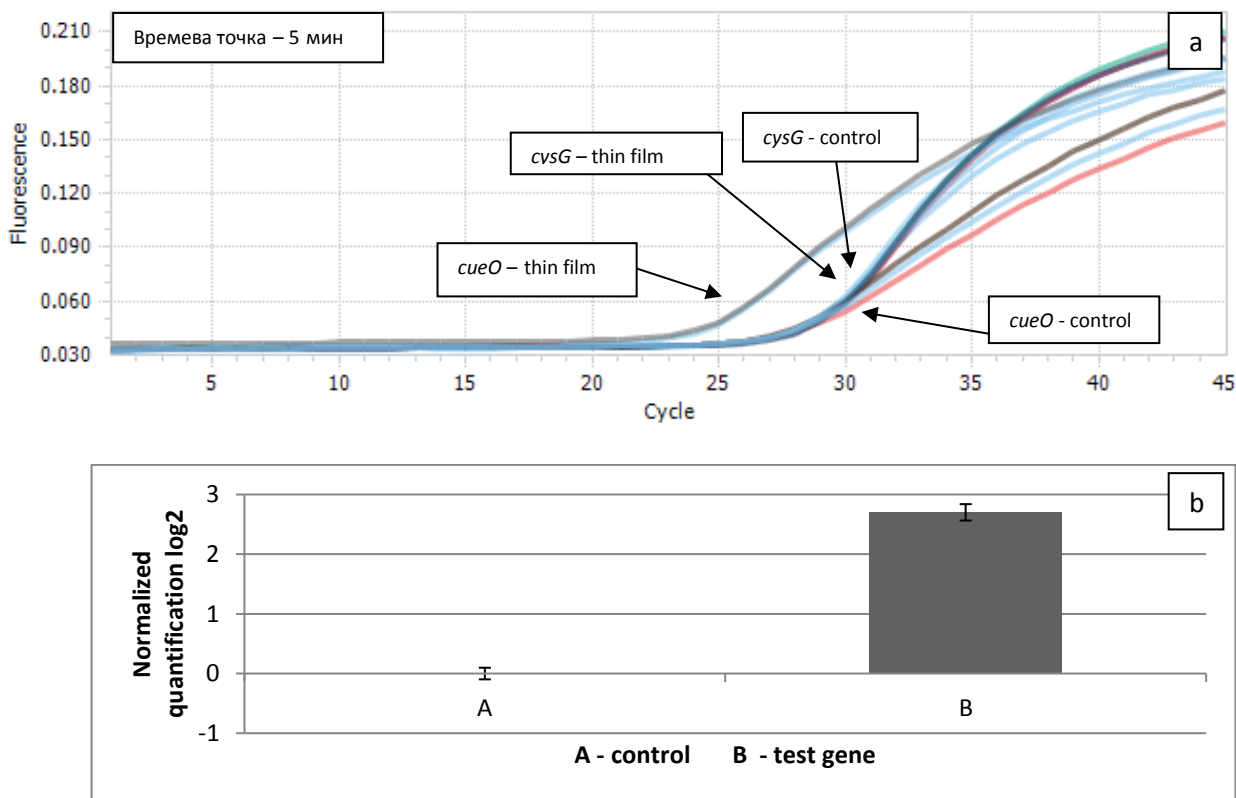
#### **4.2.7. Изследване на генната експресия на *E. coli* ATCC 10536 при повишено съдържание на метали в хранителната среда.**

Като първи етап от работата е подбирането на подходящи праймери и техните концентрации. От посочените в „Материали и методи” праймерни двойки, като най-подходящи за RT-qPCR са установени: 3  $\mu$ M CueO\_C1, 3  $\mu$ M CusA\_C1 и 3  $\mu$ M cusF\_C2 за праймерни двойки при таргетните гени и 1,2  $\mu$ M cysG\_C4 за референтния ген.

Използването на референтни гени произтича от необходимостта за нормализиране на получените количествени стойности за генна експресия на таргетните гени, включвайки ги в изчисленията за относителната експресия чрез  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  анализа, с което се намалява степента на статистическа грешка. Подходящият референтен ген трябва да бъде устойчиво експресиран във всички експериментални условия, използвани в проучването. Такива референтни гени обикновено се идентифицират чрез анализиране на експресионната стабилност на група от предварително подбрани кандидат-гени. Обичайно, като най-консервативен се използва 16s, но това не изключва възможността за прилагане на други референтни гени, самостоятелно или в комбинация. В случая с *E. coli* ATCC 10536, генът 16s се оказва неприложим като референтен. Макар да бяха тествани редица праймери, след прилагане на  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  анализа беше установено, че резултатите не са достатъчно представителни. Обяснение за този факт би могло да се намери в сравнителните анализи за идентификация, проведени от *Wragg et al.*, (2014). Те установяват, че само един щам от над 90 тествани не може да се идентифицира чрез 16s рНК генно секвениране и това е именно *E. coli* ATCC 10536 (NCTC 10418). Това наложи допълнителни експерименти за установяване на подходящ референтен ген, съгласно известни до момента алтернативни високо консервативни гени като *cysG*, *hcaT*, *idnT*, изследвани от *Zhou et al.*, (2011) и *Peng et al.*, (2014).

#### **4.2.8. Експресия на таргетни гени от медната хомеостаза на *E. coli* ATCC 10536 в присъствие на тънки филми $TiO_2:Cu:Ag$ (съотношение на площите на разпръскване 80 :40mm<sup>2</sup>) чрез RT-qPCR.**

В този етап се изследва стрес отговора на тест културата *E. coli* ATCC 10536 в присъствие на тънки филми. Избран е тънък филм  $TiO_2:Cu:Ag$  с площи на разпръскване на медта и среброто съответно 80 и 40 mm<sup>2</sup>. Този филм няма бактерициден ефект и позволява да се оцени индуцирането на стрес отговор в бактериите, чрез повишаване на експресията на гени, включени в медната хомеостаза на *E. coli*. Експериментите са проведени в трикратни технологични повторения и в три последователни биологични повторения. Резултатите са представени и като относителна експресия на тест-гена спрямо контролата (фиг. 27 - 29).



Фиг. 27. Експресия на *cueO* пет минути след началото на третиране с тънки филми  $\text{TiO}_2\text{:Ag:Cu}$  ( $S_{\text{Ag}}=40\text{mm}^2$ ;  $S_{\text{Cu}}=80\text{mm}^2$ ) а) амплификационни криви б) относителна експресия на таргетния ген спрямо контролата

На фиг. 27 (а) е изобразена експресията на *cueO* на 5-та минута, като праговият цикъл за пробата с тънък филм е най-рано ( $C_t = 25,11$ ) за разлика от контролата от чисто стъкло ( $C_t = 28,51$ ) и референтния ген за контролата ( $C_t=28,59$ ) за пробата ( $C_t = 28,24$ ), за които амплификационните криви се припокриват. Следователно повишената експресия на таргетния ген е в резултат на третирането с тънък филм  $\text{TiO}_2\text{:Cu:Ag}$ , който индуцира стрес отговор в бактериите. Това се доказва и от изчисленията, заложиени в  $2^{-\Delta C_t}$  анализа:

$$C_t (\text{cueO} - \text{glass } 5 \text{ min}) = 28,51$$

$$C_t (\text{cueO} - \text{thin film } 5 \text{ min}) = 25,11$$

$$C_t (\text{cysG} - \text{glass } 5 \text{ min}) = 28,59$$

$$C_t (\text{cysG} - \text{thin film } 5 \text{ min}) = 28,24$$

$$\Delta C_t = - 0,08$$

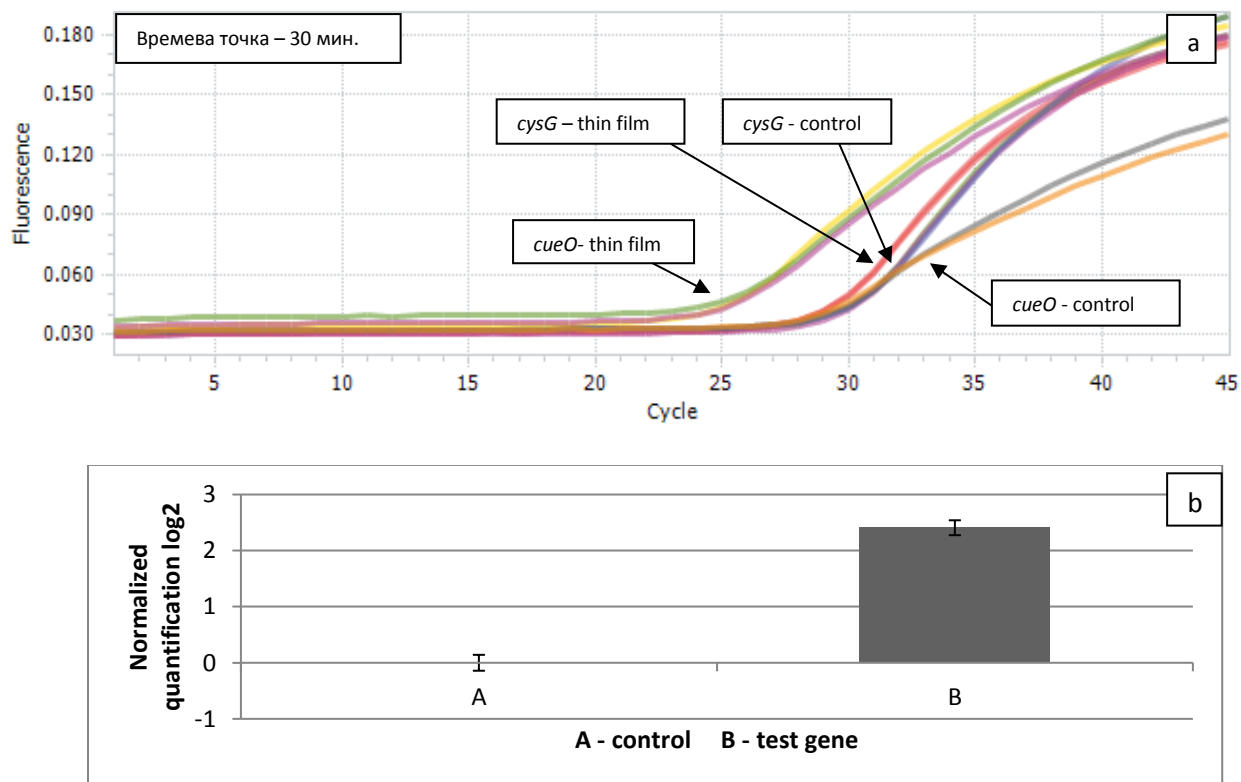
$$\Delta C_t = - 3,12$$

$$\Delta \Delta C_t = - 3,04$$

$2^{-\Delta \Delta C_t} = 8,22$  кратна индукция (fold induction (f.i)) *E. coli* ATCC 10536 *cueO* таргетен ген, на 5<sup>-та</sup> минута от третирането с тънък филм  $\text{TiO}_2\text{:Cu:Ag}$  ( $S_{\text{Cu}}= 80\text{mm}^2 / S_{\text{Ag}} = 40\text{mm}^2$ ).

На фиг. 27 (b) е представена относителната експресия на таргетния ген спрямо контролата със стандартно отклонение.

При анализа на данните за 30-та и 60-та минута резултатите са съпоставими, показано на следващите две графики и съпътстващи изчисления за относителната генна експресия на целевите гени, активирани в резултат на стрес-отговор вследствие третиране с тънките филми, дотирани с мед и сребро.



**Фиг. 28.** Експресия на *cueO*, 30 минути след началото на третиране с тънки филми  $\text{TiO}_2\text{:Ag:Cu}$  ( $S_{\text{Ag}}=40\text{mm}^2$ ;  $S_{\text{Cu}}=80\text{mm}^2$ ): а) амплификационни криви; б) относителна експресия на таргетния ген спрямо контролата.

$$Ct_{(\text{cueO} - \text{glass } 30')} = 29,43$$

$$Ct_{(\text{cueO} - \text{thin film } 30')} = 25,67$$

$$Ct_{(\text{cysG} - \text{glass } 30')} = 29,77$$

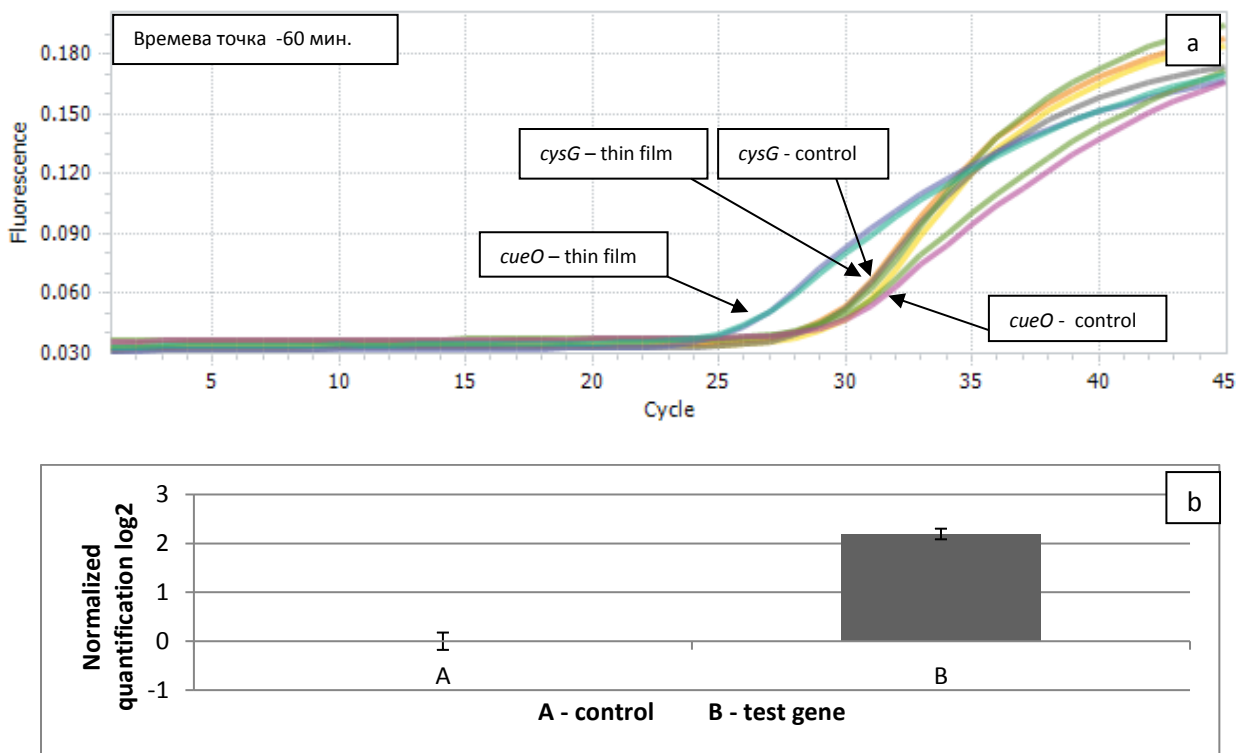
$$Ct_{(\text{cysG} - \text{thin film } 30')} = 28,83$$

$$\Delta Ct = -0,335$$

$$\Delta Ct = -3,155$$

$$\Delta \Delta Ct = -2,82$$

$2^{-\Delta \Delta Ct} = 7,06$  кратна индукция (**f.i**) на **cueO** таргетен ген, на **30-та** минута от третирането *E. coli* ATCC 10536 с тънък филм  $\text{TiO}_2\text{:Cu:Ag}$  ( $S_{\text{Cu}}= 80\text{mm}^2/ S_{\text{Ag}} = 40\text{mm}^2$ ).



Фиг. 29. Експресия на *cueO*, 60 минути след началото на третиране на *E. coli* ATCC 10536 с тънки филми  $\text{TiO}_2\text{:Ag:Cu}$  ( $S_{\text{Ag}}=40\text{mm}^2$ ;  $S_{\text{Cu}}=80\text{mm}^2$ ) а) амплификационни криви б) относителна експресия на таргетния ген спрямо контролата.

$$Ct_{(\text{cueO} - \text{glass } 60')} = 30,05$$

$$Ct_{(\text{cueO} - \text{thin film } 60')} = 26,02$$

$$Ct_{(\text{cysG} - \text{glass } 60')} = 31,09$$

$$Ct_{(\text{cysG} - \text{thin film } 60')} = 29,62$$

$$\Delta Ct = -1,04$$

$$\Delta Ct = -3,59$$

$$\Delta \Delta Ct = -2,55$$

$2^{-\Delta \Delta Ct} = 5,88$  кратна индукция (f.i) на *cueO* таргетен ген, на 60-та минута от третирането на *E. coli* ATCC 10536 с тънък филм  $\text{TiO}_2\text{:Cu:Ag}$  ( $S_{\text{Cu}}=80\text{mm}^2/S_{\text{Ag}}=40\text{mm}^2$ ).

От резултатите става ясно, че експресията на *cueO* в първите минути от третирането е най-изразена.

В изчисленията са заложили трикратните технически повторения, а следващите резултати се отнасят за различните биологични повторения на експериментите, както следва:

В обобщен и усреднен вариант данните от относителната генна експресия на *cueO* вследствие третирана с тънкослойни покрития *E. coli* ATCC 10536 са представени в табл. 6.

**Таблица 6.** Количествена генна експресия на таргетен ген *cueO* на *E.coli* ATCC 10536 в условия на стрес вследствие третиране с тънки филми  $TiO_2:Cu:Ag$  ( $S_{Cu} = 80mm^2 / S_{Ag} = 40mm^2$ ) в първия час от взаимодействието на бактериите.

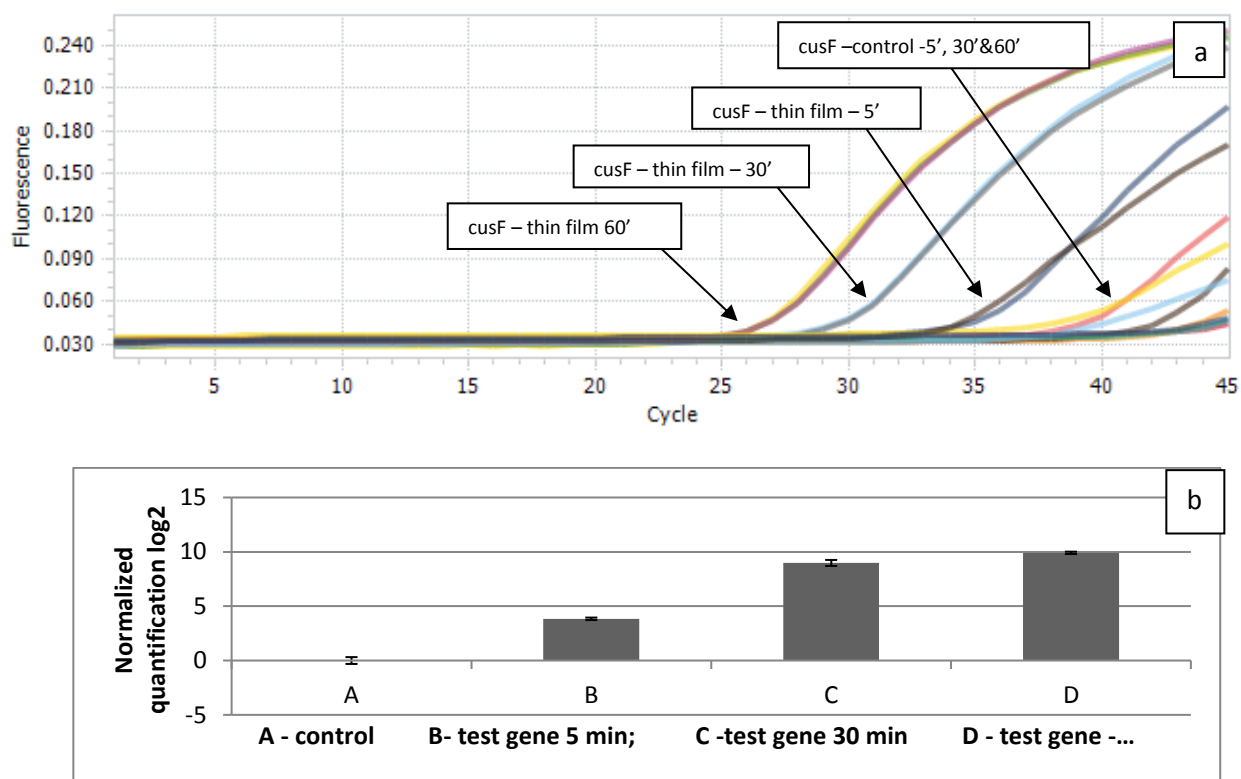
Времева точка	Експресия на <i>cueO</i> в хода на I биологично повторение	Експресия на <i>cueO</i> в хода на II биологично повторение	Експресия на <i>cueO</i> в хода на III биологично повторение	Усреднена стойност на <i>cueO</i> от трите биологични повторения	Тренд
5 мин.	8,22	5,38	13,73	9,11	↓
30 мин.	7,06	6,4	13,17	8,87	
60 мин.	5,88	4,46	9,64	6,66	

Разликата в стойностите на генната експресия от третото биологично повторение може да се обясни с използването на нова партида тънкослойни покрития, при които са възможни известни разлики в състава на тънките филми. Протоколът за RT-qPCR се извършва с константни концентрации на комплементарна ДНК за проби и контроли, което изключва разликата да е от изходния биологичен материал. Въпреки това обаче, резултатите могат да се приемат за представителни и да се включат в обобщението. Ясно се очертава тенденцията на намаляване на експресията в хода на експеримента. Високата генна експресия на 5-тата минута показва ранния етап на взаимодействие на бактериите с наноматериалите и възникващия веднага стрес отговор. Намалената генна експресия с всяко следващо (второ и трето) използване на тънките филми показва, че концентрацията на допантите също намалява.

При обработка на данните за относителната генна експресия беше изключено влиянието на тънкослойните покрития от  $TiO_2$ . За целта в експериментите бе заложено използването на втора отрицателна контрола (тънък филм  $TiO_2$  без допанти), която е обработвана паралелно с контролата от чисто стъкло и са съпоставени изчисленията от  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  анализа както срещу контрола – чисто стъкло, така и срещу контрола  $TiO_2$ . Резултатите за експресията на гените нямаха статистически значима разлика, когато се изчислява срещу контрола чисто стъкло или  $TiO_2$ . Това позволява да се заключи, че  $TiO_2$  не е стрес медиращ фактор и възникването на стрес отговор се дължи изцяло на допантите Cu и Ag, влизащи в компонентния състав на тънкослойните покрития.

Процесът на генна експресия на останалите таргетни гени (*cusA* и *cusF*), свързани с Cu/Ag експозиция на *E. coli* ATCC 10536, като допанти на използваните тънки филми е показан на следващите фигури (фиг. 30 - фиг.31 ).

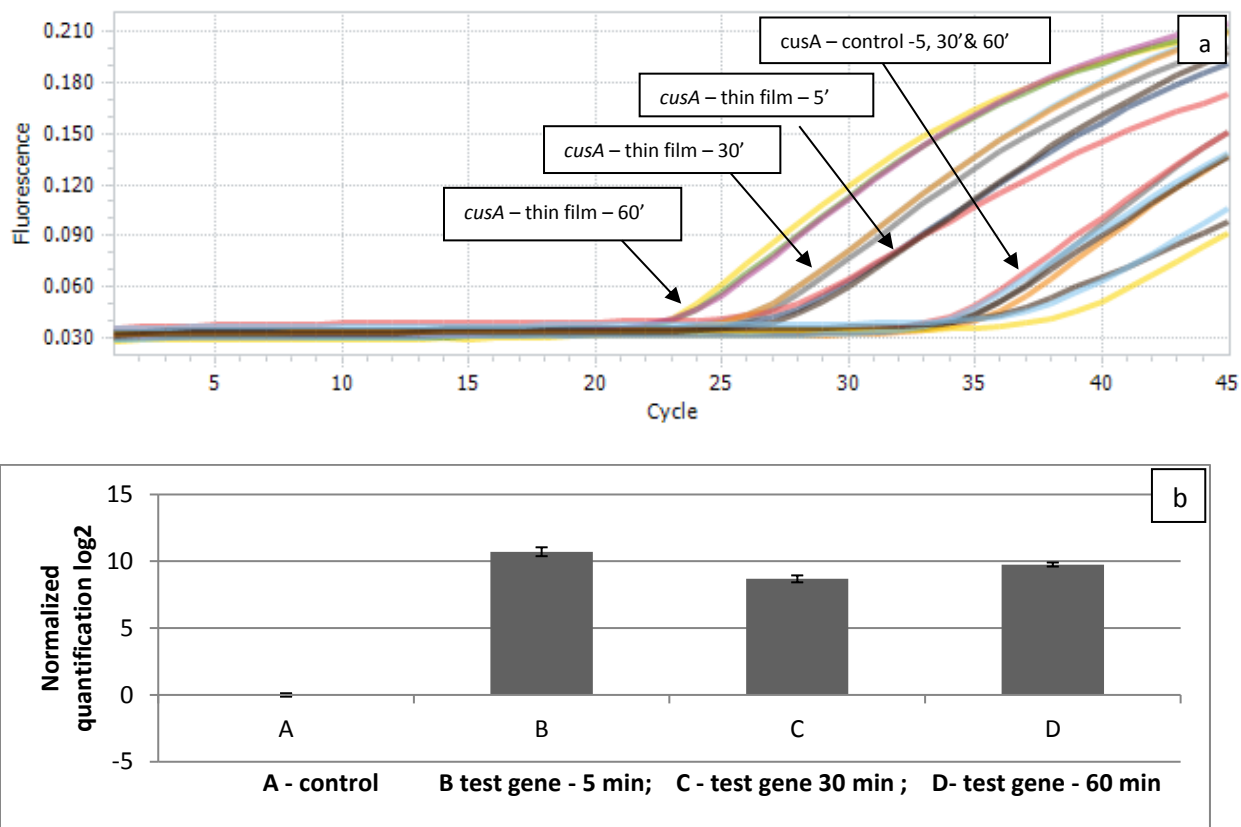




**Фиг. 30.** Експресия на *cusF* на 5', 30' и 60' при култивиране на *E.coli ATCC 10536* с тънки филми  $\text{TiO}_2\text{:Cu:Ag}$  ( $S_{\text{Cu}} = 80\text{mm}^2 / S_{\text{Ag}} = 40\text{mm}^2$ ) а) амплификационни криви б) относителна експресия на таргетния ген спрямо контролата.

Металошаперонът *cusF*, който не се експресира при отсъствие на Cu, (липса на амплификационен продукт в контролните условия), показва стрес отговор на 5-тата минута, характеризиращ се с прагов цикъл  $C_t = 35,64$ . Статистически значима е експресията в рамките на 30 до 60 мин от началото на експеримента, когато праговете цикли в посочената графика са със стойности съответно  $C_t (30') = 29,54$  и  $C_t (60') = 26,39$ .

Интересен е фактът, че макар и регулиран от същия оперон, другият мед индуцируем ген *cusA*, обект на това изследване, има сходна със *sueO* експресия по отношение на праговия цикъл от RT-qPCR, в рамките на експерименталната времева точка 60 мин.



**Фиг. 31.** Експресия на *cusA* в резултат на 5', 30' и 60' експозиция на *E.coli* ATCC 10536 с тънки филми  $\text{TiO}_2\text{:Cu:Ag}$  ( $S_{\text{Cu}}= 80\text{mm}^2/ S_{\text{Ag}}= 40\text{mm}^2$  а) амплификационни криви b) относителна експресия на таргетния ген спрямо контролата.

Наличието на експресия на 5-та мин е показател за активиране на защитната *cus* система в клетката на *E. coli*, което е потвърждение за участието на ефлуксната система *cusCBAF*. Това е в съгласие на докладваните от *Outten et al., [2001]* данни за участието на двете защитни системи при меден стрес. Те заключават, че цитозолните (*CueR*) и периплазматичните (*CusRS*) сензорни системи поотделно регулират системите за износ на мед в отговор на промените в наличието на мед и кислород. Известно е, че *CusRS* активира експресията на *cusCBAF* оперона в отговор на повишени концентрации на мед [*Munson et al., 2000*].

*Cue* регулона се експресира при умерени базови нива на *Cu* предимно при аеробни условия, без да се изключват анаеробните условия. За разлика от това, системата *Cus* има изключително ниски базови нива и в двата случая, което беше потвърдено и от резултатите, докладвани тук чрез липсата на експресия в контролните условия при RT-qPCR. Нашите резултати са съпоставими с докладваните от *Outten et al., (2001)* по отношение на наблюдаваната експресия на *cueO*. Те установяват, че с увеличаване на медния стрес, системата *Cue* се активира близо 12 пъти до максимална степен. При въздействието на тънките филми върху *E. coli*,

увеличението на експресията за целевия *cueO* ген е 9.11, видно от стойностите в табл. 6. От друга страна, системата *Cus* не се транскрибира, докато медта не достигне по-висок праг на разтваряне. Тези наблюдения предполагат, че системата *Cue* е основна медна ефлуксна система и че *Cus* се активира само когато *Cue* системата с включени гени *cueO* и *copA* е претоварена. В този смисъл *CueR* улеснява износа на мед при умерена и висока концентрация на мед, докато *CusRS* увеличава толерантността при условия на екстреман меден стрес [Outten *al.*, 2001]. Сравнението в експресията на таргетните гени дава обосновано доказателство за стрес-ефекта на тънките филми, като се наблюдава постъпателно активиране на *cueO*, и впоследствие значително застъпване на действието на *Cus* системата с разглежданите *cusA* и *cusF* гени.

#### **4.2.9. Тест за стабилност на антимикробния потенциал на тънки филми - Проследяване генната експресия на бактериални клетки, третирани с повторно използвани тънки филми**

Една от поставените задачи в настоящия дисертационен труд е да се установи стабилността на тънките филми. За целта е проведен експеримент с повторно използване на вече употребявани тънки филми и е наблюдавана експресията на таргетните гени от двете защитни системи на *E.coli*, участващи в медната толерантност на клетката. Експерименталните условия са същите – проследен е стрес отговорът, изразен в генна експресия в 5-тата, 30-тата и 60-тата минута от началото на третирането.

Тези резултати, сравнени с експресията на *cueO*, *cusA* и *cusF*, при първоначалната употреба на наноструктурните покрития дават основание да се заключи, че съществува известно „износване“ на тънкослойните филми от  $\text{TiO}_2\text{:Cu:Ag}$ , и количеството на металите, попаднали в хранителната среда са занижени, но достатъчни да провокират стрес отговор в бактериите. Това е доказателство за действието на изследваните материали, но предполага последващи технологични подобрения с оглед повишаване ефективността и продължителността на живот на тези новосинтезирани материали. Въпреки това, като се сравни степента на разтваряне на метали от тънките филми със стресовите концентрации на конвенционално прилаганите  $\text{CuSO}_4$  и  $\text{AgNO}_3$ , за които беше доказано, че нямат ефект върху бактериите, може да се направи извод за по-високата токсичност на наночастиците спрямо металните йони като един от основните механизми на действие. Това става чрез преодоляване на бариерата на бактериалната мембрана и навлизане в цитозола на клетката, доказателство за което е повишената експресия на таргетните гени от двете защитни системи на *E. coli* – мултикупри оксидазата *cueO*, както и *cusA* и *cusF* като част от ефлуксната помпа, свързана с износ на мед от периплазмата.

#### **- Проследяване разтворимостта на тънкослойните покрития в динамика**

Във връзка с прецизиране на оценката за действието на тънките филми е проследено разтварянето на металите, легирани в тънки филми  $\text{TiO}_2\text{:Cu:Ag}$  (80:40) в различни времеви точки, както и след повторна употреба на съответните покрития. Използваният метод на анализ беше ААС, а получените резултати са представени в табл. 7 като  $\text{mmol/l}$ .

**Таблица 7.** Разтворимост на допантите в различните времеви точки определена чрез AAS.

AAS	Cu	Cu mg/l	Cu mol/l	Cu mmol/l	AAS	Ag mg/l	Ag mol/l	Ag mmol/l
(1)	5min	0,5359	8,43326E-06	0,008433261	(1)	0,056533	9,52809E-05	0,095281
	30min	1,4305	2,25113E-05	0,022511252		0,2067	1,91637E-05	0,019164
	60min	2,1416	3,37016E-05	0,033701571		0,4533	4,20267E-05	0,042027
(2)	5min	1,0627	1,67233E-05	0,016723	(2)	0,1495	1,38606E-05	0,013861
	30min	0,7133	1,12249E-05	0,011225		0,054967	5,09611E-06	0,005096
	60min	1,757	2,76493E-05	0,027649		0,2947	2,73225E-05	0,027322
AAS	Cu	mg/l	mol/l	mmol/l	AAS	Ag mg/l	mol/l	mmol/l
(3)	5min	0,5848	9,20278E-06	0,009203	(3)	0,0188	1,743E-06	0,001743
	30min	1,3343	2,09974E-05	0,020997		0,2375	2,20193E-05	0,022019
	60min	2,8497	4,48447E-05	0,044845		0,2925	2,71185E-05	0,027118
reuse	5min	0,0353	5,55503E-07	0,000556	reuse	-0,0347		
from	30min	0,5377	8,46159E-06	0,008462	from	0,0381	3,53236E-06	0,003532
(2)	60min	1,7136	2,69663E-05	0,026966	(2)	0,0865	8,01966E-06	0,00802

Данните обхващат трите биологични повторения съответно (1), (2), (3), както и повторната употреба на тънките филми, използвани във второто биологично повторение на експеримента (reuse from (2)).

Анализът на данните потвърждава предишните наблюдения за много ниски нива на разтворимост на допантите в богатата органична хранителна среда. Освен това е установена степента на разтворимост в различните времеви точки на експеримента, при което може да се заключи, че се увеличава разтворимостта на металите в рамките на първия час от третирането. Тези резултати дават обяснение за бързия бактерициден ефект, постигнат при по-чувствителните бактерии, както и за механизма на действие, изразяващ се в активността на металните йони, отговорни за нивата на генна експресия. От друга страна, като се сравнят установените бактерицидни и стресови концентрации на разтвори  $\text{CuSO}_4$  и  $\text{AgNO}_3$  върху най – устойчивия от тестваните микроорганизми (*E. coli*) с нивата на наночастиците Cu и Ag, разтворени от тънките филми може да се направи извод за по-високата ефективност на наночастиците в сравнение с йоните по отношение степента на токсичност. Тъй като е установено синергично действие на наночастици и йони като краен ефект срещу тестваните бактерии, може категорично да се заяви, че наноматериалите във вид на тънкослойни покрития, синтезирани чрез радио-честотно магнетронно ко-разпрашаване са по-ефективният модел в борбата с клинично значими микроорганизми.

## V. Изводи

1. От резултатите с различни по състав дисперсии от наночастици, колаген-базирани нанокомпозити и тънки филми могат да се направят следните изводи:
2. Съществува корелация между антибактериалната активност и количеството на внедрените легиращи елементи в слоевете  $\text{TiO}_2$  при тънките филми и концентрацията на антимикробния агент при колаген базираните нанокомпозити.
3. Установено е синергично действие при поликомпонентния състав на дисперсиите от наночастици, като се наблюдава усилване на антибактериалния ефект с около 30% с включването на сребро и  $\text{SiO}_2$  в състава им.
4. Включването на Ag, Zn и  $\text{SiO}_2$  наночастици в колагенови матрици повишава стабилността на композитите и антимикробната им ефективност с около 50%.
5. Установено е синергично действие между наночастици от сребро, цинков оксид, цинков титанат, силициев диоксид и редуциран графенов оксид и антибиотика хлорамфеникол срещу *C. lusitaniae*.
6. Доказан е широкоспектърен антимикробен ефект на поликомпонентните колаген базирани нанокомпозити Coll:Ag/ $\text{SiO}_2$ /RGO и Coll:ZnTiO<sub>3</sub>/ $\text{SiO}_2$ /RGO.
7. Тънкослойните покрития с широкоспектърен антимикробен ефект ( $\text{TiO}_2$ :Ag:Cu и  $\text{TiO}_2$ : $\text{SiO}_2$ :Ag) причиняват морфологични увреждания на бактериалните клетки и могат да се прилагат в медицински изделия с повишен санитарен риск, като елиминират формирането на биофилм.
8. Времето на задържане на бактериалния растеж и ефективното време на дезинфекция зависи от компонентния състав и технологичните условия на нанасяне на покритията. Най-ефективни са неогретите  $\text{TiO}_2$ : $\text{SiO}_2$ :Ag филми с 14-20 at.% сребро и дебелина на покритията 80-100 nm.
9. Доказано е активиране на ефлуксните помпи в тест-бактерията *E. coli* ATCC 10536 за извеждане на токсичните метали от периплазмата и цитоплазмата в първите 5 минути от експозицията на тънки филми  $\text{TiO}_2$ :Ag<sub>(40 nm<sup>2</sup>)</sub>:Cu<sub>(80 nm<sup>2</sup>)</sub>.
10. Сребърните и медни йони се конкурират за активните центрове на ензимите в ефлуксната система на *E. coli* ATCC 10536, отговорна за извеждането на металите от клетката. Среброто блокира ензимната активност.

11. Установено е трикратно намаляване съдържанието на сребро в тънките филми след еднократна и петкратно след двукратна употреба.

## VI. Приноси

1. За първи път е проследен „стрес-отговорът” при моделен щам *E. coli ATCC 10536* в присъствие на тънки  $\text{TiO}_2\text{:Cu:Ag}$  филми.
2. За първи път е доказано индуциране на стрес отговор в *E. coli ATCC 10536* в първите 5 минути от взаимодействието с тънките филми;
3. За първи път са изследвани 12 двойки таргетни и референтни гени в *E. coli ATCC 10536*, и са подбрани най-подходящите двойки праймери и техните концентрации за наблюдение на генната експресия в условия на натоварване с мед и сребро като метални йони, отделени от соли и наночастици.
4. Доказано е, че присъствието на Ag в наноматериалите нарушава защитните механизми на моделен щам *E. coli ATCC 10536*
5. За първи път са тествани нанокomпозитни материали в колагенова матрица и тънки филми  $\text{TiO}_2\text{:Cu:Ag}$  и  $\text{TiO}_2\text{:SiO}_2\text{:Ag}$ , получени чрез магнетронно разпрашаване, за които е доказано, че имат антимикуробен ефект.
6. Установено е синергично действие и концентрационно-зависим ефект при използване на Cu и Ag в качеството на допанти в нанокomпозитни тънки филми  $\text{TiO}_2\text{:Cu:Ag}$ .
7. Установено е, че добавянето на  $\text{SiO}_2$  към компонентния състав на тънки филми  $\text{TiO}_2\text{:SiO}_2\text{:Ag}$  води до бърз бактерициден ефект чрез по-равномерно разпределение на допанта върху матрицата от  $\text{TiO}_2\text{:SiO}_2$ .
8. Установена е по-висока антимикуробна активност на тънки филми  $\text{TiO}_2\text{:Cu:Ag}$  и  $\text{TiO}_2\text{:SiO}_2\text{:Ag}$  без отгряване след получаването им, което прави допустима употребата на тези покрития върху термолабилни материали.
9. Установено е, че наночастиците са по-ефективни като антимикуробни агенти от разтворените сребърни и медни йони на съответните соли.

### Публикации, свързани с дисертационния труд:

1. Iliana A. Ivanova, Elitsa L. Pavlova, Dragomira S. Stoyanova, Orlin I. Angelov. 2019, Antibacterial effect of TiO<sub>2</sub>:Cu:Ag thin coatings on *Pseudomonas* strain measured by microbiological and ATP assays. Journal of Basic Microbiology DOI: 10.1002/jobm.201900427 (IF= 1.76)
2. Angelov O., Stoyanova D., Ivanova, I. and Todorova, S. (2016) Antimicrobial effect of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Ag and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Ag thin films on Escherichia coli and Pseudomonas putida, INERA Conference “Vapor Phase Technologies for Metal Oxide and Carbon Nanostructures”, Velingrad, 5-9.07.2016, Journal of Physics: Conference series; 764 (2016) 012015 doi:10.1088/1742-6596/764/1/012015 (Q3; SJR=0,24)
3. Angelov O., Stoyanova D., Ivanova, I. (2016) Antimicrobial effect of TiO<sub>2</sub> doped with Ag and Cu on Escherichia coli and Pseudomonas putida, INERA Conference “Vapor Phase Technologies for Metal Oxide and Carbon Nanostructures”, Velingrad, 5-9.07.2016, Journal of Physics: Conference series. <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/764/1/012014/pdf> (Q3; SJR=0,24)
4. Stoyanova, D., Ivanova I. A., Vladkova, T.G. (2016). Nanobiotechnology against Salmonella sp. JSciMed Central. J Vet Med Res 3(4): 1057. (Q4; SJR=0,116)
5. Stoyanova D.S., Ivanova I.A., Staneva A., Madalina Albu-Kaya and Vladkova TG (2016) Antifungal potential of some collagen-based Nanocomposites Against *Candida lusitanae*. SOJ | Nanoscience & Technology | Open Access (Q3; SJR=0,156)
6. Stoyanova, D., Ivanova, I., Angelov O., Vladkova, T. 2018 Antibacterial effect of thin films TiO<sub>2</sub>:SiO<sub>2</sub>:Ag against *E.coli* and *P.putida*. NANOCON 2017 - Conference Proceedings, 9th International Conference on Nanomaterials - Research and Application 2017-October, pp. 443-448 (SJR=0,1)
7. Stoyanova D.S., Ivanova I.A., Angelov O.I. and Vladkova T.G. (2017) Antibacterial activity of thin films TiO<sub>2</sub> doped with Ag and Cu on Gracilicutes and Firmicutes bacteria. BioDiscovery **BioDiscovery**, 20 (2017), Article e21596 (цитирана от статии в списания с IF=1.23 и IF=2.399)



### Цитирания на научни публикации:

1. **Angelov O., Stoyanova D., Ivanova, I. and Todorova, S. (2016) Antimicrobial effect of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Ag and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Ag thin films on *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*, INERA Conference “Vapor Phase Technologies for Metal Oxide and Carbon Nanostructures”, Velingrad, 5-9.07.2016, Journal of Physics: Conference series; 764 (2016) 012015 doi:10.1088/1742-6596/764/1/012015 [Q3; SJR=0,24]**

#### Cyted by:

Santos JS, A. Rodrigues, AP. Simon, CH. Ferreira, VA. Q. Santos, MS. Sikora, NC. Cruz, GP. Mambrini, F.Trivinho-Strixino. One-Step Synthesis of Antibacterial Coatings by Plasma Electrolytic Oxidation of Aluminum <https://doi.org/10.1002/adem.201900119>

2. **Stoyanova D.S., Ivanova I.A., Staneva A., Albu-Kaya M. and Vladkova TG. (2016) Antifungal potential of some collagen-based Nanocomposites Against *Candida lusitanae*. SOJ | Nanoscience & Technology | Open Access <http://symbiosisonlinepublishing.com/nanoscience-technology/nanoscience-technology38.php>**

#### Cyted by:

AL-Janabi AAHS., Bashi AM. Development of a new synthetic xerogel nanoparticles of silver and zinc oxide against causative agents of Dermatophytoses Journal of Dermatological Treatment July 2018 DOI10.1080/09546634.2018.1506079 (2017 Impact Factor. 2.144).

3. **Stoyanova D.S., Ivanova I.A., Angelov O.I. and Vladkova T.G. (2017) Antibacterial activity of thin films TiO<sub>2</sub> doped with Ag and Cu on Gracilicutes and Firmicutes bacteria. BioDiscovery, 20 (2017), Article e21596**

#### Cyted by:

- Javid A., Kumar M., Ashraf M., Lee J.H., Han J.G. (2019), Photocatalytic antibacterial study of N-doped TiO<sub>2</sub> thin films synthesized by ICP assisted plasma sputtering method. Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures. 106, 187-193. (IF=3.176)
- Lin Z, Wu S, X Liu, S Qian, PK Chu, Y Zheng, K.M.C. Cheung, Y. Zhao, K.W.K. Yeung (2019), A surface-engineered multifunctional TiO<sub>2</sub> based nano-layer simultaneously elevates the corrosion resistance, osteoconductivity and antimicrobial property of a magnesium alloy - Acta biomaterialia, 2019, 99, 495-513 (IF=6.836) <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.09.008>
- Tomaszewski M, Cema G., S.Ciesielski, D.Łukowiec, A.Ziemińska-Buczyńska. (2019), Cold anammox process and reduced graphene oxide - Varieties of effects during long-term interaction. Water Research, 71-81. (IF=7.916)
- Pereira-Silva P., Costa-Barbosa A, Costa D, Rodrigues MS., Carvalho P, Borges J, Vaz F, Paula Sampaio. (2019), Antifungal activity of ZnO thin films prepared by glancing angle deposition Thin Solid Films, 687, 2019, 137461 (IF=1.888)

## УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

### НАЦИОНАЛНИ:

1. Въведение в научните изследвания (Биологически науки) – 28.03.2016-13.04.2016, ИБЕИ, БАН

2. SEMINAR OF ECOLOGY – 2016 *with International participation* 21-22 Април 2016, София, България – Презентация с доклад- Stoyanova D., H. Manolov, Angelov O., Ivanova, I. (2016) Antimicrobial Effect of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Ag, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Ag thin films on Escherichia coli. *Seminar of Ecology*

3. МЛАДЕЖКА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ *КЛИМЕНТОВИ ДНИ* 17-18 Ноември 2016 – два бр. постери:

А. Stoyanova D.S., Ivanova I.A., Staneva A., Alby-Kaya M., Vladkova T.G. "Antifungal potential of some collagen-based nanocomposites against *Candida lusitanae*"

Б. Ivanov N., D. Stoyanova, A. Nikolova, A. Hristova, S. Yaneva, M.Borisova, S.Galabova, T. Vladkova, I. Ivanova, A. Kostadinova "Interaction between bacteria, keratinocytes cell line and RGO, Ag-RGO collagen nanocomposites"

4. МЛАДЕЖКА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ „КЛИМЕНТОВИ ДНИ” 2017, София – 16-17 Ноември 2017 – с два постера:

А. Kutsova Y.A., Andreeva M.M., Stoyanova D.S., Angelov O.I., Ivanova I.A. "ANTIBACTERIAL EFFECT OF THIN NANOSTRUCTURED FILM"

Б. Nesheva A., R. Veleva, J. Dumanov, A. Kostadinova, D. Stoyanova, I. Ivanova, D. Monyakova, D. Djilianov „Modulating of nanocomposites thin films for medical application"

5. Научен Семинар, БФ – 18.01.2018 – Презентация с доклад „Антимикробна активност на наноструктурни материали"

### МЕЖДУНАРОДНИ:

1. INERA CONFERENCE – Vapor Phase Technologies for Metal Oxide and Carbon Nanostructures 6-8 Юли 2016, Велинград, България – 2 бр. постери

- a. Angelov O., Stoyanova D., Ivanova, I. and Todorova, S. (2016) “Antimicrobial effect of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Ag and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Ag thin films on *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*”
  - b. Angelov O., Stoyanova D., Ivanova, I. (2016) “Antimicrobial effect of TiO<sub>2</sub> doped with Ag and Cu on *E. coli* and *P.putida* – Best poster prize”
2. D. S. Stoyanova, I. A. Ivanova, Antibacterial Effect of Some Chemical Prepared Nanocomposites Against Salmonella sp. ПЪРВА НАЦИОНАЛНА КОНФЕРЕНЦИЯ ЗА ДОКТОРАНТИ 01 Ноември 2016, Пловдив, България доклад.
  3. I. A. Ivanova\*, D. S. Stoyanova, O. Angelov, T. G. Vladkova “ Bacteriostatic effect of TiO<sub>2</sub> doped with Ag and Cu on Gram negative bacteria in presence of light” International „Surfaces, Coatings & Interfaces” Conference SURFCOAT KOREA 2017 March 29<sup>th</sup>-31<sup>st</sup> , 2017 Songdo Convensia, Incheon, Korea, постер.
  4. Dragomira S. Stoyanova\*, Iliana I. Atanasova, Orlin I. Angelov, Todorka Vladkova – “Antibacterial activity of thin films TiO<sub>2</sub> doped with Ag and Cu on Gram negative and Firmicutes bacteria” World BioDiscovery Congress – 17-19 July, Sofia, Bulgaria. Topic– Nanobiotechnology, доклад.
  5. Dragomira S. Stoyanova\*– Introduction of background, current project and research interest. - iPROMEDAI Young Scientist Forum 2017 – Interactive discussion session for Early Stage Researcher in the field of Advanced Antimicrobial Biomaterials – 17&18 September 2017 Thessaloniki, Greece, доклад.
  6. Dragomira S. Stoyanova\*, Iliana I. Ivanova, Orlin I. Angelov, Todorka G. Vladkova “Study of antibacterial effect of nanostructured thin films TiO<sub>2</sub>:SiO<sub>2</sub>:Ag against *E.coli* and *P.putida*”– NANOCON 2017 – 9<sup>th</sup> International Conference on Nanomaterials – Research & Application – 18-20 October 2017, Czech Republic - Brno – доклад.
  7. Мобилност по Програма Еразъм + 30.01.2018 – 26.06.2018 Университет Намюр, Белгия- Изучаване на молекулни механизми за устойчивост на моделни щамове *E.coli* към мед и сребро.
  8. D.S. Stoyanova\*, I.A.Ivanova, O.I.Angelov, T.G.Vladkova “Promising Antibacterial Coating for Medical Devices” European Network of Multidisciplinary Research to

Improve the Urinary Stents. Training School. University of Oxford, UK, 11 & 12 September 2018, постер.

9. D.Stoyanova\*, I. Ivanova „Copper and silver in synergism against industrial *E. coli* strain”, XIV Конгрес на микробиолозите в България с международно участие 10 – 13 Октомври 2018, постер.
10. Yulia Kutsova\*, D.Stoyanova, Manoela Andreeva, I. Ivanova. Influence of thin nanostructured films on the development of *Escherichia coli*. XIV Конгрес на микробиолозите в България с международно участие 10 – 13 Октомври. Постер.
11. Ivanova I, Stoyanova D, Angelov O, Vladkova T\*. (2018) Strong antibacterial effect of Ag/Cu doped TiO<sub>2</sub> thin films on E.coli. International Conference on Biological and Biomimetics Adhesive (ICBBA 2018) Haifa, Izrael, постер.
12. Vladkova TG\*, Angelov O, Stoyanova D.S., Gospodinova D, Mergulhão FJ, Ivanova I, (2019) MAGNETRON CO-SPUTTERED TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub>/Ag THIN COATINGS INHIBITING BACTERIAL ADHESION AND BIOFILM FORMATION Material science and Nanotechnology, July, 22-23, Rome, Italy- постер.

#### УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ

- 1 Проект № 80-10-12/12.04.2017 - ФНИ при СУ „Св. Климент Охридски” в подкрепа на докторант – „Antimicrobial activity of nanomaterials”
- 2 Проект № 80-10-224/04.05.2018 - ФНИ при СУ „Св. Климент Охридски” в подкрепа на докторант – „Ecotoxicological evaluation of metal oxides thin films with clinical significance and natural isolates”
- 3 Проект с национално съфинансиране COST Action TD 1305 "Improved protection of medical devices against infections" 2015-2018.
- 4 Проект с национално съфинансиране COST Action CA 16217 European network for interdisciplinary research to improve urinary stents (ENIUS) 2016-2019.