



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Nauk o Zwierzętach

Magdalena Kot

**Ocena *in vitro* przeciwdrobnoustrojowych
właściwości nanomateriałów w profilaktyce
mastitis oraz kulawizn na tle zakażeń
bakteryjno - grzybiczych**

In vitro evaluation of the antimicrobial properties of
nanomaterials in the prevention of *mastitis* and lameness caused
by bacterial and fungal infections

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Marcina Gołębiowskiego
Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt, Instytut Nauk o Zwierzętach

Promotor pomocniczy:
Dr inż. Aleksandra Kalińska
Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt, Instytut Nauk o Zwierzętach

Warszawa, 2026

**Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej
przygotowanej przez doktoranta Szkoły Doktorskiej SGGW**

Oświadczam, że **rozprawa doktorska autorstwa Magdaleny Kot została przygotowana pod moim kierunkiem na podstawie badań realizowanych w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej SGGW** i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data

21.05.2026r.

Czytelny podpis promotora

Gołębiewski

**Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej
będącego doktorantem Szkoły Doktorskiej SGGW**

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że **niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przeze mnie samodzielnie na podstawie badań realizowanych w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej SGGW** i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data

21.05.2026r.

Czytelny podpis autora rozprawy

Magdalena Kot

Spis treści

Streszczenie	6
Summary	12
Wykaz stosowanych skrótów	18
Wykaz publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej	19
1. Wstęp	20
1.1 Aktualne problemy w hodowli bydła mlecznego	20
1.2 Kulawizny jako istotny problem zdrowotny bydła mlecznego	21
1.3 <i>Mastitis</i> jako jedno z najważniejszych schorzeń bydła mlecznego	22
1.4 Konwencjonalne leczenie i jego ograniczenia	25
1.5 Nanotechnologia jako alternatywa dla konwencjonalnych metod leczenia	28
2. Hipotezy badawcze, cel i zakres pracy	30
3. Finansowanie	32
4. Materiały i metody	33
4.1. Materiał badawczy	33
4.1.1 Nanocząstki	33
4.1.2 Materiał biologiczny	33
4.2. Metody badawcze	34
4.3 Doświadczenie 1	36
4.4 Doświadczenie 2	37
4.5 Doświadczenie 3 i 4	40
5. Wyniki	43
5.1 Doświadczenie 1	43
5.2 Doświadczenie 2	46
5.3 Doświadczenie 3	51
5.4 Doświadczenie 4	56
6. Podsumowanie i wnioski	62
6.1 Doświadczenie 1	62
6.2 Doświadczenie 2	62
6.3 Doświadczenie 3	63
6.4 Doświadczenie 4	64
7. Bibliografia	65
8. Zbiór publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej oraz oświadczenia współautorów publikacji	72

Streszczenie

Wyniki badań opublikowano w postaci 4 prac badawczych. Celem przeprowadzonych badań *in vitro*, była ocena potencjału przeciwdrobnoustrojowego nanocząstek metali (NPs) w zapobieganiu kulawizn oraz zapaleniu wymienia (*mastitis*) krów mlecznych. Potrzeba przeprowadzenia badań wynika z ograniczonej skuteczności obecnych metod leczenia chorób zakaźnych u bydła oraz rosnącej oporności drobnoustrojów na antybiotyki. Zarówno kulawizny jak i *mastitis* są chorobami o dużym znaczeniu ekonomicznym i zdrowotnym, a ich leczenie jest utrudnione ze względu na złożoną etiologię oraz obecność patogenów opornych na standardowe terapie. W związku z tym zasadniczym celem badawczym było ustalenie, czy NPs metali - także te stosowane w formie kompleksów wykazujących potencjalny efekt synergistyczny - mogą skutecznie ograniczać przeżywalność patogenów indukujących te dwa schorzenia, jednocześnie pozostawać bezpieczne w pośrednim stosowaniu przez ludzi oraz bezpośrednim stosowaniu wobec zwierząt. Badania miały więc na celu ocenę także ich potencjalnej przydatności praktycznej jako możliwa nowa strategia w profilaktyce i leczeniu chorób zakaźnych u bydła.

Powszechna oporność patogenów na leki stanowi globalne zagrożenie wpływające nie tylko na zdrowie zwierząt, ale także ludzi. Biorąc pod uwagę rosnące zapotrzebowanie na alternatywne strategie przeciwdrobnoustrojowe, w pracy przedstawiono nowatorskie podejście wykorzystujące NPs metali jako nową alternatywę profilaktyki i leczenia kulawizn oraz *mastitis*. Badania oparte były na doświadczeniach *in vitro* z wykorzystaniem patogenów wyizolowanych z racic krów ze stwierdzonymi kulawiznami oraz tych wyizolowanych z mleka ćwiartkowego pochodzącego od krów ze zdiagnozowanym zapaleniem wymienia. Z materiałów biologicznych wyizolowano 5 szczepów bakteryjnych pochodzących z owrzodzeń racic, natomiast w próbkach mleka pochodzących od krów mlecznych ze stwierdzonym subklinicznym zapaleniem wymienia wyizolowano 6 szczepów bakteryjnych, 1 gatunek algi oraz 18 szczepów grzybiczych. Łącznie wykonano 1 314 podstawowych testów *in vitro* polegających na ocenie przeżywalności wyizolowanych patogenów po zastosowaniu pojedynczych NPs metali m.in. srebra (AgNPs), złota (AuNPs), miedzi (CuNPs), żelaza (FeNPs) lub żelaza otoczkowanego węglem (FeCNPs) i platyny (PtNPs) w różnych stężeniach, oraz ich wybrane kompleksy w celu oceny ich synergistycznego działania.

Pierwsza publikacja wchodząca w dysertację doktorską określała właściwości przeciwdrobnoustrojowe NPs metali, oceniając ich potencjał aplikacyjny dla profilaktyki kulawizn u bydła. W pierwszym etapie badań przeprowadzono izolację drobnoustrojów z materiału biologicznego (tkanki, ropa) pobranego z owrzodzeń racic krów ze stwierdzonymi problemami lokomocyjnymi spowodowanymi kulawiznami. Hodowle mikroorganizmów prowadzono w warunkach tlenowych i beztlenowych, co pozwoliło na określenie szerokiego składu mikrobiologicznego próbek. Zidentyfikowano tlenowe bakterie Gram (-): *Sphingomonas paucimobilis*, *Ochrobactrum intermedium* I i II, *Ochrobactrum gallinifaecis* oraz beztlenową Gram (+) *Actinomyces odontolyticus*. Wyizolowane drobnoustroje nie były wcześniej powiązane z etiologią kulawizn, co stanowi istotny wkład w rozwój wiedzy na temat tej choroby. W kolejnym etapie przeprowadzono charakterystykę fizykochemiczną zastosowanych NPs. Określono ich morfologię, rozmiar, potencjał zeta oraz średnice hydrodynamiczną. Wykazano, że większość NPs miała kształt sferyczny a ich wielkość była zróżnicowana. Potencjał zeta był przeważnie ujemny, z wyjątkiem CuNPs i części ich kompleksów, co wskazuje na różnice w stabilności i właściwościach powierzchniowych badanych nanostruktur. Kluczową część pracy stanowiła ocena aktywności biobójczej NPs wobec wyizolowanych bakterii. Uzyskane wyniki wykazały istotne różnice w skuteczności przeciwdrobnoustrojowej w zależności od rodzaju NPs oraz ich stężenia. Najsilniejsze działanie biobójcze wykazały AgNPs oraz CuNPs, które powodowały znaczące obniżenie żywotności wszystkich badanych szczepów nawet przy niskich stężeniach. Z kolei PtNPs oraz FeNPs wykazywały bardzo słabe działanie biobójcze lub jego brak, a w niektórych przypadkach prowadziły do zjawiska hormezy, czyli zwiększenia liczby komórek bakteryjnych. Dodatkowo oceniono aktywność przeciwdrobnoustrojową nanokompozytów (AgAuNPs, AgCuNPs, AuCuNPs) tych NPs, które wykazywały najsilniejsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe, w celu oceny ich synergistycznego działania. Wszystkie kompleksy charakteryzowały się wyższą skutecznością biobójczą niż pojedyncze NPs, przy czym najsilniejsze działanie obserwowano dla kompleksu AgCuNPs, który w stężeniach 6,25 - 12,5 mg/l obniżał żywotność bakterii do 1 - 6 %. Pozostałe kompleksy również wykazywały działanie przeciwdrobnoustrojowe, jednak nieco słabsze niż AgCuNPs.

Druga publikacja dotyczyła oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych i cytotoksycznych wybranych NPs i ich kompleksów w zwalczaniu patogenów

wywołujących *mastitis* u bydła. W pracy przedstawiono wyniki kompleksowych badań obejmujących charakterystykę fizykochemiczną NPs (Ag, Au, Cu, Fe, Pt), oraz ocenę ich aktywności biologicznej wobec mikroorganizmów izolowanych z mleka krów ze stwierdzonym subklinicznym *mastitis*. Przeprowadzono także analizy mające na celu określenie ich wpływu na komórki nabłonkowe ludzkie oraz bydłęce. W pierwszym etapie określono morfologię NPs oraz ich rozmiary. Następnie scharakteryzowano ich właściwości fizykochemiczne, takie jak potencjał zeta oraz średnice hydrodynamiczne, co pozwoliło ocenić ich stabilność. Kolejnym etapem była ocena cytotoksyczności NPs i ich kompleksów wobec komórek nabłonka gruczołu mlekowego bydła (BME - UV1) oraz ludzkich komórek HMEC. Wykazano, że stosując niskie stężenia większość badanych NPs nie wykazuje toksyczności wobec bydłęcych i ludzkich linii komórkowych, jednak CuNPs oraz ich kompleksy wykazywały działanie toksyczne przy wyższych stężeniach. Stwierdzono, że cytotoksyczny wpływ NPs na komórki zależy od ich rodzaju i stężenia. W części mikrobiologicznej oceniono przeżywalność bakterii, grzybów i alg izolowanych z mleka krów z potwierdzonym subklinicznym *mastitis* (m.in. *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus sciuri*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter koseri*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* oraz *Prototheca* sp.) po zastosowaniu NPs. Najsilniejsze właściwości biobójcze wykazały AgNPs, a także w nieco mniejszym stopniu CuNPs. AuNPs charakteryzowały się umiarkowaną aktywnością, natomiast FeNPs oraz PtNPs wykazywały niskie lub brak działania przeciwdrobnoustrojowego. Istotnym elementem badań była analiza działania kompleksów NPs, gdzie wykazano efekt synergistyczny. Najsilniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe wykazał kompleks AgCuNPs, który znacząco redukował przeżywalność zarówno bakterii, jak i grzybów nawet przy niskich stężeniach. Kompleks ten wykazał silne właściwości biobójcze także wobec *Prototheca* sp. całkowicie niszcząc komórki tego mikroorganizmu przy stężeniu 12,5 mg/l. Wyniki te są szczególnie istotne, ponieważ patogen ten jest bardzo trudny lub niemożliwy do zwalczenia w stadach. Zapalenie wymienia wywołane przez *Prototheca* sp. nie ma obecnie opracowanego leczenia, dlatego uzyskane wyniki mają potencjał globalnej innowacji. Kompleks AgAuNPs również wykazywał wysoką skuteczność przeciwdrobnoustrojową, natomiast AuCuNPs był najmniej efektywny.

W trzeciej publikacji przeprowadzono badania dotyczące oceny właściwości przeciugrzybiczych NPs jako potencjalnej alternatywy dla tradycyjnych metod leczenia

zapalenia wymienia. Przeprowadzone badania obejmowały zarówno analizę właściwości fizykochemicznych NPs, jak i ich aktywności biologicznej wobec wybranych szczepów grzybiczych. W pierwszym etapie przeprowadzono izolację i identyfikację drobnoustrojów z próbek mleka od krów u których stwierdzono subkliniczne zapalenie wymienia. W próbkach zidentyfikowano sześć gatunków: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Diutina rugosa*, *Diutina rugosa* var. *rugosa* oraz *Diutina catenulata*. Następnie określono charakterystykę NPs: AgNPs, AuNPs, CuNPs, PtNPs oraz FeCNPs. Wynikiem przeprowadzonych analiz było określenie morfologii, średnicy hydrodynamicznej oraz potencjału zeta. Wykazano, że większość NPs miała kulisty kształt i podobne rozmiary, natomiast obserwowano także obecność agregatów o większych rozmiarach. Głównym celem badań była ocena aktywności przeciwgrzybiczej NPs wobec komórek grzybiczych a uzyskane wyniki wykazały wyraźne różnice we wrażliwości pomiędzy gatunkami grzybów. Najbardziej opornym gatunkiem na działanie NPs była *C. glabrata*, natomiast najbardziej wrażliwa była *D. catenulata*. Spośród pojedynczych NPs najsilniejsze działanie grzybobójcze wykazały AgNPs, które znacząco obniżały przeżywalność większości szczepów niezależnie od zastosowanego stężenia. Nieco słabsze efekty dały CuNPs, jednak ich aktywność była nadal wysoka. Z kolei AuNPs wykazały słabsze działanie, a ich skuteczność skorelowana była z zastosowanym stężeniem. Najśłabsze efekty uzyskano dla PtNPs i FeCNPs, które wykazywały niewielkie lub brak działania grzybobójczego. Stosując kompleksy NPs (AgCu, AgAu, AuCu), zaobserwowano synergistyczne działanie, szczególnie w przypadku AgCuNPs, który redukował przeżywalność większości badanych grzybów nawet o 97 % przy najwyższych stężeniach. AgAuNPs również był skuteczny, natomiast AuCuNPs wykazywał najśłabsze działanie spośród badanych kompleksów. Dodatkowo oceniono wrażliwość badanych grzybów na standardowe leki przeciwgrzybicze metodą dyfuzyjno - krążkową. Wyniki wykazały zróżnicowaną skuteczność leków a w niektórych przypadkach nawet oporność niektórych szczepów na ich działanie.

W czwartej publikacji przedstawiono wyniki oceniające biobójczy potencjał nanomateriałów w kontekście potencjalnego zwalczania grzybiczego zapalenia wymienia u krów, przy czym badania przeprowadzono na szczepach grzybów izolowanych z mleka krów z subklinicznym *mastitis*. W wyniku identyfikacji mikroorganizmów z materiału biologicznego zidentyfikowano 7 rzadziej opisywanych w literaturze gatunków grzybów, takich jak *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamiella pararugosa*, *Saccharomyces cerevisiae*,

Cutaneotrichosporon mucoides, *Wickerhamomyces anomalus*, *Coniochaeta hoffmannii* oraz *Kluyveromyces marxianus*. Następnie przeprowadzono analizy obejmujące charakterystykę fizykochemiczną zastosowanych NPs (Ag, Au, Cu, Pt oraz FeC), jak i ocenę ich aktywności przeciwgrzybiczej w różnych stężeniach oraz w formie kompleksów (AgCu, AgAu, AuCu NPs). W pracy oznaczono także wrażliwości szczepów na standardowe leki przeciwgrzybicze metodą dyfuzyjno - krążkową. Wyniki wykazały, że przeciwgrzybicza aktywność NPs była skorelowana z ich rodzajem, stężeniem oraz zależała od gatunku mikroorganizmu poddanemu doświadczeniu. Pojedyncze NPs charakteryzowały się niższą skutecznością grzybobójczą, przy czym kolejność aktywności NPs od najwyższej do najniższej była następująca: Ag, Cu, Au, FeC i Pt. PtNPs wykazały niemal brak działania biobójczego, natomiast FeCNPs były skuteczne jedynie wobec wybranych szczepów. Najwyższą skuteczność przeciwdrobnoustrojową wykazywały kompleksy NPs, szczególnie AgCu, który wykazywał najsilniejsze właściwości biobójcze wobec wszystkich analizowanych szczepów, równolegle wykazano zróżnicowaną skuteczność standardowych leków przeciwgrzybiczych.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały, że NPs metali, szczególnie AgNPs charakteryzują się silnymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi, obejmującymi zarówno działanie przeciwbakteryjne wobec patogenów indukujących kulawizny, *mastitis*, jak i przeciwgrzybicze wobec gatunków drożdżaków wywołujących zapalenie wymienia u bydła - także wobec tych względnie opornych na standardowe leki przeciwgrzybicze. Najwyższą skuteczność przeciwdrobnoustrojową obserwowano dla nanokompozytów AgCuNPs, które przy odpowiednich stężeniach wykazują jednocześnie niską toksyczność wobec komórek nabłonka gruczołu mlekowego bydła (BME - UV1) oraz ludzkich komórek HMEC. Uzyskane wyniki *in vitro* wskazują na duży potencjał aplikacyjny tych materiałów jako alternatywy dla antybiotyków w leczeniu i profilaktyce chorób zakaźnych u bydła, oferując jednocześnie nowe podejście do problemu o charakterze globalnym, jakim jest rosnąca oporność drobnoustrojów. Przeprowadzone badania wnoszą istotny wkład w rozwój wiedzy dotyczącej chorób o podłożu mikrobiologicznym, akcentując znaczenie NPs jako potencjalnej, alternatywnej strategii terapii. Uzyskane wyniki stanowią solidną podstawę do dalszych badań *in vivo*, które pozwolą ocenić możliwości klinicznego wykorzystania tych materiałów w terapii zapalenia wymienia i kulawizny u bydła. Zastosowanie tych rozwiązań w praktyce

hodowlanej ma szansę funkcjonować szeroką skalę, jednak warunkiem ich wdrożenia pozostaje potwierdzenie skuteczności i bezpieczeństwa działania NPs w praktyce.

Słowa kluczowe: nanotechnologia, zapalenie wymienia, kulawizny, mikroorganizmy, lekooporność.

Summary

The findings of the present study were disseminated in the form of four research articles. The primary objective of the conducted *in vitro* investigations was to evaluate the antimicrobial efficacy of metal nanoparticles (NPs) in the context of prophylaxis against lameness and bovine *mastitis* in dairy cattle. The rationale for undertaking this research was grounded in the documented limitations of currently employed therapeutic modalities for infectious diseases in cattle, compounded by the progressive emergence of antimicrobial resistance among relevant pathogens. Both lameness and *mastitis* represent conditions of substantial economic and veterinary significance, the clinical management of which is particularly challenging due to their multifactorial etiology and the widespread prevalence of pathogens refractory to conventional antimicrobial therapies. Accordingly, the principal research objective was to determine whether metal NPs - including those formulated as multicomponent complexes with potential synergistic antimicrobial activity - are capable of effectively reducing the viability of etiological agents responsible for the aforementioned conditions, while concurrently demonstrating an acceptable safety profile with respect to both indirect human exposure and direct administration in *in vivo* animal subjects. In this regard, the investigations were further designed to assess the prospective practical applicability of such formulations as a novel prophylactic and therapeutic strategy for the management of infectious diseases in dairy cattle.

The widespread antimicrobial resistance of pathogenic microorganisms poses a global threat to both animal and public health. In view of the growing demand for alternative antimicrobial strategies, this dissertation introduces an innovative approach that applies metal NPs as a prospective alternative for the prophylaxis and treatment of lameness and bovine *mastitis*. The investigations were conducted on the basis of *in vitro* experiments using pathogens isolated from the hooves of cattle diagnosed with lameness, as well as from quarter milk samples obtained from cows diagnosed with *mastitis*. From the collected biological materials, five bacterial strains were isolated from hoof lesions, whereas microbiological analysis of milk samples derived from dairy cows with subclinical *mastitis* yielded six bacterial strains, one algal species, and eighteen fungal strains. In total, 1,314 primary *in vitro* tests were performed to evaluate the viability of the isolated pathogens following exposure to individual metal NPs - including silver (AgNPs), gold (AuNPs), copper (CuNPs), iron (FeNPs), carbon-coated iron (FeCNPs),

and platinum (PtNPs) - administered at varying concentrations, as well as to selected NP complexes, with the aim of assessing their potential synergistic antimicrobial activity.

The first publication comprised within the present doctoral dissertation investigated the antimicrobial properties of metal NPs, evaluating their potential applicability in the prophylaxis of lameness in cattle. In the initial phase of the study, microorganisms were isolated from biological material - specifically tissue specimens and purulent exudate - collected from hoof lesions of cattle presenting locomotor disorders associated with lameness. Microbial cultures were conducted under both aerobic and anaerobic conditions, thereby enabling the establishment of a comprehensive microbiological profile of the examined samples. The following aerobic Gram (-) bacterial species were identified: *Sphingomonas paucimobilis*, *Ochrobactrum intermedium* I and II, and *Ochrobactrum gallinifaecis*, as well as the anaerobic Gram (+) bacterium *Actinomyces odontolyticus*. The isolated microorganisms had not previously been implicated in the etiology of lameness, thereby constituting a significant contribution to advancing scientific knowledge of this condition. In the subsequent phase, comprehensive physicochemical characterization of the applied NPs was performed, including determination of morphology, particle size, zeta potential, and hydrodynamic diameter. It was demonstrated that the majority of the investigated NPs exhibited a spherical morphology, although considerable variability in particle size was observed across the examined preparations. The zeta potential was predominantly negative, except for CuNPs and selected complexes thereof, indicating substantial differences in colloidal stability and surface properties among the investigated nanostructures. A key component of the study was the systematic evaluation of the biocidal activity of the NPs against the isolated bacterial strains. The obtained results revealed significant differences in antimicrobial efficacy as a function of both the type and concentration of the applied NPs. The most pronounced biocidal effects were recorded for AgNPs and CuNPs, which induced a substantial reduction in bacterial viability across all investigated strains, even at relatively low concentrations. Conversely, PtNPs and FeNPs exhibited negligible or none biocidal activity and, in certain instances, elicited a hormetic response, manifested as a paradoxical increase in bacterial cell count. Furthermore, the antimicrobial activity of nanocomposites - specifically AgAuNPs, AgCuNPs, and AuCuNPs - composed of NPs demonstrating the most potent individual antimicrobial properties, was evaluated with the aim of assessing potential synergistic interactions. All examined complexes demonstrated

superior biocidal efficacy relative to their constituent individual NPs. The most potent antimicrobial activity was observed with the AgCuNPs complex, which, at concentrations ranging from 6.25 to 12.5 mg/L, reduced bacterial viability to 1 - 6 %. The remaining complexes likewise exhibited considerable antimicrobial activity, albeit slightly lower than that of AgCuNPs.

The second publication focused on evaluating the antimicrobial and cytotoxic properties of selected NPs and their complexes for combating pathogens responsible for bovine *mastitis*. The study presented the results of comprehensive investigations encompassing the physicochemical characterization of NPs (Ag, Au, Cu, Fe, and Pt), as well as the assessment of their biological activity against microorganisms isolated from the milk of cows diagnosed with subclinical *mastitis*. Furthermore, analyses were conducted to determine the effects of the investigated NPs on both human and bovine epithelial cells. In the initial phase of the study, the morphology and particle size of the NPs were determined, followed by characterization of their physicochemical properties, including zeta potential and hydrodynamic diameter, to evaluate their colloidal stability. The subsequent phase encompassed the assessment of the cytotoxicity of the NPs and their complexes toward bovine mammary epithelial cells (BME-UV1) and human HMEC cells. The results demonstrated that, at low concentrations, the majority of the investigated NPs exhibited none cytotoxic effects toward either bovine or human cell lines; however, CuNPs and their complexes displayed toxic effects at elevated concentrations. It was established that the cytotoxicity of the NPs on cellular viability depended on both the type and concentration of the applied nanostructures. In the microbiological component of the study, the viability of bacteria, fungi, and algae isolated from the milk of cows with confirmed subclinical *mastitis* - including *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus sciuri*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter koseri*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, and *Prototheca* sp. - was evaluated following NP treatment. AgNPs demonstrated the most pronounced biocidal properties, while CuNPs also exhibited substantial antimicrobial activity, albeit to a slightly lesser extent. AuNPs were characterized by moderate antimicrobial activity, whereas FeNPs and PtNPs displayed negligible or no measurable antimicrobial effects. A particularly important component of the study was the analysis of the antimicrobial activity of NP complexes, which demonstrated synergistic interactions. The AgCuNPs complex exhibited the most potent antimicrobial activity, significantly reducing the

viability of both bacterial and fungal isolates even at low concentrations. This complex also demonstrated potent biocidal activity against *Prototheca* sp., achieving complete elimination at a concentration of 12.5 mg/L. These findings are of particular scientific significance, given that this pathogen is notoriously difficult - and in many cases impossible - to eradicate from dairy herds. To this date, no effective therapeutic protocol has been established for *mastitis* caused by *Prototheca* sp.; consequently, the obtained results may represent a globally innovative contribution to the development of novel therapeutic strategies. The AgAuNPs complex likewise demonstrated high antimicrobial efficacy, whereas AuCuNPs were the least effective among the evaluated formulations.

The third publication presented investigations evaluating the antifungal properties of metal NPs as a prospective alternative to conventional therapeutic modalities for the management of bovine *mastitis*. The conducted studies encompassed both the analysis of the physicochemical properties of the NPs and the assessment of their biological activity against selected fungal strains. In the initial phase of the study, microorganisms were isolated and identified from milk samples collected from cows diagnosed with subclinical *mastitis*. Six fungal species were identified: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Diutina rugosa*, *Diutina rugosa* var. *rugosa*, and *Diutina catenulata*. Subsequently, the physicochemical characteristics of AgNPs, AuNPs, CuNPs, PtNPs, and FeCNPs were determined. The performed analyses enabled the comprehensive characterization of their morphology, hydrodynamic diameter, and zeta potential. It was demonstrated that the majority of the investigated NPs exhibited a spherical morphology with comparable particle sizes, although the presence of larger aggregates was also noted. The primary objective of the study was to evaluate the antifungal activity of the NPs against fungal cells, and the obtained results revealed distinct interspecies differences in susceptibility to NP treatment. *C. glabrata* was identified as the most resistant species, whereas *D. catenulata* demonstrated the highest susceptibility. Among the individual NPs, AgNPs exhibited the most pronounced fungicidal activity, significantly reducing the viability of the majority of the investigated strains at all concentrations. CuNPs produced slightly attenuated effects; however, their antifungal activity remained considerable. Conversely, AuNPs demonstrated markedly weaker activity, with their efficacy exhibiting a concentration-dependent relationship. The least pronounced effects were recorded for PtNPs and FeCNPs, which displayed negligible or no measurable fungicidal activity. The application of NP complexes -

specifically AgCuNPs, AgAuNPs, and AuCuNPs - resulted in synergistic antifungal effects, most notably in the case of AgCuNPs, which reduced the viability of the majority of the investigated fungal strains up to 97 % at the highest applied NP concentrations. AgAuNPs likewise demonstrated considerable antifungal efficacy, whereas AuCuNPs exhibited the weakest activity among the evaluated complexes. Furthermore, the susceptibility of the investigated fungal strains to standard antifungal agents was assessed employing the disk diffusion method. The results revealed considerable variability in drug efficacy and, in certain instances, documented resistance of specific strains to conventional antifungal treatment.

The fourth publication presented the results of investigations evaluating the biocidal potential of nanomaterials for prospective control of fungal mastitis in dairy cattle, with studies conducted on fungal strains isolated from the milk of cows with confirmed subclinical *mastitis*. Microbiological identification of the isolated organisms from the collected biological material yielded seven fungal species, infrequently documented in the scientific literature: *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamiella pararugosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cutaneotrichosporon mucoides*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Coniochaeta hoffmannii*, and *Kluyveromyces marxianus*. Subsequently, analyses were performed encompassing the comprehensive physicochemical characterization of the applied NPs (Ag, Au, Cu, Pt, and FeC), as well as the evaluation of their antifungal activity at varying concentrations and in the form of binary complexes (AgCuNPs, AgAuNPs, and AuCuNPs). The susceptibility of the investigated strains to standard antifungal agents was additionally determined employing the disk diffusion method. The results demonstrated that the antifungal activity of the NPs depended on both their type and concentration and was further influenced by the fungal species under investigation. Individual NPs exhibited comparatively lower fungicidal efficacy, with the following descending order of antimicrobial activity: Ag, Cu, Au, FeC, and Pt. PtNPs demonstrated negligible biocidal activity, whereas FeCNPs were effective exclusively against selected strains. The highest antifungal efficacy was observed with NP complexes, particularly AgCuNPs, which showed the most pronounced biocidal activity against all investigated fungal strains. Concurrently, considerable variability in the efficacy of standard antifungal agents was demonstrated across the examined strains.

In summary, the conducted investigations demonstrated that metal NPs, particularly AgNPs, exhibit potent antimicrobial properties, including antibacterial

activity against pathogens that induce lameness and bovine *mastitis*, as well as antifungal activity against yeast species causative of bovine *mastitis*, including those exhibiting relative resistance to standard antifungal agents. The highest antimicrobial efficacy was observed with AgCuNP nanocomposites, which, at appropriate concentrations, demonstrated low cytotoxicity toward bovine mammary epithelial cells (BME-UV1) and human HMEC cells. The *in vitro* results indicate considerable application potential for these nanomaterials as a prospective alternative to conventional antibiotic therapy for the treatment and prophylaxis of infectious diseases in cattle, while simultaneously offering a novel approach to addressing the global challenge of progressive microbial resistance to antimicrobial agents. The conducted studies constitute a significant contribution to advancing scientific knowledge of microbiologically mediated diseases, underscoring the potential of metal NPs as a viable therapeutic strategy. The results provide a substantive foundation for the design and execution of subsequent *in vivo* studies, which will facilitate the assessment of the clinical applicability of these nanomaterials for the treatment of *mastitis* and lameness in cattle. The implementation of such solutions in livestock practice holds considerable potential for wide-scale adoption; however, their practical application remains contingent upon the unequivocal confirmation of both the efficacy and biosafety of NPs.

Keywords: nanotechnology, udder inflammation, lameness, microorganisms, antimicrobial resistance.

Wykaz stosowanych skrótów

NPs - nanocząstki;

AgNPs - nanocząstki srebra;

AuNPs - nanocząstki złota;

CuNPs - nanocząstki miedzi;

FeNPs - nanocząstki żelaza;

FeCNPs - nanocząstki żelaza otoczkowane węglem;

PtNPs - nanocząstki platyny;

LKS - liczba komórek somatycznych;

CTM10 - klotrimazol 10 µg;

KCA10 - ketokonazol 10 µg;

FCN25 - flukonazol 25 µg;

FCN10 - flukonazol 10 µg;

AMB20 - amfoterycyna B 20 µg;

NY100 - nystatyna 100 µg;

ECN10 - ekonazol 10 µg;

FY1 - flucytozyna 1 µg.

Wykaz publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej

Rozprawę doktorską pt. „Ocena *in vitro* przeciwdrobnoustrojowych właściwości nanomateriałów w profilaktyce *mastitis* oraz kulawizn na tle zakażeń bakteryjno - grzybiczych” stanowi zbiór czterech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych:

P1. Kot, M.; Kalińska, A.; Jaworski, S.; Wierzbicki, M.; Smulski, S.; Gołębiewski, M. *In Vitro* Studies of Nanoparticles as a Potentially New Antimicrobial Agent for the Prevention and Treatment of Lameness and Digital Dermatitis in Cattle. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 6146.

IF= 4,9; 140 pkt.

P2. Wierzbicki M, Kot M, Lange A, Kalińska A, Gołębiewski M, Jaworski S. Evaluation of the Antimicrobial, Cytotoxic, and Physical Properties of Selected Nano - Complexes in Bovine Udder Inflammatory Pathogen Control. *Nanotechnol Sci Appl.* 2024, 17, 77 - 94.

IF= 2,4; 200 pkt.

P3. Kot, M.; Lange, A.; Jabłońska, W.; Kalińska, A.; Nasiłowska, B.; Skrzeczanowski, W.; Gołębiewski, M. Nanoparticles as New Antifungals in the Prevention of Bovine Mycotic *Mastitis* Caused by *Candida* spp. and *Diutina* spp. - *In Vitro* Studies. *Molecules* 2025, 30, 2086.

IF= 4,6; 140 pkt.

P4. Kot, M.; Jabłońska, W.M.; Lange, A.; Kalińska, A.; Gołębiewski, M. Nanomaterials in the Management of Fungal Udder Inflammation in Cattle as an Effective Preventive Strategy Based on *In Vitro* Studies. *Biology* 2026, 15, 412.

IF= 3,5; 100 pkt.

Łączny Impact Factor czterech publikacji stanowiących rozprawę doktorską wynosi **IF = 15,4 i 580 pkt.** wg. punktacji Ministra Nauki. Punktacja jest zgodna z aktualnym wykazem Journal Citation Reports i listą Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na dzień ich opublikowania.

1. Wstęp

1.1 Aktualne problemy w hodowli bydła mlecznego

Współczesna produkcja zwierzęca - w tym produkcja mleka - funkcjonuje obecnie w warunkach wyraźnie różniących się od tych, które funkcjonowały jeszcze kilkanaście lat temu. W ciągu ostatnich lat nastąpiły istotne zmiany w organizacji produkcji zwierzęcej, a stale rosnące zapotrzebowanie na produkty pochodzenia zwierzęcego wymusiło działania ukierunkowane na zwiększanie wydajności produkcyjnej (Steinfeld, 2004). W praktyce oznacza to konieczność utrzymywania wysokiej efektywności produkcji przy jednoczesnym zachowaniu zdrowia, dobrostanu oraz użytkowości zwierząt.

Intensyfikacja produkcji mleka wiąże się jednak z wieloma wyzwaniami którym należy sprostać. W warunkach wysokiej wydajności szczególnie kłopotliwe stają się choroby produkcyjne zwierząt, których skutki nie ograniczają się wyłącznie do pogorszenia stanu zdrowia. Ich konsekwencje obejmują także obniżenie wydajności mlecznej, pogorszenie dobrostanu oraz wzrost kosztów utrzymania i leczenia stada (Ndou i wsp., 2011). Zaburzenia zdrowotne występujące w stadach bydła mlecznego mają charakter wielowymiarowy. Z jednej strony wpływają bezpośrednio na kondycję, dobrostan zwierząt i ich zdolność do produkcji mleka, z drugiej oddziałują na ekonomikę gospodarstwa. Z tego względu zdrowotność bydła mlecznego należy rozpatrywać nie tylko jako zagadnienie weterynaryjne, lecz także jako jeden z kluczowych elementów warunkujących prawidłowe funkcjonowanie nowoczesnych gospodarstw mlecznych (Halasa i wsp., 2007). Szczególne znaczenie mają schorzenia występujące często i powtarzalnie, wymagające ciągłych interwencji. Do tej grupy chorób należą przede wszystkim choroby kończyn prowadzące do kulawizn oraz zapalenia wymienia (*mastitis*) (Fogsgaard i wsp., 2012; Ito i wsp., 2010). Kulawizny oraz *mastitis* należą do najczęściej występujących problemów zdrowotnych w stadach bydła mlecznego i są to jedne z najbardziej kosztownych schorzeń (Miglior i wsp., 2017; Fogsgaard i wsp., 2012). Problemy zdrowotne bydła mlecznego mogą mieć znaczenie nie tylko dla samych zwierząt i ekonomiki produkcji, lecz także dla zdrowia publicznego ze względu na konieczność stosowania środków terapeutycznych. Dotyczy to zwłaszcza narastającej oporności patogenów na środki przeciwdrobnoustrojowe, która stanowi obecnie jedno z istotnych wyzwań zarówno w medycynie weterynaryjnej, jak i w ochronie zdrowia ludzi (Levy & Marshall, 2004).

1.2 Kulawizny jako istotny problem zdrowotny bydła mlecznego

Kulawizny należą do jednych z najczęściej występujących problemów zdrowotnych w stadach bydła mlecznego. Ich występowanie wiąże się z miejscowym procesem chorobowym w obrębie kończyn jak również z pogorszeniem dobrostanu oraz ograniczeniem wydajności użytkowej zwierząt. Z tego względu kulawizny należy rozpatrywać jako problem o znaczeniu zdrowotnym, produkcyjnym i ekonomicznym (Fleischer i wsp., 2001).

W stadach bydła występuje kilka rodzajów kulawizn, które mogą mieć różne przyczyny. Jednym z istotnych czynników etiologicznych są bakterie, które mogą spowodować poważne infekcje skutkując powstaniem ropni i wrzodów które następnie prowadzą do kulawizn. W związku z tym kulawizny są wielobakteryjną zakaźną chorobą przyjmującą różne postacie (Wilson-Welder i wsp., 2015). Jej etiologia jest najczęściej powiązana z infekcjami bakteryjnymi prowadzącymi do rozwoju zmian zapalnych w obrębie racic, skóry oraz tkanki międzypalcowej przybierając różne formy i występując głównie na powierzchni skóry między racicami przednimi i tylnymi krów (Schroeder i wsp., 2003).

Wśród drobnoustrojów związanych z kulawiznami szczególne znaczenie przypisuje się bakteriom z rodzaju *Treponema*, w tym m.in. *T. denticola*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. putidum*, *T. phagedenis* oraz *T. paraluiscaeniculi*. Jednocześnie podkreśla się udział także innych mikroorganizmów, takich jak *Gugenheimella* spp., *Borrelia* spp., *Porphyromonas* spp. (Zinicola i wsp., 2015), *Bacteroides* spp., *Campylobacter* spp., *Fusobacterium necrophorum* oraz *Dichelobacter nodosus* (Knappe-Poindecker i wsp., 2013). Tak szeroki zakres potencjalnych czynników etiologicznych wskazuje na złożony charakter choroby.

Wczesne stadium kulawizny objawia się jako czerwone wykwity skórne o łagodnym i niewielkim obrzęku. W miarę postępu choroby, zmiany mogą stawać się bolesne, tworząc charakterystyczne owrzodzenia (Orsel i wsp., 2018). Wyróżnia się także zapalenie skóry palca, które charakteryzuje się powierzchownym stanem zapalnym skóry w okolicy brzegu koronki oraz opuszek. Inną postacią jest zapalenie skóry międzypalcowej (*dermatitis interdigitalis*), przebiegające z łagodnymi zmianami zapalnymi skóry znajdującej się między palcami. Do chorób racic zalicza się również wrzód podeszwy (wrzód Rusterholza), związany z uszkodzeniem rogu racicowego i

prowadzący do powstania wrzodu podeszwy (Miciński & Miciński, 2019). Kolejną postacią jest choroba Mortellaro, znana także jako „pięta truskawkowa”. Zmiany chorobowe występują głównie w obrębie skóry palców i piątek, gdzie rozwija się stan zapalny (Tunç i wsp., 2021). W obrębie szpary międzyraccowej może występować również zanokcica, czyli ropne zapalenie skóry i tkanek miękkich, którego rozwój wiąże się z aktywnością bakterii beztlenowych (Miciński & Miciński, 2019). Do powstania kulawizn może równocześnie dochodzić także na skutek urazów racic, takich jak skaleczenia, skręcenia lub złamania całych kończyn czy stawów.

Pomimo licznych badań, etiologia kulawizn oraz skład mikrobiologiczny zmian chorobowych nie zostały dotychczas jednoznacznie określone. Wyniki dostępnych analiz są często niespójne, co utrudnia jednoznaczne wskazanie drobnoustrojów kluczowych dla rozwoju tej choroby (Krull i wsp., 2014). Z tego powodu nadal istnieje potrzeba prowadzenia badań ukierunkowanych na dokładniejsze poznanie czynników etiologicznych uczestniczących w powstawaniu i przebiegu tej choroby. Ma to znaczenie zarówno dla lepszego zrozumienia patogenezы kulawizn, jak i dla opracowywania skuteczniejszych metod jej ograniczania w stadach bydła mlecznego.

1.3 Mastitis jako jedno z najważniejszych schorzeń bydła mlecznego

Zapalenie gruczołu mlekowego, czyli *mastitis*, jest jednym z najczęściej występujących schorzeń u krów mlecznych. Choroba ta ma charakter wieloetiologiczny i stanowi istotny problem zdrowotny w hodowli bydła mlecznego na całym świecie (Fogsgaard i wsp., 2012). Jego występowanie wiąże się z pogorszeniem stanu zdrowia zwierząt, obniżeniem dobrostanu oraz zaburzeniem prawidłowego funkcjonowania gruczołu mlekowego. *Mastitis* najczęściej kojarzone jest z zakażeniami bakteryjnymi, jednak jego etiologia nie ogranicza się wyłącznie do bakterii. W rozwoju choroby mogą uczestniczyć również grzyby oraz glony, w tym przedstawiciele rodzaju *Prototheca* spp. (Jabłońska i wsp., 2024; Rakesh Ranjan i wsp., 2006). Z tego względu zapalenie wymienia należy traktować jako chorobę o złożonym podłożu. Częstość występowania oraz skład gatunkowy patogenów odpowiedzialnych za *mastitis* zależą od wielu czynników m.in. warunków klimatycznych, systemu utrzymania zwierząt, żywienia, higieny doju, ogólnego stanu zdrowia stada, a także wieku, rasy i wydajności mlecznej krów (Bogni i wsp., 2011; Mećaj i wsp., 2023). Szczególne znaczenie mają również

warunki środowiskowe, ponieważ część czynników etiologicznych - zwłaszcza grzyby - mogą pochodzić ze ściółki, powierzchni w oborze, sprzętu udojowego czy rąk personelu (Dworecka-Kaszak i wsp., 2012). *Mastitis* może występować w różnych postaciach: klinicznej, subklinicznej oraz przewlekłej. Jednym z podstawowych wskaźników diagnostycznych wykorzystywanych w ocenie stanu zdrowia gruczołu mlekowego jest liczba komórek somatycznych (LKS) w mleku. Wartości przekraczające 200 000 komórek/ml wskazują na postać subkliniczną, natomiast poziom powyżej 400 000 komórek/ml świadczy o postaci klinicznej (Bogni i wsp., 2011). Postać kliniczna wiąże się zwykle z widocznymi objawami obejmującymi zmiany makroskopowe w obrębie wymienia oraz mleka. W przypadku postaci subklinicznej objawy zewnętrzne mogą nie występować, co utrudnia jej wykrycie i sprzyja utrzymywaniu się zakażenia w stadzie. Jest to szczególnie problematyczna forma, ponieważ może długo pozostawać niezauważona, a jednocześnie prowadzić do obniżenia wydajności mlecznej i pogorszenia stanu zdrowia krów. Z kolei postać przewlekła charakteryzuje się nawracającymi infekcjami oraz utrzymującym się wysokim poziomem LKS, bez jednoczesnego wzrostu liczby izolowanych patogenów (Bakr i wsp., 2015).

Główną rolę w rozwoju *mastitis* odgrywają mikroorganizmy. Najczęściej wskazywanymi czynnikami są bakterie, zarówno Gram (+), jak i Gram (-). Wśród bakterii Gram (+) wymienia się m.in. *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus* spp. oraz *Streptococcus uberis*, natomiast do bakterii Gram (-) zalicza się m.in. *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. oraz *Mycoplasma* spp. (Cheng & Han, 2020). Do najczęściej wskazywanych patogenów bakteryjnych należą również *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* oraz *Staphylococcus epidermidis* (Cheng i wsp., 2010).

Patogeny odpowiedzialne za zapalenie gruczołu mlekowego można podzielić na środowiskowe oraz zakaźne. Do patogenów środowiskowych należą drobnoustroje obecne w otoczeniu zwierząt, takie jak *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. oraz inne bakterie bytujące w środowisku hodowlanym (Klaas & Zadoks, 2018). Patogeny zakaźne kolonizują natomiast strzyki i gruczoł mlekowy, a do tej grupy zalicza się m.in. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* oraz *Corynebacterium bovis* (Kibebew, 2017).

Oprócz bakterii istotną rolę w etiologii *mastitis* odgrywają także grzyby. Grzybicze zapalenie wymienia występuje rzadziej niż bakteryjne, jednak stanowi istotne

zagrożenie dla zdrowia krów mlecznych. Częstość występowania grzybiczego zapalenia wymienia wzrasta szczególnie w okresach podwyższonej wilgotności i temperatury. Udział zakażeń grzybiczych w ogólnej liczbie przypadków *mastitis* szacowany jest na 1 - 12 %, chociaż w niektórych badaniach odnotowywano wartości sięgające nawet 22 % (Wawron i wsp., 2010; Zhou i wsp., 2013). Różnice te wynikają przede wszystkim z warunków środowiskowych, poziomu higieny oraz systemu utrzymania zwierząt w danym gospodarstwie. W ograniczaniu występowania choroby kluczowe znaczenie ma utrzymanie odpowiedniej higieny środowiska oraz prawidłowych praktyk doju (Bogni i wsp., 2011; Dworecka-Kaszak i wsp., 2012). Wśród grzybów związanych z zapaleniem wymienia szczególne znaczenie przypisuje się drożdżakom z rodzaju *Candida*, które należą do najczęściej identyfikowanych patogenów w przypadkach grzybiczego *mastitis* (Williamson & Di Menna, 2007). Wśród izolowanych gatunków można także wskazać m.in. *C. albicans* (Rakesh Ranjan i wsp., 2006), *C. kefir*, *C. rugosa*, *C. krusei* (Tarazona-Manrique i wsp., 2019), a także *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis* i *C. parapsilosis* (Jiang i wsp., 2024). Do rzadziej izolowanych należą również przedstawiciele rodzaju *Diutina*, w tym *D. rugosa* (Moravkova i wsp., 2021). W przypadkach grzybiczego zapalenia wymienia izolowane są także *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., oraz *Trichosporon* spp., a także *Aspergillus* spp., *Geotrichum* spp., czy *Saccharomyces* spp. (Costa i wsp., 1993; Ksouri i wsp., 2015). Ze względu na niespecyficzne objawy bywają błędnie interpretowane jako infekcje bakteryjne, co może prowadzić do nieodpowiedniego leczenia skutkujące w przewlekłych stanach zapalnych (Bakr i wsp., 2015).

Rzadziej spotykanym, lecz istotnym czynnikiem etiologicznym *mastitis*, są glony z rodzaju *Prototheca*. W ostatnich latach są one coraz częściej identyfikowane jako przyczyna zapalenia wymienia. Mimo stosunkowo niewielkiej częstości występowania, zakażenia wywołane przez *Prototheca* spp. stanowią poważne wyzwanie terapeutyczne, ponieważ drobnoustroje te charakteryzują się wysoką opornością na dostępne środki przeciwdrobnoustrojowe oraz konwencjonalne metody leczenia (Rakesh Ranjan i wsp., 2006). Pomimo wdrażania programów kontroli *mastitis* oraz postępu wiedzy dotyczącej tej choroby, jej częstość występowania nie maleje, a niekiedy wykazuje tendencję wzrostową.

Szczególnie niepokojącym zjawiskiem jest narastająca oporność drobnoustrojów na antybiotyki, wynikająca m.in. z ich nadmiernego i niewłaściwego stosowania (Cheng

& Han, 2020). Aktualnie stosowane środki terapeutyczne, obejmujące antybiotyki, leki przeciwgrzybicze oraz inne alternatywne preparaty przeciwbakteryjne, często nie zapewniają zadowalającej skuteczności. Problem ten dotyczy szczególnie zakażeń wywołanych przez drobnoustroje o wysokiej oporności, a także przypadków zapalenia wymienia, które mogą być nieodpowiednio zdiagnozowane i leczone niewłaściwie (Jabłońska i wsp., 2024). W konsekwencji *mastitis* nadal pozostaje problemem o zasięgu globalnym. Pomimo rozwoju produkcji zwierzęcej nadal brakuje w pełni skutecznych metod jego profilaktyki i leczenia (Fogsgaard i wsp., 2012). Narastająca oporność mikroorganizmów na środki przeciwdrobnoustrojowe stanowi dodatkowe wyzwanie nie tylko w medycynie weterynaryjnej, lecz także w medycynie ludzkiej.

1.4 Konwencjonalne leczenie i jego ograniczenia

Antybiotykoterapia pozostaje jednym z podstawowych narzędzi wykorzystywanych w leczeniu chorób bydła mlecznego. Niegdyś w celu zwiększeniu tempa wzrostu zwierząt oraz poprawie ich ogólnego stanu zdrowia antybiotyki dodawano do paszy i wody przeznaczonej dla zwierząt gospodarskich. Działanie to sprzyjało stymulowaniu ich wzrostu co jednocześnie przyczyniało się do wzrostu dochodów producentów (Bartlett i wsp., 2013). Wraz z postępującą intensyfikacją produkcji zwierzęcej, pogorszeniem warunków utrzymania oraz obniżeniem poziomu dobrostanu zwierząt w stadach bydła mlecznego, obserwowano częstsze występowanie *mastitis* oraz kulawizn. Zjawisku temu towarzyszyło jeszcze większe upowszechnienie stosowania antybiotyków (Garvey, 2022; Silva i wsp., 2021).

Obecnie wiele substancji przeciwdrobnoustrojowych stosowanych u zwierząt gospodarskich należy do tych samych lub podobnych grup antybiotyków, które wykorzystywane są również w medycynie ludzkiej (Cabello, 2006; Van den Bogaard & Stobberingh, 2000). Konsekwencją nadmiernego i niekontrolowanego stosowania antybiotyków stało się narastanie oporności mikroorganizmów, przez co nawet stosunkowo łagodne zakażenia bakteryjne u ludzi mogą być obecnie trudne do leczenia (Michael i wsp., 2014; Mulvey & Simor, 2009), ponieważ drobnoustroje te stały się mniej wrażliwe lub całkowicie niewrażliwe na działanie leków przeciwdrobnoustrojowych (Vega & Gore, 2014). W wyniku presji selekcyjnej bakterie wrażliwe na dany antybiotyk ulegają eliminacji, natomiast szczepy odporne przeżywają, namnażają się i mogą dalej

rozprzestrzeniać geny oporności (Read & Woods, 2014) stanowiąc istotne zagrożenie dla zdrowia publicznego (Barlow i wsp., 2008). Należy pamiętać, że problem ten dotyczy zarówno zdrowia zwierząt jak i ludzi (Levy & Marshall, 2004) ponieważ bakterie odporne na antybiotyki mogą być przenoszone ze zwierząt na człowieka (Ansari i wsp., 2010). Antybiotyki, które w przeszłości były powszechnie nadużywane, w wielu przypadkach utraciły swoją skuteczność, natomiast liczba nowych efektywnych terapeutycznych preparatów możliwych do zastosowania pozostaje ograniczona (Carlet i wsp., 2014).

Leczenie kulawizn jest szczególnie trudne ze względu na lokalizację zmian chorobowych, wieloczynnikową etiologię schorzenia oraz ograniczenia dostępnych metod terapeutycznych. W praktyce hodowlanej stosuje się różne strategie leczenia, spośród których najczęściej wykorzystywane są kąpiele racic oraz miejscowe opatrunki. W obu przypadkach często stosowane są antybiotyki (Wilson-Welder i wsp., 2015). Antybiotykoterapia miejscowa jest wykorzystywana częściej niż leczenie ogólne, jednak dostępne dane wskazują, że zastosowanie antybiotyków nie zawsze zapewnia oczekiwaną skuteczność terapeutyczną (Berry i wsp., 2012). Alternatywę dla antybiotyków stanowią środki nieantybiotykowe, takie jak siarczan miedzi, formalina, kwas nadoctowy oraz roztwory kwasów organicznych. Ich stosowanie może jednak wiązać się z działaniem drażniącym na skórę i tkanki zwierząt (Evans i wsp., 2016). W konsekwencji skuteczna kontrola kulawizn nie powinna opierać się wyłącznie na konwencjonalnym leczeniu przeciwbakteryjnym. Złożona etiologia choroby oraz narastający problem oporności bakterii na antybiotyki sprawiają, że obecnie nie istnieje jedna, jednoznacznie skuteczna metoda leczenia kulawizn. W związku z tym coraz większe znaczenie zyskuje poszukiwanie nowych, alternatywnych strategii terapeutycznych, które mogłyby ograniczać przeżywalność drobnoustrojów związanych z kulawiznami oraz umożliwiać skuteczną kontrolę infekcji bakteryjnych.

Podobne rozwiązania stosowane są w przypadku leczenia *mastitis* - istotną rolę odgrywa antybiotykoterapia, jednak w obu przypadkach jej skuteczność jest ograniczana przez złożoną etiologię chorób oraz narastające zjawisko oporności drobnoustrojów na środki przeciwdrobnoustrojowe. Szacuje się, że w 2018 roku około 50 % izolatów *E. coli* oraz ponad 30 % izolatów *K. pneumoniae* wykazywało oporność na co najmniej jedną grupę leków przeciwdrobnoustrojowych. Na tle innych krajów europejskich Polska charakteryzowała się wysokim odsetkiem oporności *E. coli* na aminopenicyliny, wynoszącym 64,3 %, fluorochinolony - 34,7 %, cefalosporyny trzeciej generacji - 17,6

%, oraz aminoglikozydy - 15,1 %. Jednocześnie odsetek izolatów *S. aureus* opornych na metycylinę, określanych jako MRSA, zmniejszył się w Polsce z 25,4 % w 2012 roku do 15,9 % w 2018 roku, co może świadczyć o skuteczności działań podejmowanych w celu ograniczenia tego zjawiska (Mazińska & Hryniewicz, 2020). Mimo to w latach 2000-2018 globalne zużycie antybiotyków wzrosło o 65 % (Klein i wsp., 2018). W 2019 roku w gospodarstwach w Stanach Zjednoczonych około 90 % wyizolowanych gronkowców koagulazo - ujemnych wykazywało oporność na co najmniej jeden środek przeciwdrobnoustrojowy. Tendencję wzrostową oporności obserwowano również w przypadku penicyliny i erytromycyny, a także w odniesieniu do stale narastającej wielolekooporności (Phophi i wsp., 2019). Częstość występowania oporności oraz zmienność jej poziomu różnią się pomiędzy krajami i stanowią istotny wskaźnik sposobu oraz skali stosowania antybiotyków (Chaudhary, 2016).

Dodatkowym wyzwaniem jest fakt, że szczepy grzybów izolowane z mleka krów ze zdiagnozowanym *mastitis* mogą wykazywać oporność na leki przeciwgrzybicze, analogicznie do oporności bakterii na antybiotyki (Bakr i wsp., 2015). W praktyce weterynaryjnej identyfikacja gatunkowa grzybów nie zawsze jest wykonywana, przede wszystkim ze względu na ich rzadsze występowanie w porównaniu z częstością występowania zakażeń bakteryjnych. Ponieważ bakterie są najczęściej uznawane za główny czynnik etiologiczny *mastitis*, leczenie zwykle opiera się na antybiotykoterapii. Takie postępowanie może jednak sprzyjać wzrostowi częstości występowania grzybiczego zapalenia wymienia (Bakr i wsp., 2015). Antybiotykoterapia stosowana w leczeniu *mastitis* nie zawsze zapewnia skuteczny efekt terapeutyczny, zwłaszcza w warunkach narastającej oporności bakterii. Ponadto niektóre antybiotyki, takie jak tetracyklina i penicylina, mogą stanowić dla grzybów źródło azotu, wspierając ich wzrost i rozwój (Ghodasara & Gajbhiye, 2015). Oznacza to, że leczenie *mastitis* oparte wyłącznie na antybiotykach może być nieskuteczne wobec części czynników etiologicznych, a jednocześnie może nasilać problem zakażeń grzybiczych. Istotnym czynnikiem utrudniającym zwalczanie szczepów grzybiczych jest również ich zdolność do tworzenia biofilmu. Mechanizm ten zwiększa odporność drobnoustrojów na niekorzystne warunki środowiskowe oraz ogranicza skuteczność stosowanych leków przeciwgrzybiczych (Asfour i wsp., 2022). W diagnostyce i badaniach nad *mastitis* dominujące podejście koncentruje się zazwyczaj na najczęściej izolowanych gatunkach drobnoustrojów. Może to ograniczać pełne poznanie spektrum patogenów

odpowiedzialnych za rozwój choroby. Takie ukierunkowanie badań może prowadzić do niedoszacowania znaczenia rzadziej izolowanych patogenów, które również mogą wywoływać trudne do leczenia infekcje (Ksouri i wsp., 2015).

Narastający problem antybiotykooporności skłania naukowców do intensywnego poszukiwania alternatywnych metod leczenia. W ostatnich latach szczególną uwagę poświęca się ocenie właściwości biobójczych naturalnych substancji bogatych w związki biologicznie aktywne. Do najczęściej badanych należą zioła zawierające kwasy fenolowe, alkaloidy, flawonoidy, terpenoidy oraz olejki eteryczne (Li i wsp., 2023) a także produkty pszczele, takie jak jad pszczeli czy propolis (Cheng & Han, 2020). Właściwości przeciwdrobnoustrojowe wykazują również białka pochodzenia zwierzęcego, m.in. laktoferyna i β -laktoglobulina, bakteriocyny produkowane przez bakterie, oraz nanocząstki (Radzikowski i wsp., 2020).

1.5 Nanotechnologia jako alternatywa dla konwencjonalnych metod leczenia

W ostatnich latach zainteresowanie badaczy coraz częściej koncentruje się na zastosowaniu nanotechnologii w różnych dziedzinach przemysłu. Szczególną uwagę poświęca się metalicznym NPs, które wykazują szeroki zakres właściwości biologicznych. Do najważniejszych z nich należą zdolność do transportu leków (Adeyemi & Sulaiman, 2014), działanie przeciwwirusowe (Rai, Deshmukh, i wsp., 2016), przeciwgrzybicze (Cruz-Luna i wsp., 2021) oraz przeciw pasożytnicze (Benelli, 2018). Dzięki tym właściwościom NPs znajdują zastosowanie w medycynie (Rai, Ingle, i wsp., 2016), farmacji (Al-Farraj i wsp., 2023) oraz kosmetologii (Dhanjal i wsp., 2022). Ponadto badania prowadzone w warunkach *in vitro* wskazują na ich potencjalne właściwości przeciwnowotworowe (Abu-Dief i wsp., 2022). Zakres badań nad NPs dynamicznie się rozwija, zwłaszcza w kontekście ich wykorzystania w zwalczaniu infekcji bakteryjnych. Wynika to z ich unikalnych właściwości fizykochemicznych oraz zdolności do oddziaływania z komórkami drobnoustrojów. Aktywność biologiczna NPs zależy między innymi od ich morfologii, wielkości, kształtu, składu chemicznego oraz innych parametrów fizykochemicznych (Bashal i wsp., 2023; Khezerlou i wsp., 2018).

Nanocząstki mogą być syntetyzowane różnymi metodami, w tym biologicznymi, chemicznymi oraz fizycznymi. Metody biologiczne uznawane są za najbardziej przyjazne środowisku, ponieważ wykorzystują organizmy żywe lub ich składniki, takie jak bakterie,

wirusy (Thakkar i wsp., 2010), drożdże (Kowshik i wsp., 2003), grzyby (Sastry i wsp., 2003), algi (Armendariz i wsp., 2004), a także rośliny i ich ekstrakty (Ceylan i wsp., 2021; Ekrikaya i wsp., 2021; Koca i wsp., 2018). Alternatywnie stosuje się metody chemiczne i fizyczne, obejmujące wykorzystanie różnorodnych reagentów, m.in. promieniowania UV, ultradźwięków. Metody te często wiążą się jednak z użyciem substancji toksycznych dla środowiska (Ijaz i wsp., 2020; Kumar i wsp., 2018).

W literaturze opisywane są różne rodzaje NPs metali, między innymi AuNPs, AgNPs, CuNPs, FeNPs oraz PtNPs. Dostępne dane sugerują, że ze względu na ich charakterystykę, mogą stanowić obiecującą strategię w zwalczaniu infekcji na tle bakteryjnym i grzybiczym. Jedną z kluczowych cech NPs w kontekście ich zastosowania przeciwdrobnoustrojowego jest ograniczenie lub brak zdolności bakterii do rozwijania oporności na ich działanie (Tang & Zheng, 2018). Mechanizmy aktywności przeciwdrobnoustrojowej NPs polegają między innymi na oddziaływaniu z powierzchnią komórki mikroorganizmu, co prowadzi do uszkodzenia błony komórkowej, zaburzenia potencjału błonowego oraz indukcji stresu oksydacyjnego (Lange i wsp., 2021; Radzikowski i wsp., 2020). Takie wielokierunkowe działanie może mieć istotne znaczenie w ograniczaniu przeżywalności drobnoustrojów oraz w kontroli zakażeń.

Mechanizmy i zakres działania NPs ma szczególne znaczenie w przypadku chorób o złożonej etiologii, takich jak *mastitis* oraz kulawizny, w których skuteczność konwencjonalnych metod leczenia może być ograniczona. NPs metali, dzięki swoim właściwościom przeciwdrobnoustrojowym i szerokiemu spektrum aktywności biologicznej, mogą więc stanowić alternatywę lub uzupełnienie dotychczasowych strategii terapeutycznych, zwłaszcza w kontekście narastającego problemu oporności drobnoustrojów na powszechnie stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe. Wizja ta stanowi perspektywiczny kierunek badań nad alternatywnymi metodami ograniczania zakażeń bakteryjnych i grzybiczych u bydła.

2. Hipotezy badawcze, cel i zakres pracy

W pracy doktorskiej postawiono następujące hipotezy badawcze:

Hipoteza 1: NPs metali wykazują istotne właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec bakterii i grzybów izolowanych od bydła ze zdiagnozowanym *mastitis* oraz zmianami chorobowymi racic.

Hipoteza 2: Skuteczność przeciwdrobnoustrojowa nanomateriałów zależy od rodzaju metalu, zastosowanego stężenia NPs.

Hipoteza 3: Nanokompleksy bimetaliczne wykazują efekt synergistyczny i silniejsze działanie biobójcze niż pojedyncze NPs.

Hipoteza 4: Niektóre szczepy odporne na rutynowo stosowane leki przeciwgrzybicze pozostają wrażliwe na NPs, co wskazuje na ich potencjał jako alternatywy dla klasycznych chemioterapeutyków.

Hipoteza 5: NPs o najwyższej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, stosowane w odpowiednio dobranych dawkach, nie wykazują istotnej cytotoksyczności wobec komórek linii komórkowych ludzkich i bydłych, co przemawia za ich możliwym bezpiecznym zastosowaniem w profilaktyce i terapii.

Celem przeprowadzonych badań była ocena *in vitro* przeciwdrobnoustrojowych właściwości nanomateriałów oraz ich kompleksów jako potencjalnych nieantybiotykowych środków stosowanych w profilaktyce *mastitis* oraz kulawizn bydła na tle zakażeń bakteryjnych i grzybiczych. Praca koncentrowała się przede wszystkim na ocenie potencjału aplikacyjnego NPs do prowadzenia dalszych badań *in vivo* oraz walidacji ich skuteczności wobec konkretnych patogenów, co stanowi uzupełnienie istotnej luki w dostępnej literaturze.

Badania miały na celu:

1. Ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej Ag, Au, Cu, Pt, Fe/FeC NPs oraz wybranych nanokompleksów wobec patogenów izolowanych od bydła ze zdiagnozowanym *mastitis* i kulawiznami.
2. Porównanie skuteczności pojedynczych NPs z nanokompleksami w celu wykazania ewentualnego efektu synergistycznego oraz ocenę ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej.
3. Ocenę cytotoksyczności wybranych NPs i ich kompleksów wobec komórek bydlęcych i ludzkich, aby określić zakres potencjalnie bezpiecznych stężeń.
4. Wskazanie tych nanomateriałów, które mają największy potencjał do dalszych badań *in vivo* i wdrożeniowych.
5. Wykazanie różnic we wrażliwości na NPs mikroorganizmów izolowanych od bydła ze zdiagnozowanym *mastitis* i kulawiznami.

Zakres prac:**Publikacja 1 (P1).**

Praca dotyczyła oceny *in vitro* właściwości przeciwbakteryjnych Ag, Au, Cu, Fe, Pt NPs oraz wybranych nanokompleksów wobec drobnoustrojów wyizolowanych ze zmian chorobowych kończyn bydła, szczególnie związanych z kulawiznami. Zakres obejmował izolację i identyfikację bakterii z materiału biologicznego, charakterystykę fizykochemiczną NPs oraz ocenę przeżywalności patogenów w warunkach tlenowych i beztlenowych po zastosowaniu różnych stężeń badanych NPs. Najsilniejsze działanie biobójcze wykazały AgNPs, CuNPs oraz ich kompleksy.

Publikacja 2 (P2).

Praca obejmowała kompleksową ocenę właściwości przeciwdrobnoustrojowych, cytotoksycznych i fizykochemicznych wybranych NPs oraz nanokompleksów wobec patogenów izolowanych z mleka pochodzącego od krów ze

zdiagnozowanym *mastitis* w szczególności bakterie i grzyby. Zakres badań obejmował analizę przeżywalności drobnoustrojów izolowanych z mleka, ocenę bezpieczeństwa wobec komórek BME - UV1 i HMEC oraz ocenę właściwości fizykochemicznych. W pracy wykazano przewagę biobójczego kompleksu AgCuNPs oraz brak istotnej toksyczności niskich stężeń wobec linii komórkowych.

Publikacja 3 (P3).

Publikacja koncentrowała się na grzybiczym *mastitis* wywoływanym przez *Candida* spp. i *Diutina* spp. Zakres pracy obejmował izolację i identyfikację grzybów z mleka krów z subklinicznym *mastitis*, ocenę właściwości fizykochemicznych NPs, analizę przeżywalności szczepów po ekspozycji na nanomateriały oraz wrażliwości na standardowe leki przeciwgrzybicze. Wykazano wysoką aktywność przeciwgrzybiczą, szczególnie dla układu AgCuNPs, przy jednoczesnym zróżnicowaniu wrażliwości między gatunkami.

Publikacja 4 (P4).

Praca stanowi rozwinięcie badań nad grzybiczym *mastitis* i dotyczyła rzadziej izolowanych, ale klinicznie istotnych gatunków grzybów związanych z zapaleniem wymienia bydła. Zakres obejmował izolację i identyfikację siedmiu gatunków grzybów z mleka krów z subklinicznym *mastitis*, ocenę wpływu Ag, Au, Cu, FeC, Pt NPs oraz kompleksów AgCu, AgAu i AuCu na ich przeżywalność, a także ocenę wrażliwości na osiem standardowych preparatów przeciwgrzybiczych. W pracy ponownie wskazano kompleks AgCuNPs jako układ o najwyższej aktywności biobójczej i podkreślono przydatność wyników jako podstawy do dalszych badań *in vivo*.

3. Finansowanie

Badania przeprowadzone w publikacji 1 oraz 2 realizowane były w ramach projektu pn. „NanoCow - opracowanie linii produktów do profilaktyki *mastitis* oraz kulawizn na tle zakażeń bakteryjno - grzybiczych” nr. POIR.01.01.01-00-2127/20.

4. Materiały i metody

4.1. Materiał badawczy

4.1.1 Nanocząstki

W publikacjach P1 - P4 wykorzystano NPs metaliczne syntezowane metodami fizycznymi:

P1: W eksperymencie wykorzystane zostały hydrokoloidy AgNPs, AuNPs, CuNPs, FeNPs i PtNPs, zakupione w firmie Nano - Tech Polska (Warszawa, Polska).

P2: W doświadczeniu wykorzystano NPs hydrokoloidalne Ag, Au, Cu i Pt, które zostały zakupione w firmie Nano - Tech Polska (Warszawa, Polska), natomiast FeNPs w formie proszku, zostały zakupione w firmie 3D - nano (Kraków, Polska).

P3, P4: W badaniach użyto hydrokoloidalne AgNPs, AuNPs, CuNPs i PtNPs zakupione od firmy Nano - Tech Polska (Warszawa, Polska), natomiast FeCNPs pokryte węglem w formie proszku, zostały zakupione od firmy 3D - nano (Kraków, Polska).

4.1.2 Materiał biologiczny

P1: Materiał biologiczny obejmował próbki tkanek, ropę, ropę z domieszką krwi oraz różnego rodzaju wymazy pobrane od bydła rasy polskiej holsztyńsko - fryzyjskiej, u których zdiagnozowano kulawizny. Próbki te pozyskano w trakcie rutynowej korekcji racic. Z pobranego materiału biologicznego izolowano mikroorganizmy które następnie poddawano dalszym analizom.

P2: Próbki mleka ćwiartkowego pochodzącego od krów z zapaleniem wymienia (LKS > 200 000/ml) pobrano z gospodarstw w okresie od lipca 2021 r. do marca 2022 r. Następnie z pobranego mleka izolowano mikroorganizmy do dalszych badań.

Komórki nabłonka gruczołu mlekowego bydła BME - UV1 zostały zakupione w banku komórek Instytutu Zooprofilaktycznego Lombardii i Emilii - Romanii (Włochy), natomiast ludzkie komórki HMEC zostały pozyskane od firmy Thermo Fisher Scientific. Wspomniane linie komórkowe następnie poddawane było testom cytotoksyczności z wykorzystaniem NPs.

P3, P4: Próbkę mleka ćwiartkowego pochodzącego od krów z zapaleniem wymienia (LKS>200 000/ml) pobrano z gospodarstw, które znajdowały się w województwach mazowieckim i podlaskim (P3) oraz od krów utrzymywanych w Rolniczej Stacji Doświadczalnej Wilanów - Obory w Polsce (województwo mazowieckie), stanowiącą integralną część Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (P4). Następnie z pobranego mleka izolowano mikroorganizmy do dalszych badań.

4.2. Metody badawcze

4.2.1 Określenie morfologii nanocząstek: P1 - P4

Hydrokoloidy NPs sonifikowano przez 2 minuty przy mocy 500 W i częstotliwości 20 kHz przed wykorzystaniem ich w badaniach. Następnie krople hydrokoloidów o stężeniu 10 mg/l naniesiono na miedziane siatki formwarowe do Transmisyjnego mikroskopu Elektronowego (TEM) o rozmiarze oczek 200 i powierzchni 3 mm², (Agar Scientific, Stansted, Wielka Brytania) i pozostawiono do wyschnięcia na 24 godziny. Morfologię NPs określono poprzez analizę obrazów uzyskanych za pomocą TEM (TEM, JEM - 1220EX, JEOL, Tokio, Japonia). Obrazy NPs wykonano przy napięciu 80 keV z kamerą Morada o rozdzielczości 11 Mpx (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Niemcy).

4.2.2 Określenie właściwości fizykochemicznych nanocząstek: P1 - P4

W celu określenia potencjału zeta i rozkładu wielkości NPs, przed przystąpieniem do analiz przygotowano odpowiednie stężenia hydrokoloidów poprzez zmieszanie zakupionych NPs z wodą destylowaną, aby uzyskać stężenie wynoszące 10 mg/l. Potencjał zeta oraz średnica hydrodynamiczna NPs zostały określone przy użyciu aparatu Zetasizer Nano ZS (ZEN3500, Malvern Instruments, Malvern, Wielka Brytania). W celu określenia wielkości średniej wielkości aglomeratów określono rozkład średnicy hydrodynamicznej metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS).

4.2.3 Izolacja mikroorganizmów z materiału biologicznego: P1 - P4

W publikacji pierwszej, materiał biologiczny (próbki tkanek, ropa, ropa z krwią oraz inne wymazy pobrane od bydła, u którego zdiagnozowano kulawizny) umieszczono w roztworze sterylnej NaCl, a następnie umieszczono w inkubatorze orbitalnym Stuart SI500 z wytrząsarką (Reagecon Diagnostics Ltd., Shannon, Irlandia) na 24 godziny w temperaturze 5 °C. Otrzymaną zawiesinę posiano na agarze Columbia z dodatkiem krwi baraniej (Argenta, Poznań, Polska) oraz na agarze z infuzji mózgowo - sercowej (Biomaxima, Lublin, Polska). Hodowle umieszczono w środowiskach tlenowych i beztlenowych w celu maksymalizacji możliwości zwiększenia liczebności różnych izolowanych gatunków patogenów. W celu zapewnienia warunków beztlenowych, hodowlę przeprowadzono w aerostacie przy użyciu generatora atmosfery beztlenowej GENbag (bioMérieux, Warszawa, Polska).

W drugiej publikacji, w celu izolacji i wstępnej identyfikacji gatunkowej, mleko ćwiartkowe będące materiałem biologicznym zostało posiane na podłożach stałych i płynnych. Do hodowli szczepów wykorzystano specjalistyczne podłoża mikrobiologiczne (Biomaxima, Polska): bulion odżywczy do ogólnej hodowli mikrobiologicznej, Mannitol Salt Lab Agar, Edwards Lab Agar z dodatkiem krwi bydlęcej, Chromogenic Uri - Colour Lab - Agar, MacConkey Lab - Agar, Salmonella - Shigella Lab - Agar, Chromogenic *Candida* Lab - Agar, Rose Bengal Lab - Agar, TBX Lab - Agar, Chromogenic *E.coli* Lab - Agar, bulion LB, Rogosa Lab - Agar, Enterococcus Lab - Agar, podłoże laktozowe Eijkmana, podłoże izolacyjne *Prototheca* według metodyki Pore'a (Pore, 1973) oraz agar dekstrozowy Sabourauda (Argenta, Polska).

W trzeciej publikacji pobrane próbki mleka ćwiartkowego posiano na specjalistyczne podłoża przeznaczone do hodowli grzybów, w tym agar Sabouraud z chloramfenikolem (Bio - Rad, Hercules, CA, USA), Chromogenic *Candida* Lab - Agar oraz DRBC Lab - Agar (Biomaxima, Lublin, Polska). Przygotowane hodowle inkubowano w temperaturze 37 °C przez 24 - 48 godziny.

W czwartej publikacji pobrane mleko posiano na podłożach agarowych. Wykorzystano wcześniej przygotowane podłoża mikrobiologiczne przeznaczone do hodowli grzybów, takie jak agar Czapek Dox Modified, podłoże agarowe z ekstraktem drożdżowym i oksytetracykliną (Pol - Aura, Warszawa, Polska), agar Sabourauda z

chloramfenikolem (Bio - Rad, Hercules, Kalifornia, USA), agar DG - 18 (Graso - biotech, Owidz, Polska) oraz DRBC Lab - Agar (Biomaxima, Lublin, Polska). Następnie hodowle inkubowano w temperaturze 37 °C przez 24 - 48 godziny.

4.2.4 Identyfikacja mikroorganizmów: P1 - P4

W P1 wyhodowane mikroorganizmy wysłano do zewnętrznego laboratorium w celu identyfikacji przy użyciu aparatu MALDI - TOF MS (Bruker, Poznań, Polska) oraz urządzenia VITEK 2 (bioMérieux, Warszawa, Polska). Natomiast mikroorganizmy wyhodowane w P2 - P4 zostały zidentyfikowane wyłącznie za pomocą spektrometru MALDI - TOF MS. W przypadku identyfikacji *Prototheca* sp. izolowana w ramach badań P2, była rozpoznana na podstawie morfologii kolonii oraz obrazu mikroskopowego.

Wykorzystanie tych aparatów jest istotne ze względu na fakt, że w niektórych przypadkach wyizolowane patogeny nie były wcześniej łączone z chorobą. Uzyskane wyniki były zatem bardziej precyzyjne niż w przypadku standardowej identyfikacji mikrobiologicznej. Aparatura ta jest obecnie szeroko stosowana w laboratoriach mikrobiologii klinicznej ze względu na swój duży potencjał diagnostyczny wynikający z rozwoju spektrometrii mas z jonizacją/desorpcją laserową wspomaganą matrycą z analizą czasu przelotu.

4.3 Doświadczenie 1

P1. Kot, M.; Kalińska, A.; Jaworski, S.; Wierzbicki, M.; Smulski, S.; Gołębiowski, M. *In Vitro* Studies of Nanoparticles as a Potentially New Antimicrobial Agent for the Prevention and Treatment of Lameness and Digital Dermatitis in Cattle. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 6146.

4.3.1 Ocena żywotności bakterii po działaniu Ag, Au, Cu, Fe, Pt NPs i wybranych kompleksów

Z każdego wyhodowanego i zidentyfikowanego izolatu bakterii, przygotowano zawiesinę o gęstości optycznej 0,5 w skali McFarlanda ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Zawiesinę

naniesiono pipetą do 96 - dołkowej płytki w objętości 50 μ l na każdy dołek. Grupa kontrolna składała się z mieszaniny 50 μ l sterylnej wody i 50 μ l zawiesiny bakteryjnej. W eksperymencie wykorzystano dostępne na rynku AgNPs, AuNPs, CuNPs, FeNPs i PtNPs (Nano - tech Polska, Warszawa, Polska), które zostały zsyntezowane metodami fizycznymi. Z NPs wykorzystywanych w doświadczeniach przygotowano odpowiednie rozcieńczenia z wodą destylowaną. Następnie dodano po 50 μ l hydrokoloidów NPs, tak aby ich końcowe stężenia w dołku wynosiły: dla pojedynczych nanocząstek: 1,56; 3,125; 6,25; 12,5 i 25 mg/l; dla PtNPs: 0,625; 1,25; 2,5; 5 i 10 mg/l. Stężenia nanokompleksów AgAu, AgCu, AuCu NPs wynosiły 0,78; 1,56; 3,125; 6,25 i 12,5 mg/l. Zakresy stężeń zostały dobrane na podstawie dostępnej literatury oraz wstępnych danych własnego zespołu badawczego. Niższy zakres dla PtNPs wynika z ich odmiennych właściwości fizykochemicznych i większej aktywności katalitycznej w niższych stężeniach, co jest opisane w literaturze. Badania pilotażowe pozwoliły zawęzić zakres do wartości biologicznie istotnych. Kompleksy NPs powstały poprzez połączenie dwóch rodzajów NPs w stosunku 1:1. Inkubację przeprowadzono przez 24 godziny w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych i beztlenowych. Po 24 godzinach do każdej studzienki dodano 10 μ l odczynnika Presto Blue (Invitrogen, Waltham, MA, USA), a następnie odczytano spektrofotometrycznie absorbancję przy długości fali 570 nm (Tecan, Durham, NC, USA). Żywotność określono na porównując uzyskane wyniki dla grup eksperymentalnych odnoszonych do grupy kontrolnej, przyjmowanej jako 100 % przeżywalności.

4.3.2 Analiza statystyczna

Dane analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z wykorzystaniem oprogramowania STATGRAPHICS® Centurion XVII, wersja 17.2.05 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

4.4 Doświadczenie 2

P2. Wierzbiński M, **Kot M**, Lange A, Kalińska A, Gołębiewski M, Jaworski S. Evaluation of the Antimicrobial, Cytotoxic, and Physical Properties of Selected Nano - Complexes in Bovine Udder Inflammatory Pathogen Control. *Nanotechnol Sci Appl*. 2024, 17, 77-94

4.4.1 Ocena przeżywalności mikroorganizmów po działaniu Ag, Au, Cu, Fe, Pt NPs i wybranych kompleksów

Z wychodowanych i zidentyfikowanych kolonii mikroorganizmów przygotowano zawiesiny o gęstości optycznej wynoszącej 0,5 w skali McFarlanda. Zawiesinę o objętości 100 µl pipetowano do dołków płytki 96 - dołkowej. Grupa kontrolna składała się z mieszaniny 100 µl sterylnej wody i 100 µl zawiesiny mikroorganizmów. Przygotowano także odpowiednie stężenia NPs których wyjściowe stężenie było regulowane wodą destylowaną. Następnie do dołków grup doświadczalnych do których wcześniej dodano zawiesiny z mikroorganizmami dodano po 100 µl hydrokoloidów NPs, aby uzyskać następujące stężenia: 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 mg/l dla Ag, Au, Cu i Fe oraz 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 mg/l dla Pt. Zakresy stężeń zostały dobrane na podstawie dostępnej literatury oraz wstępnych danych własnego zespołu badawczego. Obniżony zakres dla PtNPs wynika z ich specyficznych właściwości fizykochemicznych oraz wysokiej aktywności katalitycznej przy niskich stężeniach, co potwierdzają doniesienia literaturowe. Przeprowadzone badania pilotażowe pozwoliły ograniczyć zakres do poziomów istotnych biologicznie. Inkubacja mikroorganizmów z NPs trwała przez 24 godziny w temperaturze 37 °C. Następnie do każdego dołka dodano 20 µl XTT z zestawu do oznaczania proliferacji komórek XTT (Merck, Darmstadt, Niemcy) i kontynuowano inkubację przez kolejne 24 godziny. Po tym czasie wykonano pomiar spektrofotometryczny przy długości fali 450 nm. Wyniki porównano z uśrednionymi odczytanymi wynikami spektrofotometrycznymi grupy kontrolnej, w której mikroorganizmy nie były poddane działaniu NPs i na tej podstawie obliczono procent żywotności komórek w grupie badanej. Analizę analogiczną do opisanej powyżej przeprowadzono dla kompleksów AgAu, AgCu, AuCu. Kompleksy NPs powstały poprzez połączenie dwóch rodzajów NPs w stosunku 1:1.

4.4.2 Hodowla komórek BME - UV1 i HMEC

Komórki BME - UV1 były hodowane w pożywce DMEM/F12, RPMI - 1640 oraz NCTC 135 (Thermo Fisher Scientific) w proporcji 5:3:3, wzbogaconym alfa - laktozą (0,1 %), glutationem (1,2 mM), insuliną bydlęcą (1 µg/ml), hydrokortyzonem (1 µg/mL), kwasem L - askorbinowym (10 µg/mL, Merck), holo - transferryną bydlęcą (5 µg/mL),

10% FBS oraz antybiotykiem i środkiem przeciwgrzybiczym (Thermo Fisher Scientific). Komórki HMEC były hodowane w pożywce HuMEC Ready Medium zawierającej ekstrakt z przysadki bydlęcej (BPE) w stężeniu 50 µg/ml, zestaw suplementów HuMEC oraz antybiotyk i środek przeciwgrzybiczy (Thermo Fisher Scientific). Komórki hodowano w temperaturze 37 °C w wilgotnej atmosferze zawierającej 5 % CO₂ i 95 % tlenu.

4.4.3 Ocena żywotności komórek BME - UV1 i HMEC po traktowaniu nanocząstkami

W celu określenia żywotności komórek przeprowadzono analizę aktywności metabolicznej z wykorzystaniem testu PrestoBlue HS (Thermo Fisher Scientific). Komórki wysiano na płytkę 96-dołkową w gęstości 1×10^4 komórek na dołek i inkubowano przez 24 godziny. Następnie usunięto pożywkę hodowlaną i dodano rozcieńczenia NPs w świeżej pożywce w stężeniach końcowych 0,1; 0,5; 1; 2 oraz 2,5 mg/l, po 100 µL na dołek. Grupę kontrolną stanowiły komórki hodowane w pożywce bez dodatku nanocząstek. Po 24 godzinach inkubacji usunięto pożywkę i dodano 100 µL świeżej pożywki zawierającej 10 % odczynnika PrestoBlue HS. Po dwóch godzinach inkubacji w inkubatorze do hodowli komórkowych zmierzono fluorescencję (długość fali wzbudzenia 560 nm, emisji 590 nm) przy użyciu czytnika mikropłytek (Infinite M200, Tecan, USA). Badanie wykonano w trzech niezależnych eksperymentach, każdy w trzech powtórzeniach. Przed właściwą analizą aktywności metabolicznej komórek oceniono możliwość interferencji nanocząstek z testem PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific). Test interferencji przeprowadzono w taki sam sposób jak analizę właściwą, jednak bez obecności komórek.

4.4.4 Analiza statystyczna

Analiza statystyczna zastosowana w badaniu wskaźnika przeżywalności mikroorganizmów wyizolowanych z mleka pochodzącego od krów z *mastitis*, poddanego działaniu NPs: Ag, Au, Cu, Fe i Pt oraz wybranych kompleksów, została przeprowadzona przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z wykorzystaniem

oprogramowania STATGRAPHICS® Centurion XVII, wersja 17.2.05 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

Wyniki badań cytotoksyczności NPs na linii komórkowej BME - UV1 i HMEC zostały poddane analizie statystycznej przy użyciu wielowymiarowej analizy wariancji (ANOVA) z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism 8 (wersja 9.2.0, San Diego, CA, USA). Różnice między grupami analizowano za pomocą testu Dunnetta. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie wraz z odchyleniami standardowymi. Różnice o wartości $p \leq 0,05$ uznano za statystycznie istotne.

4.5 Doświadczenie 3 i 4

P3. Kot, M.; Lange, A.; Jabłońska, W.; Kalińska, A.; Nasiłowska, B.; Skrzeczanowski, W.; Gołębiowski, M. Nanoparticles as New Antifungals in the Prevention of Bovine Mycotic Mastitis Caused by *Candida* spp. and *Diutina* spp.- *In Vitro* Studies. *Molecules* 2025, 30, 2086

P4. Kot, M.; Jabłońska, W.M.; Lange, A.; Kalińska, A.; Gołębiowski, M. Nanomaterials in the Management of Fungal Udder Inflammation in Cattle as an Effective Preventive Strategy Based on *In Vitro* Studies. *Biology* 2026, 15, 412

4.5.1 Ocena przeżywalności grzybów po działaniu Ag, Au, Cu, FeC, Pt NPs i wybranych kompleksów

Z wyizolowanych szczepów grzybiczych przygotowano zawiesiny w roztworze NaCl o gęstości optycznej odpowiadającej 1,0 w skali McFarlanda. Następnie zawiesinę grzybową nanoszono do dołek płytek 96 - dołkowych w objętości 50 μ l na każdy dołek. Grupę kontrolną stanowiła mieszanina 50 μ l zawiesiny oraz 50 μ l sterylnej wody, co odpowiadało 100 % przeżywalności mikroorganizmów. W grupach eksperymentalnych do 50 μ l zawiesiny grzybowej dodawano 50 μ l NPs. W przypadku kompleksów przygotowywano je poprzez połączenie różnych rodzajów NPs w stosunku 1:1. Stężenia NPs w dołkach wynosiły odpowiednio: 1,56; 3,125; 6,25; 12,5 oraz 25 mg/l dla: Au, Ag, Cu, FeC NPs, natomiast dla PtNPs zastosowano stężenia: 0,625; 1,25; 2,5; 5 oraz 10 mg/l. Zakresy stężeń zostały dobrane na podstawie dostępnej literatury oraz wstępnych danych własnego zespołu badawczego. Badania pilotażowe pozwoliły

zawęzić zakres do wartości biologicznie istotnych. Objętość końcowa w każdym dołku wynosiła 100 μ l. Przygotowane płytki zabezpieczano parafilmem w celu ograniczenia parowania, a następnie inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Po tym czasie do każdego dołka, zarówno w grupach kontrolnych, jak i eksperymentalnych, dodawano 20 μ l odczynnika z zestawu do oznaczania proliferacji komórek XTT (Merck, Darmstadt, Niemcy). Płytki ponownie uszczelniano parafilmem i inkubowano przez kolejne 24 godziny w temperaturze 37°C. Po zakończeniu inkubacji przeżywalność grzybów oceniano na podstawie pomiaru absorbancji spektrofotometrycznej przy długości fali 450 nm oraz długości fali odniesienia 690 nm, wykorzystując czytnik ELISA Infinite M200 (Tecan, Durham, NC, USA). Uzyskane wyniki dla grup eksperymentalnych odnoszono do grupy kontrolnej, przyjmowanej jako 100 % przeżywalności.

4.5.2 Ocena wrażliwości na środki przeciwgrzybicze metodą dyfuzyjno - krążkową

Ocenę wrażliwości grzybów na środki przeciwgrzybicze przeprowadzono metodą dyfuzyjno - krążkową na stałych podłożach hodowlanych opisanych we wcześniejszej części metodologii. Na powierzchnię podłoża równomiernie наносzono 100 μ l zawiesiny grzybiczej o gęstości optycznej odpowiadającej 0,5 w skali McFarlanda, stosując technikę rozprowadzania jałową głaszczką. Na tak przygotowanych szalkach Petriego przy użyciu sterylnych pęset umieszczano krążki zawierające następujące substancje przeciwgrzybicze: flucytozynę (1 μ g; FY1), ekonazol (10 μ g; ECN10), ketokonazol (10 μ g; KCA10), klotrimazol (10 μ g; CTM10), flukonazol (10 μ g; FCN10 oraz 25 μ g; FCN25), amfoterycynę B (20 μ g; AMB20) oraz nystatynę (100 μ g; NY100) (MASTDISCAS[®], MAST GROUP, Wielka Brytania). Szalki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Po zakończeniu inkubacji oceniano wrażliwość szczepów poprzez pomiar średnicy stref zahamowania wzrostu wokół krążków wyrażonej w milimetrach (mm).

4.5.3 Analiza statystyczna

Analiza statystyczna obejmowała w szczególności ocenę przeżywalności mikroorganizmów po ekspozycji na NPs oraz ich kompleksy. Dane analizowano przy

użyciu oprogramowania GraphPad Prism 9 (wersja 9.2.0, San Diego, CA, USA). Różnice między grupami oceniano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), a następnie przeprowadzano test post hoc Tukey'ego w celu wykonania porównań międzygrupowych. Wyniki przedstawiano jako średnie odchylenie standardowe. Za statystycznie istotne uznawano różnice przy poziomie istotności $p \leq 0,05$.

5. Wyniki

5.1 Doświadczenie 1

P1. Kot, M.; Kalińska, A.; Jaworski, S.; Wierzbicki, M.; Smulski, S.; Gołębiowski, M. *In Vitro Studies of Nanoparticles as a Potentially New Antimicrobial Agent for the Prevention and Treatment of Lameness and Digital Dermatitis in Cattle. Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 6146

5.1.1 Identyfikacja wyizolowanych mikroorganizmów

W niniejszym badaniu z materiału biologicznego, wyizolowano Gram (-) bakterie tlenowe *Sphingomonas paucimobilis*, *Ochrobactrum intermedium* I, *Ochrobactrum intermedium* II oraz *Ochrobactrum gallinifaecis*, a także Gram (+) bakterię beztlenową *Actinomyces odontolyticus*. Dostępna literatura dotycząca identyfikacji mikroorganizmów związanych z kulawiznami jest bardzo ograniczona. Bakterie wyizolowane w niniejszym badaniu nie były wcześniej identyfikowane z kulawiznami. Izolacja i hodowla tych patogenów jest trudna, co powoduje ograniczoną liczbę dostępnych źródeł oraz niedostateczny stopień zbadania problemu. W konsekwencji niezwykle trudno jest odnieść uzyskane wyniki do doniesień innych autorów. Jednocześnie podkreśla to potrzebę prowadzenia dalszych badań w tym obszarze.

5.1.2 Określenie morfologii i właściwości fizykochemicznych nanocząstek

NPs ze względu na swoje właściwości, wykazują szerokie spektrum zastosowań oraz wysoki potencjał wykorzystania w różnych dziedzinach, jednak ich aktywność zależy od charakterystyki fizykochemicznej (Khezerlou i wsp., 2018). Wszystkie NPs analizowane w doświadczeniu miały morfologię sferyczną. Wyjątkiem były CuNPs, u których trudno było określić morfologię ze względu na zanieczyszczenia prawdopodobnie w postaci soli miedzi powstałych w wyniku rozpuszczania się NPs. Mimo to nie stwierdzono nieprawidłowości w ich wyglądzie. Zaobserwowano jednak różnice w ich wielkości. AgNPs zastosowane w przeprowadzonych analizach miały wielkość 10 - 50 nm, podczas gdy NPs wykorzystane przez innych autorów były niemal dwukrotnie większe (35 - 100 nm) (Kalińska i wsp., 2019). W przypadku CuNPs ich wielkość wynosiła 1 - 10 nm, z kolei te zastosowane przez Kalińską i wsp. (2019) osiągały

rozmiary 0,5 - 80 nm. Potencjał zeta dla większości NPs osiągał wartości ujemne (od -3,66 do -26,2 mV), podczas gdy w przypadku CuNPs i AgCuNPs odnotowano wartości dodatnie (odpowiednio 7,75 mV i 15,63 mV). W przypadku PtNPs wartości były bliskie 0 (-3,66 mV), natomiast najdalej od 0 znajdowały się AgNPs (-26,2 mV). Podobne wyniki potencjału zeta otrzymano w przypadku AgNPs, jednak wystąpiły różnice w przypadku CuNPs, który w badaniu Kalińskiej i wsp. (2019) wynosił od -20,93 do -9,25 mV, podczas gdy w przeprowadzonym eksperymencie osiągnął wartość 7,75 mV. Średnica hydrodynamiczna odzwierciedla średnią wielkość aglomeratów, która różniła się w zależności od rodzaju NPs. Niektóre pojedyncze NPs, takie jak Cu i Fe miały tendencję do tworzenia większych aglomeratów, ale także kompleksy, takie jak AgAuNPs i AgFeNPs. NPs o najmniejszej skłonności do aglomeracji były PtNPs. Rozmiary badanych NPs różniły się między sobą. Największe rozmiary były charakterystyczne dla FeNPs i PtNPs (5 - 100 nm), podczas gdy AgNPs i AuNPs były mniejsze (odpowiednio 10 - 50 i 10 - 40 nm). Najmniejsze rozmiary osiągnęły CuNPs (1 - 10 nm). Różnice odnotowano także w średnicach hydrodynamicznych NPs gdzie AgNPs wykorzystane w badaniu wykazywały mniejszy potencjał do tworzenia aglomeratów. Wartość ta wynosiła 154,5 nm, podczas gdy u Kalińskiej i wsp. (2019) osiągała 262 nm. CuNPs zastosowane w przeprowadzonych doświadczeniach wykazywały niemal dwukrotnie większy potencjał aglomeracyjny (580,70 nm) w porównaniu z wynikami Kalińskiej i wsp. (2019) (288,6 nm).

5.1.3 Właściwości biobójcze AgNPs, AuNPs, CuNPs, FeNPs i PtNPs wobec bakterii wyizolowanych ze zmian chorobowych racic

Badania te wykazały różnice w żywotności patogenów po zastosowaniu NPs, zależne zarówno od zastosowanego stężenia jak i od rodzaju patogenu. AgNPs, AuNPs i CuNPs wykazały najsilniejsze działanie biobójcze wobec badanych mikroorganizmów przy wyższych stężeniach (12,5 - 25 mg/l). Najwyższe stężenie AuNPs (25 mg/l) obniżyło żywotność trzech szczepów - *S. paucimobilis*, *O. gallinifaecis* oraz *A. odontolyticus* - odpowiednio do 14,80 %, 14,76 % i 6,92 %. W przypadku AgNPs i CuNPs silny efekt biobójczy obserwowano już przy niższych stężeniach, odpowiednio 12,5 mg/l i 6,25 mg/l. AuNPs w stężeniach 1,56 mg/l i 3,125 mg/l stymulowały nieznaczny wzrost wybranych patogenów, z wyjątkiem *O. intermedium* I, natomiast CuNPs w stężeniu 1,56 mg/l

sprzyjały wzrostowi *A. odontolyticus*. Z kolei *S. paucimobilis* okazał się najbardziej wrażliwym patogenem na działanie badanych NPs. Najskuteczniejsze działanie przeciwbakteryjne wykazywały AgNPs, podczas gdy PtNPs i FeNPs charakteryzowały się najsłabszą aktywnością - w niektórych przypadkach nawet stymulowały wzrost bakterii, wskazując na ich brak biobójczego działania lub na zjawisko hormezy. Spośród wszystkich mikroorganizmów poddanych badaniom, na działanie FeNPs wrażliwość wykazał jedynie *O. intermedium* I, którego przeżywalność po zastosowaniu 25 mg/l obniżyła się jedynie o 9 %. W przypadku pozostałych stężeń i mikroorganizmów zaobserwowano spadek przeżywalności najwyżej o 2 % lub wzrost przeżywalności. Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku PtNPs, jednak w tym przypadku najwyższy spadek przeżywalności wyniósł 3 %, w przypadku pozostałych stężeń zaobserwowano obniżenie przeżywalności o 1 - 2 %, brak lub wzrost przeżywalności w zależności od stężenia NPs oraz badanego mikroorganizmu. Z tego względu FeNPs i PtNPs nie zostały wykorzystane w dalszej części doświadczeń.

5.1.4 Właściwości biobójcze kompleksów AgNP, AuNP i CuNP wobec bakterii wyizolowanych ze zmian chorobowych racic

Po zastosowaniu kompleksów NPs, we wszystkich przypadkach zaobserwowano spadek poziomu patogenów. Ich niższe stężenia wykazały silniejsze właściwości biobójcze w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla pojedynczych NPs. Niemniej jednak wyższe stężenia (12,5 mg/l) kompleksów NPs wykazały silniejsze działanie przeciwbakteryjne niż niższe stężenia (0,78 mg/l). Kompleksem, który wykazał najsilniejsze działanie przeciwbakteryjne był AgCuNPs, natomiast AuCuNPs działały nieco słabiej. AgCuNPs w stężeniu 6,25 mg/l zmniejszyły żywotność patogenów do 1,5 – 5 %. Podobnie jak w przypadku działania poszczególnych NPs - *S. paucimobilis* był najbardziej wrażliwy na działanie kompleksów, podczas gdy *O. intermedium* II był najbardziej odporny. Niemniej jednak poziom żywotności wszystkich patogenów uległy znacznemu obniżeniu przy zastosowaniu wybranych kompleksów NPs. W przypadku AgAuNPs poziom przeżywalności mikroorganizmów poddanych działaniu tego kompleksu wynosiło dla stężeń 1,56-12,5 mg/l od 2 - 12 %. Z kolei po zastosowaniu AgCuNPs przeżywalność dla zastosowanych w doświadczeniu stężeń wahała się w zależności od stężenia i badanego mikroorganizmu od 1 - 17 %. Kompleks AuCuNPs w

stężeniach 1,56 - 12,5 mg/l obniżył przeżywalność mikroorganizmów od 2,5 - 20 %, natomiast w przypadku *O. intermedium* II, *O. gallinifaecis* i *A. odontolyticus* po zastosowaniu stężenia 0,79 mg/l patogeny te osiągnęły przeżywalność na poziomie 89 %.

5.2 Doświadczenie 2

P2. Wierzbicki M, **Kot M**, Lange A, Kalińska A, Gołębiewski M, Jaworski S. Evaluation of the Antimicrobial, Cytotoxic, and Physical Properties of Selected Nano-Complexes in Bovine Udder Inflammatory Pathogen Control. *Nanotechnol Sci Appl*. 2024, 17, 77-94

5.2.1 Identyfikacja wyizolowanych mikroorganizmów

Z materiału biologicznego wyizolowano 10 mikroorganizmów: *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus sciuri*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter koseri*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* oraz *Prototheca* sp.,

5.2.2 Określenie morfologii i właściwości fizykochemicznych nanocząstek

Wszystkie NPs charakteryzowały się sferyczną morfologią i rozmiarami w zakresie: 20 - 60 nm (AgNPs), 10 - 50 nm (AuNPs), 10 - 20 nm (CuNPs), 10 - 70 nm (FeNPs) oraz 5 - 100 nm (PtNPs). W przypadku wielkości badanych NPs, niewielkie wymiary uzyskano dla AgAuNPs (do 50 - 60 nm) jednakże wielkość CuNPs była trudna do określenia ze względu na zanieczyszczenia i niską jakość. AgCuNPs i AuCuNPs osiągnęły największe rozmiary (do 100 - 120 nm). Wykazywały one ujemny potencjał zeta, przy czym najbardziej ujemny potencjał odnotowano w przypadku FeNPs i AgNPs (około -38 mV). AgCuNPs i AuCuNPs miały potencjał najbliższy 0 (odpowiednio -13,2 i -18,9), co może tłumaczyć ich gorszą stabilność dyspersji. Wszystkie ustalone wartości średnicy hydrodynamicznej osiągnęły wartości dodatnie: od 143,8 do 538 nm. Największe wartości stwierdzono dla CuNPs (538 nm), natomiast nieco mniejszą wartość uzyskano dla AuCuNPs (400,6 nm). Najmniejszą średnicę hydrodynamiczną uzyskano dla AgNPs.

5.2.3 Badanie żywotności komórek BME-UV1 i HMEC po ekspozycji na nanocząstki

Przeżywalność komórek BME-UV1 i HMEC oceniono za pomocą testu PrestoBlue HS (Invitrogen, Waltham, MA, USA), określającego aktywność metaboliczną (oksydoredukcyjną) komórek. Wyniki przeżywalności komórkowej po ekspozycji na NPs w stężeniach 0,1; 0,5; 1; 2 i 2,5 mg/l wykazały spadek przeżywalności w obu liniach komórkowych po ekspozycji na CuNPs w stężeniach wyższych niż 0,1 mg/l, podobnie jak w przypadku zastosowanych kompleksów zawierających CuNPs (AgCuNPs, CuPtNPs, AuCuNPs, CuFeNPs). W przypadku pozostałych NPs cytotoksyczność wobec komórek BME-UV1 nie występowała lub obserwowano ją jedynie przy najwyższym badanym stężeniu, jak w przypadku AgPtNPs i AgFeNPs. W komórkach HMEC po ekspozycji na PtNPs, FeNPs oraz na ich kompleksy odnotowano obniżenie przeżywalności o 10 - 15 % przy wyższych badanych stężeniach. Dla pozostałych NPs nie stwierdzono istotnej cytotoksyczności w żadnej z linii komórkowych. Dostępna literatura dotycząca tego typu badań jest ograniczona, choć istnieją doniesienia, że AuNPs wykazują toksyczność wobec różnych tkanek komórek ssaczych (Ahamed i wsp., 2010) wyniki te jednak nie zostały potwierdzone w przeprowadzonych analizach. Toksyczność AuNPs wobec komórek ludzkich była również analizowana w innych doświadczeniach. Uzyskane przez tych autorów wyniki wskazywały na brak cytotoksyczności wobec komórek (Connor i wsp., 2005), co pozostaje zgodne z rezultatami uzyskanymi w niniejszym eksperymencie.

5.2.4 Analiza żywotności mikroorganizmów wyizolowanych z mleka poddanych działaniu nanocząstek Ag, Au, Cu, Pt i Fe.

Spośród badanych NPs najsilniejszą aktywność przeciwbakteryjną wykazywały AgNPs. Najbardziej wrażliwym gatunkiem na ich działanie był *S. uberis*, dla którego przy stężeniach powyżej 6,25 mg/l przeżywalność wynosiła 0 %. Taki sam efekt odnotowano przy stężeniu 25 mg/l w przypadku *S. marcescens* oraz *C. koseri*. Chociaż *S. sciuri* był najbardziej oporną bakterią na działanie AgNPs, nawet przy najniższym badanym stężeniu (1,56 mg/l) jego przeżywalność wyniosła 16 %. W dostępnej literaturze dostępne są wyniki wskazujące, że AgNPs w stężeniu powyżej 6,25 mg/l hamował wzrost *S. aureus* oraz *S. uberis* (Wernicki i wsp., 2014). W przypadku *S. uberis* przeżywalność została zredukowana do zera już przy niższym stężeniu 6,25 mg/l, w porównaniu z wynikami

dotyczącymi *S. aureus* uzyskanymi przez Wernickiego i wsp. (2014). Żywotność *E. coli* osiągnęła 5 % przy stężeniu 12,5 mg/l AgNPs.

Nieco słabszą aktywność przeciwbakteryjną wykazywały CuNPs, przy czym *S. sciuri* był najbardziej wrażliwy na ich działanie. Badanie Wernickiego i wsp. (2014) wykazało również, że CuNPs w stężeniu 25 mg/l całkowicie hamował wzrost wszystkich patogenów. Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu wykazały natomiast, że nanocząstki te, przy tym samym stężeniu 25 mg/l, redukowały przeżywalność patogenów o 86 - 98 %. W niniejszym badaniu stężenie 12 mg/l AgNPs zastosowano wobec *S. aureus*, co poskutkowało redukcją przeżywalności o 86 % - wartości te są zatem zbliżone do wyników dostępnych w literaturze (Dehkordi i wsp., 2011).

AuNPs charakteryzowały się niższą skutecznością przeciwbakteryjną niż AgNPs i CuNPs. Najniższą podatność na działanie AuNPs wykazywał *S. sciuri*, dla której nawet przy najwyższym stężeniu przeżywalność utrzymywała się na poziomie 66 %. Również *E. coli* wykazywała niską podatność na AuNPs w zakresie stężeń 1,56 - 12,5 mg/l, przy których nie obserwowano istotnego wpływu lub odnotowano jedynie niewielkie obniżenie przeżywalności, maksymalnie o 3 %. Dopiero przy stężeniu 25 mg/l przeżywalność zmniejszyła się o 83 %. Najbardziej wrażliwym gatunkiem na AuNPs był *S. aureus*, u którego już najniższe badane stężenie (1,56 mg/l) obniżało przeżywalność o 74 %. Z kolei *S. uberis* wykazywał niską wrażliwość wobec AuNPs w zakresie 1,56-3,125 mg/l, jednak przy stężeniach powyżej 6,25 mg/l przeżywalność spadała do 0 %. Według wyżej wspomnianych autorów, AuNPs wykazywały słabszą aktywność przeciwdrobnoustrojową w porównaniu z AgNPs oraz CuNPs, co pozostaje zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszym badaniu.

PtNPs i FeNPs nie wykazywały istotnej aktywności przeciwbakteryjnej lub ich działanie było nieznaczne. Z tego względu zostały wykluczone z dalszej części eksperymentu obejmującej zastosowanie kompleksów NPs. W badaniu Wernickiego i wsp. (2014) PtNPs wykazywały najslabsze właściwości biobójcze spośród analizowanych NPs, natomiast wyniki niniejszego eksperymentu wskazują, że PtNPs nie tylko wykazywały słabe właściwości biobójcze powodując spadek żywotności patogenów wyłącznie przy najwyższym badanym stężeniu (10 mg/l) co wyniosło najwięcej o 9 % w przypadku *C. koseri*, natomiast dla pozostałych szczepów

bakteryjnych największe obniżenie przeżywalności wyniosło 6 %, lecz w niektórych przypadkach nie wykazywały one żadnego działania biobójczego.

W odniesieniu do grzybów związanych z *mastitis* PtNPs wykazywały głównie brak lub niewielką aktywność biobójczą, jednak przy stężeniu 10 mg/l przeżywalność *C. glabrata* osiągnęła 69 %. Na FeNPs najbardziej wrażliwa była *C. parapsylosis* dla zastosowanego stężenia 25 mg/l, co skutkowało obniżeniem przeżywalności o 37 %. Stosunkowo słabą aktywność przeciwgrzybiczą wykazywały również AuNPs. Najniższą podatnością na ich działanie charakteryzowała się *C. albicans*, u której spadek przeżywalności obserwowano jedynie przy stężeniach 1,56 i 25 mg/l. Najbardziej wrażliwym gatunkiem na AuNPs była *C. parapsylosis*, natomiast stężenie 25 mg/l obniżało przeżywalność *C. glabrata* o 63 %, co stanowiło największy spadek przeżywalności odnotowany dla tych NPs.

Nieco silniejszą aktywność przeciwgrzybiczą wykazywały CuNPs, szczególnie wobec *C. glabrata*, *C. parapsylosis* oraz *Prototheca* sp., u których przeżywalność obniżyła się o 23 - 34 % już po zastosowaniu najniższego stężenia (1,56 mg/l), natomiast przy najwyższym stężeniu (25 mg/l) spadła o 99 - 88 %.

Najsilniejszą aktywność przeciwgrzybiczą wykazywały AgNPs. Najbardziej wrażliwym mikroorganizmem na ich działanie była *Prototheca* sp., gdzie przy zastosowanym stężeniu 1,56 mg/l przeżywalność osiągała 21 %, natomiast po zastosowaniu najwyższego badanego stężenia (25 mg/l) spadła ona do 0 %. Inne badanie sugerowało, że AgNPs mogą stanowić rozwiązanie w kontroli tego patogenu (Ely i wsp., 2022), co pozostaje zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszym badaniu. Właściwości biobójcze AgNPs obserwowano dla *C. albicans* jedynie przy stężeniach wyższych niż 6,25 mg/l, przy których przeżywalność obniżała się o około 95 %.

5.2.5 Analiza żywotności mikroorganizmów wyizolowanych z mleka poddanych działaniu kompleksów nanocząstek Ag, Au i Cu

Spośród badanych kompleksów AuCuNPs wykazywały najniższą aktywność biobójczą. *E. coli*, *S. marcescens* oraz *C. koseri* należały do bakterii o najniższej podatności na działanie tego kompleksu, przy czym wyraźną aktywność biobójczą obserwowano przy stężeniach powyżej 6,25 mg/l. Stężenia 0,78 - 3,125 mg/l dla tych

patogenów nie wykazały istotnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej lub powodowały jedynie niewielkie obniżenie przeżywalności. W przypadku *S. marcescens*, *E. coli* oraz *C. koseri* przeżywalność osiągnęła 86 - 98 % w zależności od mikroorganizmu. Najbardziej wrażliwymi bakteriami na AuCuNPs były *S. sciuri* oraz *S. aureus*, u których przeżywalność przy najwyższym stężeniu osiągnęła 1,5 - 1,8 %.

Nieco wyższą aktywność przeciwbakteryjną wykazywały AgAuNPs, które całkowicie niszczyły komórki *S. uberis* przy stężeniach 6,25 - 12,5 mg/l. Wrażliwość na ten kompleks wykazała również *E. coli*, dla których przy najwyższym stężeniu przeżywalność wynosiła 1 %, a także *S. aureus* z przeżywalnością na poziomie 1,7 %. Najniższą podatność wykazywała natomiast *C. koseri*, dla której przeżywalność osiągnęła 94 % przy najniższym stężeniu (0,78 mg/l), natomiast przy 12,5 mg/l osiągała 7,6 %, co było porównywalne z wynikami uzyskanymi dla pozostałych patogenów.

Najsilniejszą aktywność biobójczą wykazywały AgCuNPs, które już przy najniższym stężeniu 0,78 mg/l obniżały przeżywalność patogenów, takich jak *S. uberis*, *S. sciuri*, *E. coli* i *S. aureus* o 95 - 97 %. W zakresie stężeń 6,25 - 12,5 mg/l dla tego kompleksu *S. uberis* wykazywał 0 % przeżywalności, podobnie jak *S. marcescens* przy stężeniu 12,5 mg/l. *C. koseri* charakteryzował się najniższą podatnością przy najniższym badanym stężeniu (0,78 mg/l), jednak nawet w tych warunkach przeżywalność obniżała się o około 60 %.

Wyniki analizy przeżywalności grzybów i glonów poddanych działaniu kompleksów NPs były zbliżone do rezultatów uzyskanych dla bakterii. Najsłabszą aktywność przeciwgrzybiczą wykazywały AuCuNPs. Największą oporność na ich działanie wykazywała *C. parapsilosis*, u której zastosowanie stężenia 12,5 mg/l obniżało przeżywalność o 13 %. Chociaż *C. albicans* wykazywała niską wrażliwość na ten kompleks, zastosowanie najwyższego stężenia prowadziło do spadku przeżywalności wynoszący 12,6 %. *C. glabrata* była najbardziej wrażliwym drożdżakiem na działanie AuCuNPs - już najniższe stężenie obniżało jej przeżywalność o prawie 50 %, natomiast najwyższe powodowało spadek o 80 %.

Największą wrażliwość na AgAuNPs i AgCuNPs wykazywała *Prototheca* sp., u której najwyższe stężenie 12,5 mg/l prowadziło do całkowitego zniszczenia komórek. W przypadku pozostałych patogenów wraz ze wzrostem stężenia AgAuNPs obserwowano nasilenie aktywności przeciwgrzybiczej. *C. parapsilosis* wykazywała największą

oporność na kompleks AgCuNPs, mimo to przy stężeniu 6,25 - 12,5 mg/l odnotowano 95 % spadek przeżywalności.

NPs posiadają zdolność do synergistycznych interakcji, dzięki czemu ich kompleksy mogą wykazywać silniejsze właściwości biobójcze przy niższych stężeniach niż wyższe stężenia pojedynczych nanocząstek (Kalińska i wsp., 2019). Teoria ta została potwierdzona w pozostałych badaniach (Kot i wsp., 2023) i pozostaje zgodna z wynikami uzyskanymi w niniejszym badaniu.

5.3 Doświadczenie 3

P3. Kot, M.; Lange, A.; Jabłońska, W.; Kalińska, A.; Nasiłowska, B.; Skrzeczanowski, W.; Gołębiowski, M. Nanoparticles as New Antifungals in the Prevention of Bovine Mycotic Mastitis Caused by *Candida* spp. and *Diutina* spp.—*In Vitro* Studies. *Molecules* 2025, 30, 2086.

5.3.1 Identyfikacja wyizolowanych mikroorganizmów

W przeprowadzonych badaniach wyizolowano i zidentyfikowano następujące grzyby: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Diutina rugosa* var. *rugosa*, *Diutina catenulata*, *Diutina rugosa*.

5.3.2 Określenie morfologii i właściwości fizykochemicznych nanocząstek

Wszystkie badane NPs wykazywały sferyczną morfologię, co jest zgodne z typową charakterystyką tych układów i wskazuje na ich względnie jednorodną strukturę. Jedynie w przypadku CuNPs obserwowano nieregularny kształt, co może sugerować obecność zanieczyszczeń lub nieprawidłowości związanych z procesem syntezy. Potencjał zeta badanych NPs przyjmował zróżnicowane wartości, jednak we wszystkich przypadkach był ujemny, co wskazuje na obecność ujemnego ładunku powierzchniowego. CuNPs charakteryzowały się najmniej ujemnym potencjałem zeta (-3,5 mV), co sugeruje ich niską stabilność koloidalną; wartość ta może również wskazywać na nieprawidłowości fizykochemiczne wynikające z procesu ich wytwarzania. Spośród pojedynczych NPs najbardziej ujemny potencjał zeta wykazywały

AgNPs (-35,2 mV), natomiast wśród kompleksów najniższą wartość odnotowano dla AgPtNPs (-38,1 mV). Wartości średnicy hydrodynamicznej były zróżnicowane w zależności od rodzaju NPs. Największe wartości dla pojedynczych NPs odnotowano w przypadku FeCNPs (746,9 nm) oraz CuNPs (652,1 nm), natomiast spośród kompleksów największą średnicę hydrodynamiczną wykazywały CuFeCNPs (743,7 nm). Najmniejsze wartości uzyskano dla AgNPs (201,6 nm), a wśród kompleksów dla AgPtNPs (106,1 nm).

5.3.3 Analiza żywotności grzybów wyizolowanych z mleka poddanych działaniu nanocząstek Ag, Au, Cu, Pt i Fe

Spośród badanych NPs, AgNPs wykazywały zbliżony poziom aktywności biobójczej niezależnie od zastosowanego stężenia, jednak efekt ten był zróżnicowany w zależności od gatunku grzyba. Największą wrażliwość na ich działanie wykazywały *D. rugosa* oraz *C. albicans*, dla których przeżywalność w całym zakresie badanych stężeń utrzymywała się na poziomie 5 - 7 %. Zbliżone wartości przeżywalności odnotowano również dla *D. catenulata* oraz *C. parapsilosis*, gdzie przy najwyższym stężeniu (25 mg/l) wynosiła ona 8 %, natomiast przy najniższym 6 %. W przypadku *C. glabrata* przeżywalność przy najniższym zastosowanym stężeniu była wyższa i wynosiła 22 %. Inne badania wykazały, że AgNPs posiadają silne właściwości przeciwgrzybicze wobec różnych szczepów grzybów, w tym *C. albicans* oraz *C. glabrata* (Zhang i wsp., 2016), co jest zgodne z otrzymanymi wynikami. Dane literaturowe potwierdzają wrażliwość grzybów z rodzaju *Candida* na AgNPs (Kim i wsp., 2008), co pozostaje zgodne z wynikami przeprowadzonego badania, w którym wszystkie trzy szczepy *Candida* wykazywały wysoką wrażliwość na AgNPs. Wyniki przeprowadzonych badań są zgodne z dostępnymi obserwacjami innych autorów dotyczące *C. glabrata*, gdzie szczep ten wykazywał niską przeżywalność przy wyższych stężeniach AgNPs (Hasanin i wsp., 2022).

W przypadku AuNPs przeżywalność patogenów wzrastała wraz ze spadkiem ich stężenia. AuNPs wykazywały słabszą aktywność biobójczą w porównaniu do AgNPs. Najniższą wrażliwość na działanie AuNPs wykazywały *C. albicans* oraz *C. glabrata*, dla których przeżywalność wzrastała z 5 - 22 % przy stężeniach 25 - 6,25 mg/l do 104 % przy stężeniach 3,125 - 1,56 mg/l, co może świadczyć o pojawieniu się zjawiska hormezy. W przypadku *C. parapsilosis* przeżywalność w całym zakresie badanych stężeń wynosiła 6

- 24 %, jednak przy najniższym stężeniu (1,56 mg/l) odnotowano jej wzrost powyżej 100%. *D. catenulata* oraz *D. rugosa* var. *rugosa* były najbardziej wrażliwymi patogenami na działanie AuNPs, dla których przeżywalność przy najwyższym stężeniu wynosiła 5 – 7 %, natomiast przy najniższym stężeniu (1,56 mg/l) osiągała 11 – 15 %. W innym badaniu *C. albicans* wykazywała zróżnicowaną oporność na AuNPs, natomiast *C. parapsilosis* była wrażliwa na te NPs (Wierzbicki i wsp., 2024). W przeprowadzonym badaniu *C. parapsilosis* również wykazywała podatność na AuNPs, szczególnie przy stężeniach wyższych niż 6,25 mg/L. Podczas gdy badanie Wierzbickiego i wsp. (2024) wykazało redukcję przeżywalności *C. glabrata* po zastosowaniu 25 mg/l AuNPs o 63 %, z kolei w przeprowadzonym badaniu przeżywalność tego szczepu została zredukowana aż o 78 % także przy najwyższym stężeniu wynoszącym 25 mg/L. Khezerlou i wsp. (2018) przeprowadzili badania z wykorzystaniem AuNPs, wykazując ich skuteczność wobec *C. albicans*. W przeprowadzonych analizach AuNPs były skuteczne wobec większości badanych szczepów jedynie przy wyższych stężeniach.

Badania wykazały, że CuNPs wykazywały wyższą aktywność przeciwgrzybiczą w porównaniu do AuNPs, jednak niższą niż AgNPs. *D. catenulata* była najbardziej wrażliwym patogenem na działanie CuNPs; przy stężeniach 6,25 - 25 mg/l przeżywalność była bardzo niska i wynosiła około 2 %, natomiast przy stężeniach 1,56 i 3,125 mg/l wartości te wzrastały nieznacznie, osiągając 4 – 5 %. W przypadku *C. albicans*, *C. glabrata*, *D. rugosa* oraz *D. rugosa* var. *rugosa* wyższe stężenia (12,5 i 25 mg/l) obniżały przeżywalność do poziomu 1 – 7 %, natomiast wraz ze spadkiem stężenia obserwowano jej wzrost, w niektórych przypadkach przekraczający 100%. Dla *C. parapsilosis* przeżywalność przy stężeniach 6,25 - 25 mg/l mieściła się w zakresie 3 – 8 %.

FeCNPs wykazywały niższą aktywność przeciwgrzybiczą w porównaniu do CuNPs. W przypadku *C. albicans*, *D. catenulata*, *D. rugosa* oraz *D. rugosa* var. *rugosa*, przy zastosowaniu najwyższych stężeń przeżywalność tych patogenów mieściła się w zakresie 37 – 61 %, natomiast wraz ze spadkiem stężenia obserwowano jej wzrost. Najniższą podatność na działanie FeCNPs wykazywała *C. glabrata*, dla której nawet najwyższe stężenia charakteryzowały się niską lub brakiem aktywności przeciwgrzybiczej. Najbardziej wrażliwym patogenem była natomiast *D. rugosa* var. *rugosa*. Dane literaturowe wskazują, że FeNPs wykazują aktywność przeciwgrzybiczą wobec *Candida* spp. (Yehia & Ali, 2020). W porównaniu z zastosowanym przez autorów FeCNPs skutecznie hamowały one wzrost *C. albicans* oraz *C. parapsilosis*.

PtNPs wykazywały najniższą aktywność przeciwgrzybiczą spośród wszystkich badanych NPs. W przypadku analizowanych szczepów obserwowano jedynie niewielkie obniżenie przeżywalności lub jego brak, nawet przy najwyższych stosowanych stężeniach. PtNPs nie wywierały istotnego wpływu na przeżywalność grzybów nawet przy najwyższych badanych stężeniach. Ze względu na niską aktywność przeciwgrzybiczą FeCNPs i PtNPs nie zostały one uwzględnione w dalszych badaniach nad ich zastosowaniem w kompleksach NPs.

5.3.4 Analiza żywotności grzybów wyizolowanych z mleka poddanych działaniu kompleksów nanocząstek Ag, Au i Cu

Kompleksy NPs wykazywały efekt synergiczny i charakteryzowały się wyższą aktywnością przeciwgrzybiczą niż pojedyncze NPs, choć w różnym stopniu. AgAuNPs wykazywały podobną zależność jak AgNPs, bez wyraźnych zmian przeżywalności w zależności od stężenia. *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *D. catenulata*, *D. rugosa* oraz *D. rugosa* var. *rugosa* były najbardziej wrażliwe na działanie tego kompleksu, a przeżywalność w całym zakresie stężeń wynosiła 5 – 8 %. W przypadku *C. glabrata* obserwowano niższą skuteczność działania, przy czym przeżywalność mieściła się w zakresie 25 – 35 % w zależności od stężenia.

AgCuNPs wykazywały najwyższą aktywność przeciwgrzybiczą spośród wszystkich badanych NPs i ich kompleksów. W przypadku *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *D. catenulata*, *D. rugosa* oraz *D. rugosa* var. *rugosa* przeżywalność przy najwyższym stężeniu wynosiła około 2 %. Nieco niższą wrażliwość obserwowano dla *C. glabrata*, dla której przeżywalność wynosiła około 10 %. Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że kompleks AgCuNPs zastosowany w niniejszym badaniu wykazuje istotną skuteczność przeciwdrobnoustrojową, zgodną z obserwacjami pozostałych autorów (Długosz i wsp., 2025). Zastosowanie tego kompleksu poskutkowało znacznie wyższą skutecznością przeciwdrobnoustrojową niż zastosowanie każdego z tych NPs oddzielnie (Martín-Perales i wsp., 2025).

AuCuNPs wykazywały najniższą aktywność przeciwgrzybiczą spośród wszystkich badanych kompleksów, jednak ich działanie pozostawało istotne. Najbardziej wrażliwymi patogenami były *D. catenulata* oraz *D. rugosa* var. *rugosa*, dla których najwyższe stężenie obniżało przeżywalność do poziomu 1 – 6 %, natomiast przy

najniższym stężeniu obserwowano jej wzrost do 20 – 41 %. Stężenia 12,5 - 25 mg/l wykazywały najwyższą aktywność przeciwgrzybiczą wobec *C. albicans* oraz *C. glabrata*, obniżając ich przeżywalność do 1 – 11 %, natomiast przy niższych stężeniach (1,56 - 6,25 mg/l) obserwowano jej wyraźny wzrost przeżywalności. W przypadku *C. parapsilosis* oraz *D. rugosa* również odnotowano wysoką aktywność kompleksu, przy czym dla stężeń do 6,25 mg/l przeżywalność mieściła się w zakresie 1 – 10 %. W przypadku AuCuNPs stężenie 12,5 mg/L powodowało u Wierzbickiego i wsp (2024) redukcję *C. albicans* i *C. glabrata* o ok. 80 %, natomiast w przeprowadzonym badaniu własnym przy 12,5 mg/l wzrost został zahamowany o ok. 90 %.

5.3.5 Wyniki testu dyfuzyjno - krążkowego na wrażliwość grzybów na leki przeciwgrzybicze

Największą strefę zahamowania wzrostu (40 mm) odnotowano dla *C. parapsilosis* po zastosowaniu preparatu KCA10, natomiast w przypadku CTM10 strefa ta wynosiła 34 mm. Szczep *C. glabrata* po zastosowaniu 1 µg flucytozyny (FY1) wykazywał strefę zahamowania o średnicy 32 mm. Preparat KCA10 wykazywał wysoką skuteczność wobec *D. catenulata* i *D. rugosa*, dla których średnice stref zahamowania wynosiły po 30 mm. Inne badanie, przeprowadzone przez Hasanina i wsp. (2022) z udziałem *C. albicans*, *C. tropicalis*, *P. kudriavzevii* oraz *C. glabrata*, wykazało, że wszystkie izolaty *Candida* były wrażliwe na KCA, a strefy zahamowania wzrostu wynosiły od 24,7 mm do 34,3 mm. W otrzymanych wynikach strefa zahamowania wzrostu dla jednego ze szczepów - *C. glabrata* - była mniejsza (14 mm średnicy). Po zastosowaniu innych leków przeciwgrzybiczych wobec *C. glabrata* w przeprowadzonych analizach wykazano jednak, że szczep ten był wrażliwy na FY1, dla którego średnica strefy zahamowania wynosiła 32 mm. Ludwig i wsp. (2019) wskazali również, że spośród badanych leków przeciwgrzybiczych największą skuteczność wobec ich szczepów wykazywały KCA oraz FY. Pozostaje to zgodne z otrzymanymi wynikami, w którym największą średnicę strefy zahamowania uzyskano dla KCA (22 mm). FY wykazywał natomiast niższą skuteczność. Najniższą aktywność przeciwgrzybiczą wykazywał flukonazol 10 µg (FCN10) wobec *C. parapsilosis*, *D. rugosa* oraz *D. catenulata*, dla których nie obserwowano stref zahamowania wzrostu (0 mm). Inne dane publikacyjne wskazywały wartości MIC dla komercyjnych leków przeciwgrzybiczych wobec *D. rugosa*. Wyniki wskazały, że FCN

(MIC ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$) również wykazywał skuteczność (Montoya i wsp., 2019), jednak w wyniku przeprowadzonego badania FCN10 nie był skuteczny (średnica strefy zahamowania: 0 mm). W przypadku szczepu *D. rugosa* var. *rugosa* po zastosowaniu AMB20 uzyskano strefę zahamowania o średnicy 6 mm, podobnie jak dla *C. parapsilosis*. Preparat AMB20 wykazywał zróżnicowaną skuteczność w zależności od szczepu - dla *C. albicans*, *C. glabrata*, *D. catenulata* oraz *D. rugosa* uzyskano strefy zahamowania o średnicy 10 mm, natomiast dla *C. parapsilosis* i *D. rugosa* var. *rugosa* wartości te wynosiły odpowiednio 8 mm i 6 mm. Dodatkowo w przypadku *C. glabrata* odnotowano strefy zahamowania o średnicy 4 mm dla CTM10 oraz 8 mm dla FCN10. Z kolei inne doniesienie wskazuje wrażliwość *C. parapsilosis* szczególnie na AMB, CTM10, NY100 oraz KCA (100 mg) (Sukumar, 2012). Jednocześnie jedynie 30 % badanych szczepów wykazywało wrażliwość na FCN (10 mg).

5.4 Doświadczenie 4

P4. Kot, M.; Jabłońska, W.M.; Lange, A.; Kalińska, A.; Gołębiewski, M. Nanomaterials in the Management of Fungal Udder Inflammation in Cattle as an Effective Preventive Strategy Based on In Vitro Studies. *Biology* 2026, 15, 412

5.4.1 Identyfikacja wyizolowanych grzybów

Wyniki identyfikacji patogenów wykazały, że wyizolowane szczepy to: *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamomyces pararugosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida mucoides*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida hofmannii*, *Kluyveromyces marxianus*.

5.4.2 Morfologia nanocząstek i właściwości fizykochemicznych nanocząstek

Morfologia badanych NPs wykazała prawidłowy, sferyczny kształt, co jest zgodne z typowymi cechami tych układów. Jedynie w przypadku CuNPs zaobserwowano obecność zanieczyszczeń, prawdopodobnie związanych z procesem ich syntezy. Potencjał zeta badanych NPs był zróżnicowany. Największą stabilność wykazywały FeCNPs, natomiast nieco większe wahania pomiarowe odnotowano dla PtNPs.

Największe zróżnicowanie wartości obserwowano dla AgNPs, AuNPs oraz CuNPs. Analiza rozkładu wielkości wykazała obecność różnych frakcji wielkościowych w zależności od rodzaju NPs. W przypadku AgNPs, FeCNPs i PtNPs obserwowano dwie frakcje wielkościowe, dla AuNPs jedną frakcję, natomiast dla CuNPs aż trzy odrębne frakcje wielkościowe. Nie mniej jednak nie zaobserwowano anomalii w morfologii czy właściwościach fizykochemicznych NPs.

5.4.3 Analiza żywotności grzybów wyizolowanych z mleka poddanych działaniu nanocząstek Ag, Au, Cu, Pt i FeC

Najwyższą przeżywalność po ekspozycji na AgNPs obserwowano dla *S. cerevisiae*, gdzie przy stężeniu 25 mg/l wynosiła ona 119 %, a przy 3,125 mg/l również przekraczała wartości obserwowane w kontroli; dla pozostałych stężeń mieściła się w zakresie 90 - 96 %. AgNPs wykazywały stosunkowo niską aktywność wobec *C. hoffmannii*, dla której przeżywalność wynosiła 50 % przy najwyższym stężeniu oraz 35 % przy najniższym. W przypadku *W. pararugosa* przeżywalność dla stężeń 25 i 1,5 mg/l wynosiła 20 - 26 %. Największą wrażliwość na działanie AgNPs wykazywały *C. mucoides* oraz *W. anomalus*, dla których obserwowano wyraźne obniżenie przeżywalności w całym zakresie badanych stężeń. Dostępne dane literaturowe wskazują, że zastosowanie AgNPs oraz jonów srebra (Ag⁺) wobec *S. cerevisiae* skutecznie redukowało przeżywalność komórek tego patogenu (Kudrinskiy i wsp., 2014), jednak wyniki te nie były zgodne z rezultatami uzyskanymi w przeprowadzonym eksperymencie, gdzie najniższy odnotowany poziom przeżywalności dla *S. cerevisiae* wynosił aż 90,77 %. Inni autorzy badając AgNPs oraz AuNPs, wykazali ich aktywność biobójczą wobec patogenów wywołujących *mastitis* (Neculai-Valeanu i wsp., 2021), jednakże jak wspomniano wcześniej w przeprowadzonym badaniu AgNPs nie wykazywały skuteczności wobec *S. cerevisiae*. W kolejnym badaniu inni autorzy wykazali, że AgNPs otrzymane metodą zielonej syntezy wykazywały właściwości biobójcze wobec *P. kudriavzevii* oraz *W. anomalus* przy stężeniach odpowiednio 20 i 10 mg/L, całkowicie redukując przeżywalność tych szczepów do 0 %. Niższe stężenia również wykazywały właściwości biobójcze, jednak nie prowadziły do całkowitego zniszczenia komórek analizowanych szczepów (Motrenko i wsp., 2025). Porównując te dane z wynikami uzyskanymi w niniejszym badaniu, można stwierdzić, że skuteczność

AgNPs różniła się od tej opisanej w cytowanej publikacji. W przypadku *P. kudriavzevii* żadne z zastosowanych stężeń nie wykazywało pełnej aktywności biobójczej prowadzącej do 100 % redukcji przeżywalności szczepu. Szczep ten był jednak podatny na działanie AgNPs, przy czym zarówno najniższe, jak i najwyższe zastosowane stężenia wykazywały zbliżony efekt biobójczy skutkując w osiągnięciu przez mikroorganizmy przeżywalności 20 - 30 %. W badaniu Motrenko i wsp. (2025) *W. anomalus* wykazywał wysoką oporność, natomiast w przeprowadzonym badaniu jego przeżywalność była niska i porównywalna z *P. kudriavzevii*. Z kolei w cytowanej pracy stężenie 10 mg/L wobec *W. pararugosa* prowadziło do całkowitego zniszczenia komórek tego szczepu, podczas gdy w otrzymanych wynikach nawet stężenie 25 mg/L nie wykazywało tak silnego działania.

AuNPs wykazywały niską aktywność przeciwgrzybiczą ponownie wobec *S. cerevisiae*. W przypadku *K. marxianus* przeżywalność dla stężeń 6,25 - 25 mg/l wynosiła 16 - 18 %, natomiast przy niższych stężeniach obserwowano jej gwałtowny wzrost. Podobną zależność odnotowano dla *C. hoffmannii*, gdzie przeżywalność wzrastała od 36 % do 148,8 % wraz ze spadkiem stężenia. W przypadku *C. mucoides* wyższe stężenia (12,5 - 25 mg/l) obniżały przeżywalność do 7 - 9 %, natomiast przy niższych stężeniach obserwowano jej wzrost. Podobny efekt obserwowano dla *W. anomalus*, gdzie przy stężeniach 6,25 - 25 mg/l przeżywalność wynosiła około 10%, natomiast przy niższych stężeniach wzrastała do 54 % i 145 %. W przypadku *W. pararugosa* przeżywalność pozostawała zbliżona do wartości kontrolnych, natomiast dla *P. kudriavzevii* wynosiła około 7 % w większości stężeń, z wyjątkiem najniższego, gdzie była wyższa.

Największą wrażliwość na CuNPs wykazywała *W. pararugosa*, dla której przeżywalność wynosiła 5 % przy najwyższym stężeniu oraz 19,5 % przy najniższym. W przypadku *C. mucoides* i *P. kudriavzevii* wyższe stężenia (12,5 i 25 mg/l) obniżały przeżywalność do 1 - 7 %, natomiast przy niższych stężeniach obserwowano jej wzrost. Dla *K. marxianus* i *W. anomalus* przeżywalność przy stężeniach 6,25 - 25 mg/l wynosiła 3 - 8 %. *S. cerevisiae* wykazywała wyższe wartości przeżywalności niż pozostałe szczepy, natomiast w przypadku *P. kudriavzevii* wysokie stężenia obniżały przeżywalność do 2 %, podczas gdy przy niskich stężeniach utrzymywała się ona na poziomie około 100 %.

FeCNPs wykazywały ograniczoną aktywność przeciwgrzybiczą. Największą wrażliwość obserwowano dla *P. kudriavzevii*, dla której przeżywalność wynosiła 16 % przy najwyższym stężeniu i wzrastała do 41 % przy najniższym. W przypadku *W.*

pararugosa przeżywalność wynosiła 28 % przy najwyższym stężeniu oraz 40 % przy najniższym. Najniższą podatność na działanie FeCNPs wykazywały *C. hoffmannii*, *S. cerevisiae* oraz *C. mucoides*.

PtNPs wykazywały najniższą aktywność przeciwgrzybiczą spośród wszystkich badanych NPs. Jedynie w przypadku *W. pararugosa* obserwowano wyraźne obniżenie przeżywalności, mieszczące się w zakresie 49 – 68 % w zależności od zastosowanego stężenia.

5.4.4 Analiza żywotności grzybów wyizolowanych z mleka poddanych działaniu kompleksów nanocząstek Ag, Au i Cu

Największą wrażliwość na działanie AgAuNPs wykazywała *P. kudriavzevii*, dla której przeżywalność we wszystkich badanych stężeniach mieściła się w zakresie 5 - 8 %. W przypadku *C. hoffmannii* przeżywalność wynosiła 25 - 35 % w zależności od stężenia. Nieco niższą, ale porównywalną wrażliwość obserwowano dla *C. mucoides* oraz *W. anomalus*, dla których odnotowano wyraźne obniżenie przeżywalności w całym zakresie badanych stężeń. Najniższą podatność na działanie tego kompleksu wykazywała *S. cerevisiae*, dla której przeżywalność była wyższa niż w przypadku pozostałych szczepów, szczególnie przy najniższym stężeniu.

AgCuNPs wykazywały najwyższą aktywność przeciwgrzybiczą spośród badanych kompleksów. W przypadku *P. kudriavzevii* przeżywalność przy najwyższym stężeniu wynosiła około 2 %, natomiast wraz ze spadkiem stężenia obserwowano jej wzrost, osiągający 4 - 7 % przy najniższym stężeniu. *C. hoffmannii*, *W. pararugosa* oraz *K. marxianus* wykazywały przeżywalność w zakresie 5 - 27 % w zależności od stężenia. Najniższą wrażliwość ponownie obserwowano dla *S. cerevisiae*, dla której przeżywalność przy najwyższym stężeniu wynosiła około 44 %.

Największą wrażliwość na działanie AuCuNPs wykazywała *W. pararugosa*, dla której najwyższe stężenie obniżało przeżywalność do 1 - 6 %, natomiast przy najniższym stężeniu obserwowano jej wzrost do 20 - 41 %. W przypadku *K. marxianus* przy stężeniach 25 - 6,25 mg/l przeżywalność wynosiła 4 - 10 %. *P. kudriavzevii* wykazywała wysoką wrażliwość na działanie tego kompleksu w większości badanych stężeń, natomiast przy najniższym stężeniu przeżywalność osiągała wartość zbliżoną do kontroli.

Podobnie jak w przypadku pozostałych kompleksów, *S. cerevisiae* wykazywała najniższą podatność na działanie AuCuNPs, utrzymując wyższą przeżywalność w całym zakresie badanych stężeń.

5.4.5 Wyniki testów dyfuzyjno-krażkowych z użyciem substancji przeciwgrzybiczych

Najwyższą aktywność przeciwgrzybiczą wykazywały CTM10 oraz KCA10, dla których w przypadku *W. pararugosa* odnotowano strefy zahamowania o średnicy odpowiednio 52 mm i 40 mm. Szczep *K. marxianus* wykazywał również wysoką wrażliwość na CTM10, osiągając strefę zahamowania o średnicy 32 mm. Wysoką skuteczność obserwowano także dla FCN25 wobec *W. pararugosa*, gdzie średnica strefy zahamowania wynosiła 30 mm. KCA10 wykazywał ponadto wysoką aktywność wobec *C. mucoides* (30 mm) oraz *W. anomalus* (38 mm). Wyniki te wskazują, że skuteczność poszczególnych substancji przeciwgrzybiczych była zależna od badanego szczepu. Najniższą aktywność przeciwgrzybiczą wykazywał FCN10 wobec *P. kudriavzevii* i *W. anomalus*, dla których nie obserwowano stref zahamowania wzrostu. Najmniejsze wartości odnotowano również dla AMB20 w przypadku *P. kudriavzevii* (3 mm) oraz dla *K. marxianus* (4 mm). W przypadku *W. pararugosa* po zastosowaniu FCN10 uzyskano strefę zahamowania o średnicy 4 mm. Zastosowanie NY100 wobec *P. kudriavzevii* skutkowało strefą zahamowania o średnicy 7 mm, natomiast dla *W. anomalus* po użyciu FCN10 wynosiła ona 6 mm. ECN10 wykazywał ograniczoną aktywność wobec *P. kudriavzevii* (4 mm), natomiast dla pozostałych szczepów wartości stref zahamowania mieściły się w zakresie 14 - 22 mm, przy czym najwyższe wartości obserwowano dla *C. mucoides* oraz *W. pararugosa* (22 mm). AMB20 wykazywał najniższą skuteczność wobec *P. kudriavzevii*, natomiast dla *W. pararugosa* zastosowanie FCN25 prowadziło do uzyskania jednej z największych stref zahamowania (30 mm). Najniższą podatność na działanie substancji przeciwgrzybiczych wykazywała *P. kudriavzevii*, dla której obserwowano najniższe wartości stref zahamowania. Z kolei *W. pararugosa* charakteryzowała się najwyższą wrażliwością, wykazując liczne duże strefy zahamowania, w tym 40 mm dla KCA10. Wyniki dostępnej literatury wykazały, że AMB stanowi skuteczną terapię przeciwgrzybiczą wobec większości znanych szczepów (Stavrou i wsp., 2020). Wyniki te nie są jednak w pełni zgodne z rezultatami uzyskanymi

w niniejszym badaniu, w którym żaden ze szczepów nie wykazywał wrażliwości na ten lek przeciwgrzybiczy. W przeprowadzonym badaniu AMB20 powodował powstawanie najmniejszych stref zahamowania wzrostu dla analizowanych grzybów, osiągając maksymalną wartość 16 mm dla szczepu *W. pararugosa*. Skuteczność tego leku była jednak zależna od badanego szczepu. Stavrou i wsp. (2020) wykazali również - podobnie jak w niniejszej pracy - że *K. marxianus* oraz *W. anomalus* były względnie odporne na działanie AMB20. Wyniki własne wykazały, że *K. marxianus* był najbardziej opornym patogenem wobec AMB20, co potwierdzała strefa zahamowania wzrostu o średnicy jedynie 2 mm, podczas gdy w badaniu Stavrou i wsp. (2020) szczep ten wykazywał niskie wartości MIC dla AMB20. W tej samej pracy FY charakteryzował się niskimi wartościami MIC wobec szczepów *K. marxianus*, wynoszącymi średnio 0,752 mg/L, natomiast w niniejszym badaniu średnica strefy zahamowania wzrostu klasyfikowała ten szczep jako oporny. Najwyższe średnie wartości stref zahamowania obserwowano dla KCA10 w odniesieniu do różnych szczepów, mieszczące się w zakresie 14 - 40 mm. Najniższe średnie wartości odnotowano dla FY1, który w wielu przypadkach nie wykazywał aktywności przeciwgrzybiczej. Uzyskane wyniki wskazują, że KCA10 i CTM10 należały do najbardziej skutecznych substancji, podczas gdy FY1 i FCN10 wykazywały ograniczoną aktywność. *P. kudriavzevii* była jednym z najbardziej opornych patogenów, co potwierdzają niskie wartości stref zahamowania. Dane literaturowe wskazują, że *P. kudriavzevii* wykazuje oporność na FCN (Ordaya i wsp., 2023), co zostało również potwierdzone w niniejszym badaniu. Inni autorzy przeprowadzili badania nad wrażliwością *D. rugosa* na AMB, FY oraz FCN, wykazując oporność tego szczepu na wszystkie wymienione substancje (Ming i wsp., 2019). W przeciwieństwie do tych wyników, w naszym badaniu potwierdzono wrażliwość *D. rugosa* na FCN25.

6. Podsumowanie i wnioski

6.1 Doświadczenie 1

P1. Kot, M.; Kalińska, A.; Jaworski, S.; Wierzbicki, M.; Smulski, S.; Gołębiewski, M. *In Vitro* Studies of Nanoparticles as a Potentially New Antimicrobial Agent for the Prevention and Treatment of Lameness and Digital Dermatitis in Cattle. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 6146

Przeprowadzone badania stanowią istotny wkład w poszukiwanie alternatywnych metod zwalczania chorób racic u bydła, w szczególności kulawizn. W pracy oceniono właściwości przeciwdrobnoustrojowe NPs wobec mikroorganizmów wyizolowanych z materiału biologicznego pochodzącego od krów z objawami kulawizn, takich jak *S. paucimobilis*, *O. intermedium*, *O. gallinifaecis* oraz *A. odontolyticus*. Należy podkreślić, że drobnoustroje te nie były wcześniej jednoznacznie wiązane z kulawiznami, co rozszerza aktualny stan wiedzy na temat etiologii tej choroby.

Uzyskane wyniki wykazały, że właściwości biobójcze NPs są zależne od ich rodzaju oraz stężenia. Najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazały AgNPs oraz CuNPs, które znacząco redukowały przeżywalność badanych patogenów nawet przy stosunkowo niskich stężeniach. PtNPs oraz FeNPs wykazywały bardzo ograniczoną aktywność, a w niektórych przypadkach obserwowano nawet wzrost przeżywalności bakterii, co wyklucza ich zastosowanie terapeutyczne w analizowanym zakresie.

Szczególnie istotnym wynikiem było potwierdzenie efektu synergii pomiędzy NPs. Nanokompleksy, zwłaszcza AgCuNPs, wykazywały wyraźnie silniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe niż pojedyncze NPs, prowadząc do niemal całkowitej redukcji przeżywalności patogenów nawet przy niższych stężeniach. Jednocześnie wykazano zróżnicowaną wrażliwość poszczególnych drobnoustrojów, co potwierdza złożony, wieloczynnikowy charakter kulawizn.

6.2 Doświadczenie 2

P2. Wierzbicki M, Kot M, Lange A, Kalińska A, Gołębiewski M, Jaworski S. Evaluation of the Antimicrobial, Cytotoxic, and Physical Properties of Selected Nano-Complexes in Bovine Udder Inflammatory Pathogen Control. *Nanotechnol Sci Appl.* 2024, 17, 77-94

Badania koncentrowały się na ocenie potencjału NPs jako alternatywy dla antybiotyków w kontroli *mastitis* u bydła mlecznego. Analizie poddano działanie AgNPs, CuNPs, AuNPs, FeNPs oraz PtNPs i ich kompleksów wobec szerokiego spektrum patogenów izolowanych z mleka krów ze zdiagnozowanym subklinicznym *mastitis*, w tym *S. uberis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. marcescens*, *C. albicans* oraz *Prototheca* sp.

Uzyskane wyniki wykazały, że najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazują AgNPs i CuNPs, natomiast AuNPs charakteryzują się umiarkowaną skutecznością. FeNPs oraz PtNPs wykazywały niewielkie lub brak działania biobójczego. Szczególnie istotne było potwierdzenie, że nanokompleksy, w tym przede wszystkim AgCuNPs, wykazują znacznie wyższą skuteczność niż pojedyncze NPs, co potwierdza efekt synergii.

Ważnym elementem pracy była ocena cytotoksyczności NPs wobec komórek BME-UV1 oraz HMEC. Wykazano, że przy niskich stężeniach NPs nie wykazują istotnej toksyczności, co ma kluczowe znaczenie dla ich potencjalnego zastosowania w praktyce.

Uzyskane wyniki wskazują, że NPs, szczególnie w formie kompleksów, mogą stanowić skuteczną alternatywę dla antybiotyków w leczeniu *mastitis*. Jednakże ich zastosowanie w praktyce wymaga dalszych badań, zwłaszcza w warunkach *in vivo*.

6.3 Doświadczenie 3

P3. Kot, M.; Lange, A.; Jabłońska, W.; Kalińska, A.; Nasiłowska, B.; Skrzeczanowski, W.; Gołębiwski, M. Nanoparticles as New Antifungals in the Prevention of Bovine Mycotic *Mastitis* Caused by *Candida* spp. and *Diutina* spp.—*In Vitro* Studies. *Molecules* 2025, 30, 2086

Przeprowadzone badania dotyczyły oceny właściwości przeciwgrzybiczych NPs wobec patogenów izolowanych z mleka krów z subklinicznym *mastitis*, w tym *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *D. catenulata* oraz *D. rugosa*. Patogeny te stanowią istotny problem kliniczny ze względu na rosnącą oporność na standardowe leczenie przeciwgrzybicze.

Uzyskane wyniki wykazały, że AgNPs, CuNPs oraz AuNPs wykazują istotną aktywność przeciwgrzybiczą, przy czym ich skuteczność była zależna od stężenia oraz

gatunku mikroorganizmu. Największą oporność wykazywała *C. glabrata*, natomiast najwyższą wrażliwość obserwowano dla *D. catenulata*.

Podobnie jak w innych badaniach, kluczowe znaczenie miał efekt synergii. Nanokompleksy, szczególnie AgCuNPs, wykazywały znacznie wyższą skuteczność niż pojedyncze NPs. Jednocześnie wykazano, że PtNPs i FeNPs wykazują ograniczoną aktywność przeciwgrzybiczą, jednak w porównaniu z działaniem tych kompleksów wobec bakterii, grzyby są bardziej wrażliwe na ich działanie.

Wyniki wskazują, że NPs mogą stanowić skuteczną alternatywę dla klasycznych leków przeciwgrzybiczych, zwłaszcza w przypadku szczepów opornych. Jednakże konieczne są dalsze badania w warunkach *in vivo*.

6.4 Doświadczenie 4

P4. Kot, M.; Jabłońska, W.M.; Lange, A.; Kalińska, A.; Gołębiewski, M. Nanomaterials in the Management of Fungal Udder Inflammation in Cattle as an Effective Preventive Strategy Based on *In Vitro* Studies. *Biology* 2026, 15, 412

Badania stanowią rozwinięcie wcześniejszych analiz i koncentrują się na rzadziej identyfikowanych patogenach grzybiczych związanych z *mastitis*, takich jak *P. kudriavzevii*, *W. pararugosa*, *S. cerevisiae*, *C. mucoides*, *W. anomalus*, *C. hoffmannii* oraz *K. marxianus*.

Uzyskane wyniki wykazały, że nanokompleksy wykazują najwyższą aktywność przeciwgrzybiczą, przy czym najbardziej skuteczny był AgCuNPs, a następnie AgAuNPs oraz AuCuNPs. Wśród pojedynczych NPs najwyższą skuteczność wykazywały AgNPs i CuNPs, natomiast AuNPs miały umiarkowaną aktywność, z kolei FeNPs i PtNPs niską.

Wykazano również istotne różnice w wrażliwości poszczególnych gatunków. Najbardziej opornym szczepem był *S. cerevisiae*, natomiast najwyższą wrażliwość wykazywała *W. pararugosa*. Porównanie z klasycznymi lekami przeciwgrzybiczymi wykazało, że niektóre NPs mogą przewyższać ich skuteczność.

Uzyskane wyniki wskazują, że NPs mogą być skutecznym narzędziem w kontroli grzybiczego *mastitis*, jednak ich zastosowanie wymaga dalszych badań.

7. Bibliografia

1. Abu-Dief, A. M., Alrashdeh, F. M., Emran, K. M., & Al-Abdulkarim, H. A. (2022). Development of some magnetic metal–organic framework nano composites for pharmaceutical applications. *Inorganic Chemistry Communications*, 138, 109251.
2. Adeyemi, O. S., & Sulaiman, F. A. (2014). Evaluation of metal nanoparticles for drug delivery systems. *Journal of biomedical research*, 29(2), 145.
3. Ahamed, M., AlSalhi, M. S., & Siddiqui, M. (2010). Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica chimica acta*, 411(23-24), 1841-1848.
4. Al-Farraj, E. S., Alahmadi, M., Mohamed, W., Alsaedi, W. H., & Abu-Dief, A. M. (2023). Development of VSe₂@ Cu₂Se nano-composites via facile one-pot hydrothermal method for pharmaceutical applications. *Physica Scripta*, 98(9), 095004.
5. Ansari, F., Molana, H., Goossens, H., Davey, P., Group, E. I. H. C. S., Davey, P., Ansari, F., Goossens, H., Ferech, M., & Metz, S. (2010). Development of standardized methods for analysis of changes in antibacterial use in hospitals from 18 European countries: the European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC) longitudinal survey, 2000–06. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(12), 2685-2691.
6. Armendariz, V., Herrera, I., Peralta-Videa, J. R., Jose-Yacaman, M., Troiani, H., Santiago, P., & Gardea-Torresdey, J. L. (2004). Size controlled gold nanoparticle formation by Avena sativa biomass: use of plants in nanobiotechnology. *Journal of nanoparticle research*, 6(4), 377-382.
7. Asfour, H. A., Eid, R. H., El-Wakeel, S. A., Behour, T. S., & Darwish, S. F. (2022). Phenotypic and genotypic investigation of yeast species associated with bovine subclinical mastitis with a special reference to their virulence characteristics.
8. Bakr, E. M., El-Tawab, A. E.-k. M. A., Elshemey, T. M., & Abd-Elrhman, A. H. (2015). Diagnostic and Therapeutic Studies on Mycotic Mastitis in Cattle. *Alexandria Journal of veterinary sciences*, 46(1).
9. Barlow, R., Fegan, N., & Gobius, K. (2008). A comparison of antibiotic resistance integrons in cattle from separate beef meat production systems at slaughter. *Journal of applied microbiology*, 104(3), 651-658.
10. Bartlett, J. G., Gilbert, D. N., & Spellberg, B. (2013). Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clinical infectious diseases*, 56(10), 1445-1450.
11. Bashal, A. H., Khalil, K. D., Abu-Dief, A. M., & El-Atawy, M. A. (2023). Cobalt oxide-chitosan based nanocomposites: synthesis, characterization and their potential pharmaceutical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 126856.
12. Benelli, G. (2018). Gold nanoparticles—against parasites and insect vectors. *Acta Tropica*, 178, 73-80.
13. Berry, S. L., Read, D. H., Famula, T. R., Mongini, A., & Döpfer, D. (2012). Long-term observations on the dynamics of bovine digital dermatitis lesions on a California dairy after topical treatment with lincomycin HCl. *The Veterinary Journal*, 193(3), 654-658.
14. Bogni, C., Odierno, L., Raspanti, C., Giraudo, J., Larriestra, A., Reinoso, E., Lasagno, M., Ferrari, M., Ducrós, E., & Frigerio, C. (2011). War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. *Science against microbial pathogens: Communicafing current research and technological advances*, 483-494.

15. Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, 8(7), 1137-1144.
16. Carlet, J., Pulcini, C., & Piddock, L. J. (2014). Antibiotic resistance: a geopolitical issue. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), 949-953.
17. Ceylan, R., Demirbas, A., Ocsoy, I., & Aktumsek, A. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extracts of three *Sideritis* species from Turkey and evaluations bioactivity potentials. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 21, 100426.
18. Chaudhary, A. S. (2016). A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics' discovery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(6), 552-556.
19. Cheng, D., Zhu, S., Yin, Z., Ding, W., Mu, Z., Su, Z., & Sun, H. (2010). Prevalence of bacterial infection responsible for bovine mastitis. *African journal of microbiology research*, 4(11), 1110-1116.
20. Cheng, W. N., & Han, S. G. (2020). Bovine mastitis: Risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments—A review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 33(11), 1699.
21. Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J., & Wyatt, M. D. (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 1(3), 325-327.
22. Costa, E. O. d., Gandra, C., Pires, M., Coutinho, S., Castilho, W., & Teixeira, C. (1993). Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of São Paulo, Brazil. *Mycopathologia*, 124(1), 13-17.
23. Cruz-Luna, A. R., Cruz-Martínez, H., Vásquez-López, A., & Medina, D. I. (2021). Metal nanoparticles as novel antifungal agents for sustainable agriculture: Current advances and future directions. *Journal of Fungi*, 7(12), 1033.
24. Dehkordi, S. H., Hosseinpour, F., & Kahrizangi, A. E. (2011). An in vitro evaluation of antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *African Journal of Biotechnology*, 10(52), 10795-10797.
25. Dhanjal, D. S., Mehra, P., Bhardwaj, S., Singh, R., Sharma, P., Nepovimova, E., Chopra, C., & Kuca, K. (2022). Mycology-nanotechnology interface: applications in medicine and cosmetology. *International journal of nanomedicine*, 2505-2533.
26. Długosz, O., Żebracka, A., Sochocka, M., Franz, D., Ochnik, M., Chmielowiec-Korzeniowska, A., & Banach, M. (2025). Selective and complementary antimicrobial and antiviral activity of silver, copper, and selenium nanoparticle suspensions in deep eutectic solvent. *Environmental Research*, 264, 120351.
27. Dworecka-Kaszak, B., Krutkiewicz, A., Szopa, D., Kleczkowski, M., & Biegańska, M. (2012). High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. *The Scientific World Journal*, 2012(1), 196347.
28. Ekrikaya, S., Yilmaz, E., Celik, C., Demirbuga, S., Ildiz, N., Demirbas, A., & Ocsoy, I. (2021). Investigation of ellagic acid rich-berry extracts directed silver nanoparticles synthesis and their antimicrobial properties with potential mechanisms towards *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Journal of Biotechnology*, 341, 155-162.
29. Ely, V., Pereira, D., da Costa, M., Panagio, L., Nakasato, G., Reis, G., Cargnelutti, J., Sangioni, L., & Botton, S. (2022). Activity of biogenic silver nanoparticles

- against isolates of *Prototheca* species from bovine mastitis. *Letters in Applied Microbiology*, 75(1), 24-28.
30. Evans, N., Murray, R., & Carter, S. (2016). Bovine digital dermatitis: current concepts from laboratory to farm. *The Veterinary Journal*, 211, 3-13.
 31. Fleischer, P., Metzner, M., Beyerbach, M., Hoedemaker, M., & Klee, W. (2001). The relationship between milk yield and the incidence of some diseases in dairy cows. *Journal of dairy science*, 84(9), 2025-2035.
 32. Fogsgaard, K. K., Røntved, C. M., Sørensen, P., & Herskin, M. S. (2012). Sickness behavior in dairy cows during *Escherichia coli* mastitis. *Journal of dairy science*, 95(2), 630-638.
 33. Garvey, M. (2022). Lameness in dairy cow herds: disease aetiology, prevention and management. *Dairy*, 3(1), 199-210.
 34. Ghodasara, S., & Gajbhiye, P. (2015). Clinical bovine fungal mastitis in organized dairy farm. *Molecular Microbiology Research*, 5.
 35. Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., & Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary quarterly*, 29(1), 18-31.
 36. Hasanin, M. S., Emam, M., Soliman, M. M., Latif, R. R. A., Salem, M. M., El Raey, M. A., & Eisa, W. H. (2022). Green silver nanoparticles based on *Lavandula coronopifolia* aerial parts extract against mycotic mastitis in cattle. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, 102350.
 37. Ijaz, I., Gilani, E., Nazir, A., & Bukhari, A. (2020). Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. *Green chemistry letters and reviews*, 13(3), 223-245.
 38. Ito, K., Von Keyserlingk, M., LeBlanc, S., & Weary, D. (2010). Lying behavior as an indicator of lameness in dairy cows. *Journal of dairy science*, 93(8), 3553-3560.
 39. Jabłońska, W., Gołębiewski, M., Kot, M., Mardan, H., Pawliński, B., & Kalińska, A. (2024). Perspectives and possibilities for new antimicrobial agents in the treatment and control of Mastitis induced by algae of the genus *Prototheca* spp.: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(15), 8219.
 40. Jiang, C., Fang, W., Chen, S., Guo, X., Gao, X., Liu, P., Hu, G., Li, G., Mai, W., & Liu, P. (2024). Genetic framework sequencing analysis of *Candida tropicalis* in dairy cow mastitis and study of pathogenicity and drug resistance. *BMC microbiology*, 24(1), 428.
 41. Kalińska, A., Jaworski, S., Wierzbicki, M., & Gołębiewski, M. (2019). Silver and copper nanoparticles—an alternative in future mastitis treatment and prevention? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1672.
 42. Khezerlou, A., Alizadeh-Sani, M., Azizi-Lalabadi, M., & Ehsani, A. (2018). Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses. *Microbial pathogenesis*, 123, 505-526.
 43. Kibebew, K. (2017). Bovine mastitis: A review of causes and epidemiological point of view. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 7(2), 1-14.
 44. Kim, K.-J., Sung, W. S., Moon, S.-K., Choi, J.-S., Kim, J. G., & Lee, D. G. (2008). Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J Microbiol Biotechnol*, 18(8), 1482-1484.
 45. Klaas, I., & Zadoks, R. N. (2018). An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transboundary and emerging diseases*, 65, 166-185.
 46. Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., Goossens, H., & Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic

- convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(15), E3463-E3470.
47. Knappe-Poindecker, M., Gilhuus, M., Jensen, T. K., Klitgaard, K., Larssen, R., & Fjeldaas, T. (2013). Interdigital dermatitis, heel horn erosion, and digital dermatitis in 14 Norwegian dairy herds. *Journal of dairy science*, 96(12), 7617-7629.
 48. Koca, F. D., Demirezen Yilmaz, D., Duman, F., & Ocsoy, I. (2018). Comparison of phytotoxic effects of bio-synthesised copper oxide nanoparticle and ionic copper on *Elodea canadensis*. *Chemistry and Ecology*, 34(9), 839-853.
 49. Kot, M., Kalińska, A., Jaworski, S., Wierzbicki, M., Smulski, S., & Gołębiewski, M. (2023). In vitro studies of nanoparticles as a potentially new antimicrobial agent for the prevention and treatment of lameness and digital dermatitis in cattle. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6146.
 50. Kowshik, M., Ashtaputre, S., Kharrazi, S., Vogel, W., Urban, J., Kulkarni, S. K., & Paknikar, K. M. (2003). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. *Nanotechnology*, 14(1), 95-100.
 51. Krull, A. C., Shearer, J. K., Gorden, P. J., Cooper, V. L., Phillips, G. J., & Plummer, P. J. (2014). Deep sequencing analysis reveals temporal microbiota changes associated with development of bovine digital dermatitis. *Infection and immunity*, 82(8), 3359-3373.
 52. Ksouri, S., Djebir, S., Hadeif, Y., & Benakhla, A. (2015). Survey of bovine mycotic mastitis in different mammary gland statuses in two north-eastern regions of Algeria. *Mycopathologia*, 179(3), 327-331.
 53. Kudrinskiy, A., Ivanov, A. Y., Kulakovskaya, E., Klimov, A., Zharebin, P., Khodarev, D., Le, A.-T., Tam, L. T., Lisichkin, G., & Krutyakov, Y. A. (2014). The mode of action of silver and silver halides nanoparticles against *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Journal of Nanoparticles*, 2014(1), 568635.
 54. Kumar, H., Venkatesh, N., Bhowmik, H., & Kuila, A. (2018). Metallic nanoparticle: a review. *Biomed. J. Sci. Tech. Res*, 4(2), 3765-3775.
 55. Lange, A., Grzenia, A., Wierzbicki, M., Strojny-Cieslak, B., Kalińska, A., Gołębiewski, M., Radzikowski, D., Sawosz, E., & Jaworski, S. (2021). Silver and copper nanoparticles inhibit biofilm formation by mastitis pathogens. *Animals*, 11(7), 1884.
 56. Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, 10(Suppl 12), S122-S129.
 57. Li, X., Xu, C., Liang, B., Kastelic, J. P., Han, B., Tong, X., & Gao, J. (2023). Alternatives to antibiotics for treatment of mastitis in dairy cows. *Frontiers in veterinary science*, 10, 1160350.
 58. Martín-Perales, A. I., Peña-Ortiz, M., Resende, J. A., Malpartida, I., Luque, R., & Balu, A. M. (2025). Continuous-flow mechanochemical preparation of Ag-Cu@ZIF-8 bimetallic system for antimicrobial applications. *Results in Engineering*, 25, 103581.
 59. Mazińska, B., & Hryniewicz, W. (2020). Antimicrobial resistance: causes and consequences. *Advancements of Microbiology*, 59(3), 249-257.
 60. Meçaj, R., Muça, G., Koleci, X., Sulçe, M., Turmalaj, L., Zalla, P., Koni, A., & Tafaj, M. (2023). Bovine environmental mastitis and their control: An overview. *Int. J. Agric. Biosci*, 12(4), 216-221.
 61. Michael, C. A., Dominey-Howes, D., & Labbate, M. (2014). The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Frontiers in public health*, 2, 145.

62. Miciński, B., & Miciński, J. (2019). Selected cattle hoof diseases: Characteristics, consequences, control and prevention. *Pol. J. Nat. Sci*, 34, 297-315.
63. Miglior, F., Fleming, A., Malchiodi, F., Brito, L. F., Martin, P., & Baes, C. F. (2017). A 100-Year Review: Identification and genetic selection of economically important traits in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 100(12), 10251-10271.
64. Ming, C., Huang, J., Wang, Y., Lv, Q., Zhou, B., Liu, T., Cao, Y., Gerrits van den Ende, B., Al-Hatmi, A. M., & Ahmed, S. A. (2019). Revision of the medically relevant species of the yeast genus *Diutina*. *Medical Mycology*, 57(2), 226-233.
65. Montoya, A. M., Luna-Rodríguez, C. E., Gracia-Robles, G., Rojas, O. C., Treviño-Rangel, R. d. J., & González, G. M. (2019). In vitro virulence determinants, comparative pathogenicity of *Diutina* (*Candida*) *mesorugosa* clinical isolates and literature review of the *D. rugosa* complex. *Mycologia*, 111(3), 395-407.
66. Moravkova, M., Huvarova, V., Vlkova, H., Kostovova, I., & Bacova, R. (2021). Raw bovine milk as a reservoir of yeast with virulence factors and decreased susceptibility to antifungal agents. *Medical Mycology*, 59(10), 1032-1040.
67. Motrenko, M., Lange, A., Kalińska, A., Gołębiewski, M., Kunowska-Słószarz, M., Nasiłowska, B., Czwartos, J., Skrzeczanowski, W., Orzeszko-Rywka, A., & Jagielski, T. (2025). Green Nanoparticle Synthesis in the Application of Non-Bacterial Mastitis in Cattle. *Molecules*, 30(6), 1369.
68. Mulvey, M. R., & Simor, A. E. (2009). Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? *Cmaj*, 180(4), 408-415.
69. Ndou, S. P., Muchenje, V., & Chimonyo, M. (2011). Animal welfare in multipurpose cattle production systems and its implications on beef quality. *African Journal of Biotechnology*, 10(7), 1049-1064.
70. Neculai-Valeanu, A. S., Arton, A. M., Mădescu, B. M., Rîmbu, C. M., & Creangă, Ș. (2021). Nanomaterials and essential oils as candidates for developing novel treatment options for bovine mastitis. *Animals*, 11(6), 1625.
71. Ordaya, E. E., Clement, J., & Vergidis, P. (2023). The role of novel antifungals in the management of candidiasis: a clinical perspective. *Mycopathologia*, 188(6), 937-948.
72. Orsel, K., Plummer, P., Shearer, J., De Buck, J., Carter, S., Guatteo, R., & Barkema, H. (2018). Missing pieces of the puzzle to effectively control digital dermatitis. *Transboundary and emerging diseases*, 65, 186-198.
73. Phophi, L., Petzer, I.-M., & Qekwana, D. N. (2019). Antimicrobial resistance patterns and biofilm formation of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from subclinical mastitis cow milk samples submitted to the Onderstepoort Milk Laboratory. *BMC veterinary research*, 15(1), 420.
74. Pore, R. S. (1973). Selective medium for the isolation of *Prototheca*. *Applied Microbiology*, 26(4), 648-649.
75. Radzikowski, D., Kalińska, A., Ostaszewska, U., & Gołębiewski, M. (2020). Alternative solutions to antibiotics in mastitis treatment for dairy cows-a review.
76. Rai, M., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P., Gupta, I. R., Galdiero, M., & Galdiero, S. (2016). Metal nanoparticles: The protective nanoshield against virus infection. *Critical reviews in microbiology*, 42(1), 46-56.
77. Rai, M., Ingle, A. P., Birla, S., Yadav, A., & Santos, C. A. D. (2016). Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Critical reviews in microbiology*, 42(5), 696-719.
78. Rakesh Ranjan, R. R., Swarup D, S. D., Patra, R., & Nandi D, N. D. (2006). Bovine protothecal mastitis: a review. *CABI Reviews*(2006), 7 pp.

79. Read, A. F., & Woods, R. J. (2014). Antibiotic resistance management. *Evolution, medicine, and public health*, 2014(1), 147.
80. Sastry, M., Ahmad, A., Khan, M. I., & Kumar, R. (2003). Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Current science*, 162-170.
81. Schroeder, C. M., Parlor, K. W., Marsh, T. L., Ames, N. K., Goeman, A. K., & Walker, R. D. (2003). Characterization of the predominant anaerobic bacterium recovered from digital dermatitis lesions in three Michigan dairy cows. *Anaerobe*, 9(3), 151-155.
82. Silva, S. R., Araujo, J. P., Guedes, C., Silva, F., Almeida, M., & Cerqueira, J. L. (2021). Precision technologies to address dairy cattle welfare: Focus on lameness, mastitis and body condition. *Animals*, 11(8), 2253.
83. Stavrou, A. A., Pérez-Hansen, A., Lackner, M., Lass-Flörl, C., & Boekhout, T. (2020). Elevated minimum inhibitory concentrations to antifungal drugs prevail in 14 rare species of candidemia-causing *Saccharomycotina* yeasts. *Medical Mycology*, 58(7), 987-995.
84. Steinfeld, H. (2004). The livestock revolution—a global veterinary mission. *Veterinary parasitology*, 125(1-2), 19-41.
85. Sukumar, K. (2012). Antifungal sensitivity against fungal isolates from bovine mastitis. *Indian J. Vet. Sci. Biotechnol*, 8, 14-15.
86. Tang, S., & Zheng, J. (2018). Antibacterial activity of silver nanoparticles: structural effects. *Advanced healthcare materials*, 7(13), 1701503.
87. Tarazona-Manrique, L., Villate-Hernández, J., & Andrade-Becerra, R. (2019). Bacterial and fungal infectious etiology causing mastitis in dairy cows in the highlands of Boyacá (Colombia). *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 66(3), 208-218.
88. Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 6(2), 257-262.
89. Tunç, A. S., Çağatay, S., Sağlam, M., & Kutsal, O. (2021). Pathomorphological findings of Mortellaro disease in dairy cattle. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 68(3), 245-250.
90. Van den Bogaard, A. E., & Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. *International journal of antimicrobial agents*, 14(4), 327-335.
91. Vega, N. M., & Gore, J. (2014). Collective antibiotic resistance: mechanisms and implications. *Current opinion in microbiology*, 21, 28-34.
92. Wawron, W., Bochniarz, M., & Piech, T. (2010). Yeast mastitis in dairy cows in the middle-eastern part of Poland. *Bull Vet Inst Pulawy*, 54(2), 201-204.
93. Wernicki, A., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R., Dec, M., Stegierska, D., Dudzic, A., & Wojcik, A. (2014). Antimicrobial properties of gold, silver, copper and platinum nanoparticles against selected microorganisms isolated from cases of mastitis in cattle. *Med Weter*, 70(9), 564-567.
94. Wierzbicki, M., Kot, M., Lange, A., Kalińska, A., Gołębiewski, M., & Jaworski, S. (2024). Evaluation of the antimicrobial, cytotoxic, and physical properties of selected nano-complexes in bovine udder inflammatory pathogen control. *Nanotechnology, Science and Applications*, 77-94.
95. Williamson, J., & Di Menna, M. (2007). Fungi isolated from bovine udders, and their possible sources. *New Zealand Veterinary Journal*, 55(4), 188-190.
96. Wilson-Welder, J. H., Alt, D. P., & Nally, J. E. (2015). Digital dermatitis in cattle: current bacterial and immunological findings. *Animals*, 5(4), 1114-1135.

97. Yehia, R. S., & Ali, A. M. (2020). Biosynthesis and characterization of iron nanoparticles produced by *Thymus vulgaris* L. and their antimicrobial activity. *Acta Botanica Croatica*, 79(2), 114-120.
98. Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534.
99. Zhou, Y., Ren, Y., Fan, C., Shao, H., Zhang, Z., Mao, W., Wei, C., Ni, H., Zhu, Z., & Hou, X. (2013). Survey of mycotic mastitis in dairy cows from Heilongjiang Province, China. *Tropical animal health and production*, 45(8), 1709-1714.
100. Zinicola, M., Lima, F., Lima, S., Machado, V., Gomez, M., Döpfer, D., Guard, C., & Bicalho, R. (2015). Altered microbiomes in bovine digital dermatitis lesions, and the gut as a pathogen reservoir. *PLoS One*, 10(3), e0120504.

8. Zbiór publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej oraz oświadczenia współautorów publikacji



Article

In Vitro Studies of Nanoparticles as a Potentially New Antimicrobial Agent for the Prevention and Treatment of Lameness and Digital Dermatitis in Cattle

Magdalena Kot ¹, Aleksandra Kalińska ^{1,*}, Sławomir Jaworski ², Mateusz Wierzbicki ², Sebastian Smulski ³ and Marcin Gołębiewski ^{1,*}

¹ Animal Breeding Department, Warsaw University of Life Sciences, 02-786 Warszawa, Poland

² Department of Nanobiotechnology, Warsaw University of Life Sciences, 02-786 Warszawa, Poland

³ Department of Internal Diseases and Diagnostics, Poznań University of Life Sciences, 60-637 Poznań, Poland

* Correspondence: aleksandra_kalinska@sggw.edu.pl (A.K.); marcin_golebiewski@sggw.edu.pl (M.G.)

Abstract: Digital dermatitis (DD) is the second most prevalent disease in dairy cattle. It causes significant losses for dairy breeders and negatively impacts cows' welfare and milk yield. Despite this, its etiology has not been entirely identified, and available data are limited. Antibiotic therapy is a practical method for managing animal health, but overuse has caused the evolution of antibiotic-resistant bacteria, leading to a loss in antimicrobial efficacy. The antimicrobial properties of metal nanoparticles (NPs) may be a potential alternative to antibiotics. The aim of this study was to determine the biocidal properties of AgNPs, CuNPs, AuNPs, PtNPs, FeNPs, and their nanocomposites against pathogens isolated from cows suffering from hoof diseases, especially DD. The isolated pathogens included *Sphingomonas paucimobilis*, *Ochrobactrum intermedium* I, *Ochrobactrum intermedium* II, *Ochrobactrum gallinifaecis*, and *Actinomyces odontolyticus*. Cultures were prepared in aerobic and anaerobic environments. The viability of the pathogens was then determined after applying nanoparticles at various concentrations. The in vitro experiment showed that AgNPs and CuNPs, and their complexes, had the highest biocidal effect on pathogens. The NPs' biocidal properties and their synergistic effects were confirmed, which may forecast their use in the future treatment and the prevention of lameness in cows, especially DD.

Keywords: silver; copper; gold; platinum; iron; nanoparticles; nanocomposites; lameness; digital dermatitis; dairy cows



Citation: Kot, M.; Kalińska, A.; Jaworski, S.; Wierzbicki, M.; Smulski, S.; Gołębiewski, M. In Vitro Studies of Nanoparticles as a Potentially New Antimicrobial Agent for the Prevention and Treatment of Lameness and Digital Dermatitis in Cattle. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 6146. <https://doi.org/10.3390/ijms24076146>

Academic Editor: Rustam I. Aminov

Received: 6 February 2023

Revised: 17 March 2023

Accepted: 22 March 2023

Published: 24 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Modern livestock production is significantly different to the realities of farming over the last 15 to 20 years, even though this is a relatively short period of time. The continuously growing demand for animal products has made it necessary to boost production to meet global consumer needs. Activities aimed at maximizing livestock performance have been initiated to this end [1]. The incidences of lameness reflect the misconduct of dairy producers and a failure of duty associated with proper breeding practices, which has led to poor hoof health. Unfortunately, these actions, including negligence, have resulted in cows suffering pain associated with lameness, which has led to a deterioration in animal health status and welfare [2]. Lameness is one of the most common diseases found in dairy herds, and it results, globally, in the greatest financial losses to breeders [3]. It is mainly caused by bacterial infections, which lead to hoof dermatitis and clinical lameness [4].

Digital dermatitis (DD) is a polybacterial infectious foot disease complex caused by multiple bacterial agents [5]. Important etiological factors for lameness include *Treponema* spp. such as *T. denticola*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. putidum*, *T. phagedenis*, and *T. paraluisuniculi*. *Treponema* spp. are the most frequently isolated etiological agent for DD; however, the available literature also indicates other isolates, such as *Guggerheimella* spp.,

Borrelia spp., *Porphyromonas* spp. [6], *Bacteroides* spp., *Campylobacter* spp., *Fusobacterium necrophorum*, and *Dichelobacter nodosus* [7].

Despite the prevalence of digital dermatitis, the etiological agent and microbial composition are not completely determined, and the results from the available literature are not consistent [8]; therefore, in order to explore the bacterial factors that result in DD, it is necessary to conduct further research to expand our knowledge of it.

Various approaches are used to treat DD, but the most common forms, due to the location of the infection, are hoof baths and bandage dressings. In both cases, however, antibiotics are used [5]. It is more common to use localized antibiotic therapy than a general treatment, but reports vary, indicating that antibiotic treatment is not sufficiently effective in all cases. Tetracycline, oxytetracycline, erythromycin, lincomycin, and tiamulin are the most common antibiotics used in footbaths [9]; non-antibiotic alternatives include copper sulfate, formalin, peracetic acid, and organic acid solutions. Unfortunately, despite their antibacterial properties, some of these treatments adversely affect the animals by irritating the skin [10].

Previous studies have indicated that antibiotic use in the treatment of digital dermatitis does not provide consistently successful results [11]. Consequently, an effective treatment for digital dermatitis cannot be clearly determined due to the limited effect of the antibiotics and the complexity of the polybacterial infectious disease. As a result, it is crucial that we look for new, alternative solutions that will help effectively treat bacterial infections. One of these solutions is the use of nanotechnology, especially metal nanoparticles.

Both the physical and chemical properties of nanoparticles differ depending on the particle, which affects their antimicrobial properties. The differences in antibacterial activity are affected by the nanoparticles' surface area to volume ratio [12], shape, size (1–100 nm) [13], and surface properties such as the zeta potential [14].

Previous reports have confirmed nanoparticles' antibacterial activity against medically important pathogens, including those species that are resistant to conventional treatments—this demonstrates their potency and efficacy. Silver nanoparticles (AgNPs) are effective, even against multidrug-resistant (MDR) bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [15] and *Staphylococcus epidermidis* [16], erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes*, ampicillin-resistant *Escherichia coli*, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [17]. AgNPs also reduce biofilm formation in *S. aureus* [18]. Moreover, gold nanoparticles (AuNPs) destroy the MDR cells of *P. aeruginosa* [19]. These strong antimicrobial properties suggest that nanoparticles could be used as an alternative to antibiotics, and may become an innovative agent against various pathogens, among other bacteria isolated from diseased hooves. The available references indicate that there are variations associated with the biocidal properties of nano-platinum (PtNP) based on their method of synthesis [20]; for instance, green synthesized PtNPs effectively destroy bacterial cells [21]. The literature also confirms the antibacterial effects of green synthesized iron (FeNPs) [22] and copper (CuNPs) nanoparticles [23].

Nanoparticle complexes demonstrate synergistic effects towards each other, enhancing their antimicrobial properties; however, these effects have not been entirely established for all combinations due to the variety of nanoparticles. The most important fact is that nanoparticles have no toxic influence on bovine or human cells [24], which is crucial for animal and human safety if we are going to consider using nanoparticles in the future as a potential disinfectant product.

The main goal of the current research was to determine the biocidal effects of AgNPs, CuNPs, AuNPs, PtNPs, FeNPs, and their nanocomposites on pathogens isolated from tissue samples, pus, pus and blood, and other swabs from the limbs of cattle diagnosed with lameness. The isolated pathogens included *Sphingomonas paucimobilis*, *Ochrobactrum intermedium* I and *Ochrobactrum intermedium* II, *Ochrobactrum gallinifaecis*, and *Actinomyces odontolyticus*. These microbes have been associated with DD for the first time, which is significant, and contributes greatly to the literature and to scientific development. The conducted experiment also determined the main characteristics of both the selected nanoparticles and their complexes, such as morphology, zeta potential, size, and hydrodynamic size distribution.

Despite DD being among the most frequent diseases in cattle herds, the etiological agents and the alternatives for its treatment have not been sufficiently established. The described correlations suggest that the use of multiple types of NPs could be a beneficial solution for the control of the microorganisms responsible for DD, while the results of the study will improve our knowledge of DD and present a possible alternative for its treatment and prevention.

2. Results

2.1. Identification of the Isolated Microorganisms

In the present study, the Gram-negative aerobic bacteria *Sphingomonas paucimobilis*, *Ochrobactrum intermedium* I and *Ochrobactrum intermedium* II, and *Ochrobactrum gallinifaecis*, and the Gram-positive anaerobic *Actinomyces odontolyticus* were isolated from biological material obtained from the limbs of cattle diagnosed with lameness. Two analytical instruments, the MALDI-TOF MS and the VITEK 2, were used to identify the isolated microorganisms; this made the identification precise and reliable. Nowadays, the MALDI-TOF MS is used in clinical microbiology laboratories because of its potential for the development of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. The VITEK 2 is a compact system that uses colorimetric reagent cards that are incubated and interpreted automatically using a database containing well-described strains. This fact is important, especially as the isolated pathogens had not previously been connected with the digital dermatitis disease. The obtained results were, therefore, more precise than standard microbiology analysis. Tables 1 and 2 present the extracted report information that enabled the identification of the isolated microorganisms.

Table 1. Pathogens identified using the MALDI-TOF MS, including score value and NCBI identifier.

Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
<i>Ochrobactrum gallinifaecis</i>	1.76	215590
<i>Ochrobactrum intermedium</i> I	2.0	94625
<i>Ochrobactrum intermedium</i> II	1.78	94625

Table 2. Pathogens identified using the VITEK 2, including the biochemical information for the identification of the isolated microorganisms.

Identified Microorganism				<i>Actinomyces odontolyticus</i>								
Biochemical properties	dGAL	-	LeuA	+	ELLM	+	PheA	+	dMNE	-	BGURi	-
	dCEL	+	TyrA	+	APPA	-	dGLU	-	URE	-	PVATE	-
	SAC	-	ARB	-	NAG	-	BGLUi	-	ARG	-	AIFUC	-
	BGALi	-	AARA	-	AGALi	-	BMAN	-	AMANi	-	dXYL	+
	MTE	-	ESC	+	BdFUC	-	BNAGi	-	AARAF	+		
	PHOS	+	IARA	-	dRIB2	-	OPS	-	PyrA	-		
	GRAM	+	MORPH	-	AERO	+	ProA	+	dMAL	+		
Identified microorganism				<i>Sphingomonas paucimobilis</i>								
Biochemical properties	APPA	-	ADO	-	PyrA	-	IARL	-	dCEL	+	BGAL	-
	H2S	-	BNAG	-	AGLTp	-	dGLU	+	GGT	-	OFF	-
	BGLU	-	dMAL	+	dMAN	-	dMNE	+	BXYL	-	BAIap	-
	ProA	-	LIP	-	PLE	-	TyrA	+	URE	+	dSOR	-
	SAC	-	dTAG	-	dTRE	+	CIT	-	MNT	-	5KG	-
	ILATk	-	AGLU	+	SUCT	-	NAGA	-	AGAL	-	PHOS	-
	GlyA	-	ODC	-	LDC	-	IHISa	-	CMT	-	BGUR	-
	O129R	-	GGAA	-	IMLTa	-	ELLM	+	ILATa	-		

“+” found concordance of biochemical characteristics of the bacteria; “-” not found concordance of biochemical characteristics of the bacteria.

2.2. Determination of the Nanoparticles' Morphology and Their Complexes

All nanoparticles, apart from CuNPs, presented in Figure 1, have a spherical morphology. In contrast, it was difficult to estimate the morphology of CuNPs due to contaminations and their size. The CuNPs and their complexes contained contaminants, probably in the form of copper salts formed by the dissolution of the nanoparticles.

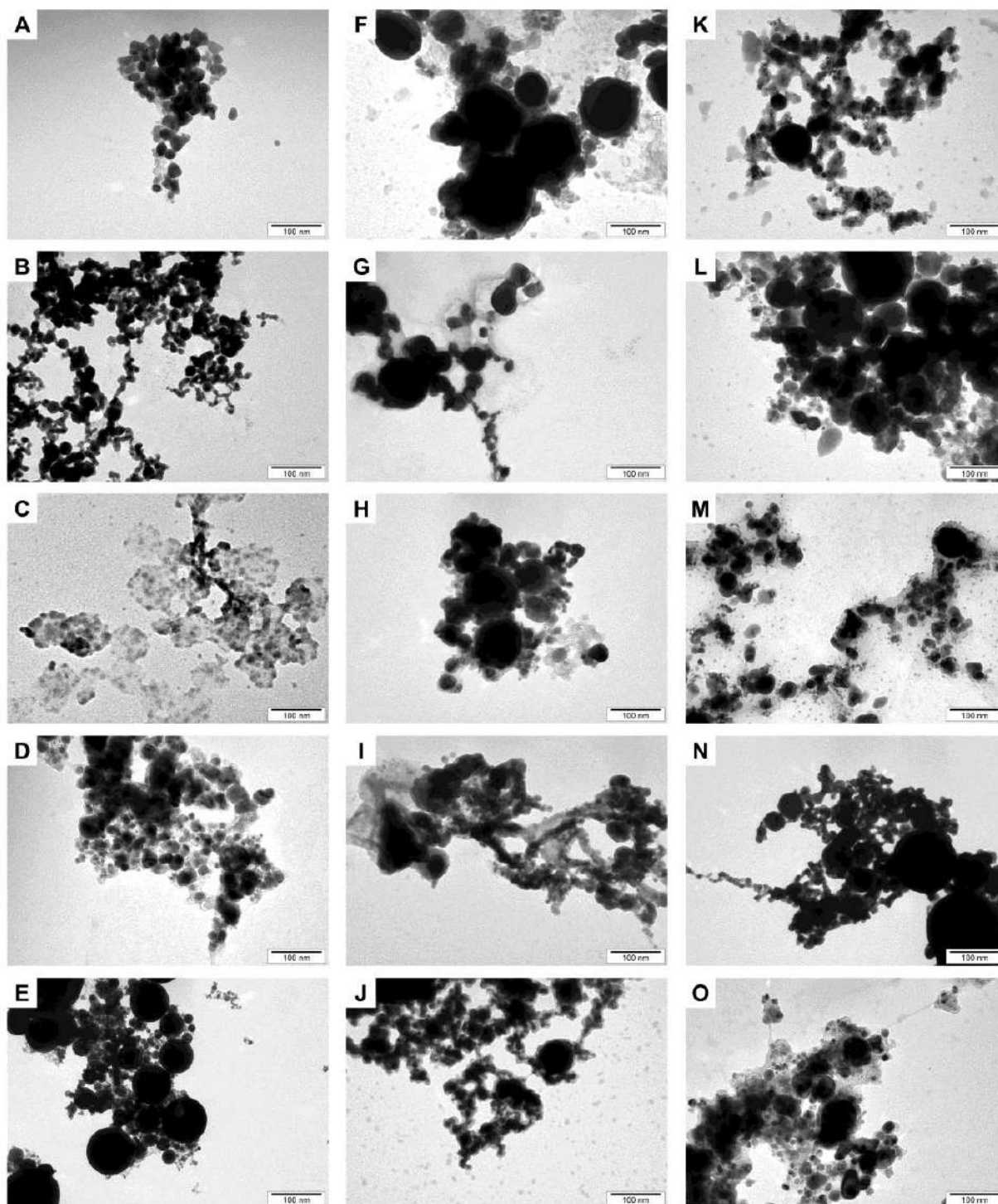


Figure 1. Transmission electron microscopy (TEM) images of the studied nanoparticles and their complexes. (A)—AgNPs, (B)—AuNPs, (C)—CuNPs, (D)—FeNPs, (E)—PtNPs, (F)—AgFeNPs, (G)—AuAgNPs, (H)—AuFeNPs, (I)—CuAgNPs, (J)—CuAuNPs, (K)—CuPtNPs, (L)—CuFeNPs, (M)—PtAgNPs, (N)—PtAuNPs, (O)—PtFeNPs.

2.3. Determination of Physicochemical Properties of Nanoparticles and Their Complexes

The data presented in Table 3 show that the zeta potential for most of the NPs achieved negative values (from -3.66 to -26.2 mV), while CuNPs and CuAgNPs achieved positive values (7.75 mV and 15.63 mV, respectively). PtNPs achieved values close to 0 (-3.66 mV), while the value that was found to be farthest from 0 was for AgNPs (-26.2 mV).

Table 3. Physicochemical properties of selected nanoparticles and their complexes.

Nanoparticle	Zeta Potential (mV)		Hydrodynamic Diameter (nm)	
	Values	Average	Values	Average
Ag	-26.30	-26.20	157.20	154.50
	-25.80		152.10	
	-26.50		154.20	
Cu	4.54	7.75	987.00	580.70
	8.80		363.00	
	9.92		392.10	
Pt	-3.10	-3.66	221.10	171.23
	-3.09		148.80	
	-4.79		143.80	
Au	-17.50	-18.00	201.50	189.50
	-18.40		187.90	
	-18.10		179.10	
Fe	-19.10	-18.83	300.70	311.27
	-19.10		314.70	
	-18.30		318.40	
AuAg	-21.50	-20.57	518.00	455.67
	-18.90		425.60	
	-21.30		423.40	
PtAg	-24.50	-23.80	179.60	178.70
	-21.40		183.70	
	-25.50		172.80	
FeAg	-16.50	-15.87	366.40	353.53
	-15.90		350.40	
	-15.20		343.80	
CuAg	14.70	15.63	238.20	243.27
	16.90		244.50	
	15.30		247.10	

The hydrodynamic diameter represents the average agglomerate size, which varies depending on the type of nanoparticle. Certain nanoparticles tended to form larger agglomerates, including single nanoparticles such as CuNPs, and FeNPs, but also complexes like AuAgNPs and AgFeNPs. The nanoparticle with the least tendency to agglomerate was PtNPs.

The sizes of the studied NPs differed from each other. The largest sizes were characteristic for FeNPs and PtNPs (5 – 100 nm), while AgNPs and AuNPs were smaller (10 – 50 and 10 – 40 nm, respectively). The smallest sizes were typical for CuNPs (1 – 10 nm). The obtained results are presented in Table 4.

Table 4. Size distribution of nanoparticles based on TEM images.

Nanoparticle	Size (nm)
AgNPs	10–50
CuNPs	1–10
FeNPs	5–100
PtNPs	5–100
AuNPs	10–40

2.4. Biocidal Properties of AuNPs, AgNPs, PtNPs, CuNPs, and FeNPs against Microorganisms Isolated from Hoof Lesions

Bacterial cell viability was presented as a percentage [%], where the control group was always stated as 100%. The bacterial cell viability of the control group was compared to the bacterial cell viability of the experimental groups, and the obtained results are presented in Table 5.

Table 5. Viability analysis of the microorganisms isolated from ulcerated hoof sores and exposed to Au, Ag, Pt, Cu, and Fe nanoparticles.

Nanoparticles (ppm)	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Ochrobactrum intermedium I</i>	<i>Ochrobactrum intermedium II</i>	<i>Ochrobactrum gallinifaecis</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
Control group	100 ± 3.6	100 ± 4.2	100 ± 2.25	100 ± 7.86	100 ± 0.01
Au 1.56	102.12 ± 3.54	86.17 ± 4.3	101.86 ± 4.2	106.96 ± 12.22	103.57 ± 1.44
Au 3.125	104.4 ± 2.9	85.64 ± 7.9	103.25 ± 3.8	101.9 ± 15.06	104.6 ± 1.23
Au 6.25	95.4 ± 2.6	76.76 ± 3.1 *	101.72 ± 1.9	101.64 ± 3.98	104.92 ± 0.27
Au 12.5	94.2 ± 3.7	62.15 ± 4.6 *	99.8 ± 3.6	70.68 ± 7.29 *	68.68 ± 7.69 *
Au 25	14.8 ± 0.6 *	42.4 ± 1.2 *	95.2 ± 3.7	14.76 ± 0.95 *	6.92 ± 0.9 *
Ag 1.56	7.12 ± 0.08 *	16.8 ± 1.8 *	8.21 ± 0.3 *	12.82 ± 0.33 *	47.96 ± 8.83 *
Ag 3.125	4.11 ± 0.51 *	7.6 ± 0.2 *	6.63 ± 0.8 *	12.24 ± 0.29 *	36.56 ± 2 *
Ag 6.25	3.37 ± 0.08 *	5.4 ± 0.3 *	5.52 ± 0.6 *	13.39 ± 0.94 *	28.73 ± 5.31 *
Ag 12.5	3.23 ± 0.14 *	4.2 ± 0.1 *	5.6 ± 0.1 *	12.36 ± 0.28 *	6.82 ± 0.04 *
Ag 25	3.26 ± 0.21 *	2.1 ± 0.05 *	4.48 ± 0.4 *	11.52 ± 0.79 *	5.66 ± 1.56 *
Pt 0.625	99.5 ± 1.8	101.2 ± 2.6	108.4 ± 4.5	114.96 ± 2.41	97.30 ± 3.37
Pt 1.25	100.6 ± 2.2	102.7 ± 3.1	107.12 ± 3.4	113.39 ± 4.55	97.7 ± 0.93
Pt 2.5	101.6 ± 4.2	102.4 ± 1.9	103 ± 3.6	109.42 ± 2.4	99.19 ± 0.39
Pt 5	99.2 ± 3.5	105.6 ± 2.1	101.7 ± 5.1	104.61 ± 8.68	103.54 ± 6.43
Pt 10	99.8 ± 1.2	107.2 ± 1.2	102.4 ± 2.1	104.13 ± 1.9	98.18 ± 1.92
Cu 1.56	3.49 ± 0.1 *	67.2 ± 0.4 *	69.7 ± 4.5 *	12.68 ± 0.14 *	101.57 ± 2.32
Cu 3.125	3.36 ± 0.2 *	6.7 ± 0.3 *	5.9 ± 0.3 *	11.94 ± 0.29 *	63.04 ± 6.8 *
Cu 6.25	3.12 ± 0.1 *	5.4 ± 0.1 *	4.7 ± 0.1 *	9.44 ± 0.38	4.43 ± 0.89 *
Cu 12.5	2.42 ± 0.31 *	2.54 ± 0.05 *	3.3 ± 0.05 *	7.75 ± 0.39	3.66 ± 0.2 *
Cu 25	2.34 ± 0.15 *	2.15 ± 0.1 *	2.9 ± 0.1 *	7.09 ± 0.47	2.24 ± 0.22 *
Fe 1.56	101.15 ± 1.9	98.12 ± 4.6	106.6 ± 4.3	113.68 ± 13.62	99.67 ± 1.96
Fe 3.125	101.7 ± 2.2	99.1 ± 5.3	106.4 ± 3.7	104.34 ± 11.2	101.99 ± 2.07
Fe 6.25	103 ± 1.4	96.4 ± 3.2	107.5 ± 1.9	101.97 ± 3.8	102.32 ± 1.23
Fe 12.5	107.6 ± 3.4	94.2 ± 2.7	108.4 ± 4.7	106.24 ± 8.9	100.4 ± 2.25
Fe 25	113.2 ± 2.7	81.2 ± 2.1 *	110.7 ± 7.2	119.28 ± 4.8	101.49 ± 0.92
p-value	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

* Significant differences in comparison to control ($p \leq 0.05$); average values ± SD from four repetitions.

These studies indicated that there were differences in the viability of pathogens after the nanoparticles were applied, depending on the pathogen and nanoparticle concentrations. Ag, Au, and Cu nanoparticles demonstrated the strongest biocidal activity against the tested microorganisms when they were in higher concentrations (12.5–25 ppm). The highest concentration of AuNPs (25 ppm) reduced the viability of three strains, *Sphingomonas paucimobilis*, *Ochrobactrum gallinifaecis*, and *Actinomyces odontolyticus*, by

14.80%, 14.76%, and 6.92%, respectively. In the case of AgNPs and CuNPs, a strong biocidal effect was observed at the lower concentrations of 12.5 ppm and 6.25 ppm, respectively. AuNPs, at concentrations of 1.56 ppm and 3.125 ppm, promoted increases in selected pathogens by an insignificant amount, excluding *Ochrobactrum intermedium* I; concentrations of CuNPs at 1.56 ppm promoted the growth of *Actinomyces odontolyticus*. *Sphingomonas paucimobilis* was the most susceptible pathogen to the antibacterial effects of the selected NPs. AgNPs exhibited the most effective antibacterial activity, while, in contrast, platinum and iron nanoparticles had the least activity—in some instances even promoting bacterial growth. FeNPs and PtNPs, therefore, were not used in the latter part of the experiment.

2.5. Biocidal Properties of AuNP, AgNP, and CuNP Complexes against Microorganisms Isolated from Hoof Lesions

Data regarding the biocidal properties of NPs complexes against isolated bacteria are presented in Table 6. There was a decrease in the levels of pathogens for all nanoparticle complexes. Lower concentrations of nanocomplexes showed more potent biocidal properties in comparison to the results from individual nanoparticles. Nevertheless, higher concentrations (12.5 ppm) of nanoparticle complexes showed more powerful antibacterial activity than lower concentrations (0.78 ppm). The complex that demonstrated the strongest antibacterial effect was AgCuNPs, whereas the CuAuNP complex had the weakest effect. The AgCuNP complex, at a concentration of 6.25 ppm, decreased the pathogens' viability to 1.5–5%. Therefore, further studies should probably use this at higher concentrations, especially in herd conditions. As with the effects of individual nanoparticles, *Sphingomonas paucimobilis* was most susceptible to the complexes, while *Ochrobactrum intermedium* II was the most resistant. Nevertheless, the levels of all pathogen viabilities were decreased using the selected nanoparticle complexes.

Table 6. Viability analysis of the microorganisms isolated from ulcerated hoof sores and exposed to AuNP, AgNP, and CuNP complexes.

Nanoparticles (ppm)	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Ochrobactrum intermedium</i> I	<i>Ochrobactrum intermedium</i> II	<i>Ochrobactrum gallinifacis</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
Control group	100 ± 5.6	100 ± 6.88	100 ± 4.67	100 ± 3.69	100 ± 2.04
AgAu 0.78	11.24 ± 0.25 *	29.7 ± 0.2 *	29.24 ± 0.22 *	36.9 ± 0.13 *	37.89 ± 0.3 *
AgAu 1.56	11.56 ± 0.65 *	9.11 ± 0.58 *	9.59 ± 0.56 *	6.92 ± 0.08 *	8.9 ± 0.12 *
AgAu 3.125	11.75 ± 0.61 *	9.17 ± 0.29 *	9.81 ± 0.7 *	6.84 ± 0.21	5.52 ± 0.76 *
AgAu 6.25	11.23 ± 0.51 *	9.34 ± 0.66	9.01 ± 0.53 *	6.7 ± 0.35 *	3.87 ± 0.58 *
AgAu 12.5	9.68 ± 0.74	11.4 ± 0.38 *	8.15 ± 0.8 *	6.2 ± 0.4 *	2.12 ± 0.05 *
AgCu 0.78	12.5 ± 1.03 *	9.26 ± 0.25 *	15.21 ± 1.1 *	12.54 ± 1.1 *	16.5 ± 0.46 *
AgCu 1.56	8.46 ± 0.51 *	8.53 ± 0.47 *	9.28 ± 1.16 *	6.66 ± 0.96 *	5.88 ± 0.56 *
AgCu 3.125	7.4 ± 0.99 *	7.67 ± 1.35 *	9.85 ± 1.51 *	4.54 ± 0.24 *	4.95 ± 0.95 *
AgCu 6.25	4.9 ± 0.21 *	5.99 ± 0.17 *	5.16 ± 0.21 *	1.92 ± 0.12 *	2.71 ± 0.11 *
AgCu 12.5	3.42 ± 0.71	5.02 ± 0.36 *	4.83 ± 0.36 *	1.1 ± 0.06 *	2.11 ± 0.12 *
CuAu 0.78	12.06 ± 0.78 *	12.18 ± 1.98 *	89.7 ± 6.24	62.13 ± 16.1 *	89.13 ± 0.82
CuAu 1.56	9.45 ± 0.21 *	5.99 ± 0.17 *	9.16 ± 0.21 *	9.16 ± 0.12 *	20.03 ± 2.73 *
CuAu 3.125	9.24 ± 0.9 *	7.5 ± 0.16 *	8.24 ± 0.24	5.69 ± 0.02 *	8.86 ± 0.11 *
CuAu 6.25	2.52 ± 0.71 *	5.02 ± 0.36 *	5.83 ± 0.36 *	3.12 ± 0.01 *	6.71 ± 0.11 *
CuAu 12.5	4.45 ± 0.21 *	4.91 ± 0.3 *	4.56 ± 0.05 *	2.56 ± 0.01 *	3.21 ± 0.05 *
p-value	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

* Significant differences in comparison to control ($p \leq 0.05$); average values ± SD from four repetitions.

3. Discussion

In recent years, antibiotic resistance has become a significant problem, affecting both animals and humans [25,26]. Nowadays, researchers and breeders are facing new challenges, and one of these is the growing number of pathogens that are resistant to the most popular drugs. The overuse of antibiotics has led to this resistance [27]. These drugs were

used not only in the treatment of farm animals, but also often as a prevention method [28,29]. Antibiotics that were widely abused have now lost their efficacy, and there is a lack of new, effective antibiotics to replace them [30]. Due to their properties, nanoparticles have a broad range of uses and high potential in diverse fields; however, their properties are dependent on their physicochemical characteristics. Previous studies have also confirmed their antiviral, antifungal, and antiparasitic properties [31].

Most significantly, nanoparticles have a strong affinity for bacterial cells, resulting in protein denaturation, and contribute to the formation of free radicals that lead to the disruption of DNA replication and pathogen protein expression [32]. They also damage cell membranes and mitochondria, leading to cell death [33]. Crucially, the bacterial cell is incapable of developing resistance to nanoparticles. Therefore, as an antimicrobial agent, they can be a great alternative to antibiotics [34].

In a study by Berry et al. [11], lincomycin HCl soluble powder was used in the treatment of digital dermatitis in the form of a paste under a dressing; however, after 11 months of antibiotic therapy, the disease recurred. In addition, the treatment of different forms of digital dermatitis has resulted in different outcomes. The use of oxytetracycline for infection treatment of the interdigital cleft was less effective compared to using it to treat lesions on the heels [35]; therefore, it is challenging to recommend an effective treatment for DD.

Results from Wernicki et al. suggested that the antibacterial properties of PtNPs depended on the method used to synthesize them. There are reports by Wernicki et al. [20] that suggest that antimicrobial properties were lacking in PtNPs synthesized using physical methods. In this study, we used PtNPs obtained by physical methods, and their effect on isolated lameness bacteria confirmed the findings reported by Wernicki et al., indicating that their antibacterial properties were quite low. Moreover, in the case of bacteria associated with lameness, not only was PtNPs' poor antibacterial effect observed, but it also promoted the bacteria's growth. However, it is worth noting that the study by Wernicki et al. was conducted on mastitic bacteria isolated from cattle. Moreover, there is a shortage of cases to refer to in the available literature. The results of our study concerning the effect of PtNPs were similar to FeNPs, resulting in an increase in bacterial viability. The available literature indicates that green synthesized nanoparticles have antibacterial properties [22], while those we used in our research promoted the growth of bacteria (except for *O. intermedium* I, where the viability slightly decreased).

The biocidal efficacy of nanoparticles depends on, among other factors, the cell wall structures of the bacteria, which is related to whether the bacteria is Gram-negative (G-) or Gram-positive (G+) [36]. The literature indicates that AuNPs show antibacterial activity against both G- and G+ bacteria, however, this is dependent on the AuNPs concentration. According to Shamaila et al. [37], lower concentrations were sufficient to demonstrate the antibacterial activity of AuNPs against G- bacteria but not against G+ bacteria. The current study did not confirm these results, in which the most resistant bacteria to AuNPs were the G- *O. intermedium* II, *S. paucimobilis*, and *O. gallinifaecis* and the G+ bacterium *A. odontolyticus*. Low concentrations of nanocolloids promoted the growth of bacteria, except for *O. intermedium* I, where even the lowest concentration (1.56 ppm) showed some minimal antibacterial activity. There was a decrease in pathogen titers for all bacterial isolates for concentrations of 12.5–25 ppm. A concentration of 25 ppm demonstrated the strongest biocidal activity against G+ *A. odontolyticus* bacteria.

The available publications indicate that AgNPs exhibit antibacterial activity against both G- and G+ bacteria [38]. The results obtained in this experiment confirmed these results. After the application of AgNPs, a reduction in the quantities of each pathogen was observed to varying degrees, according to the concentration of AgNPs. The G+ *A. odontolyticus* was the most resistant bacteria to the activity of these nanoparticles, whereas G- bacteria were the most susceptible.

Alizadeh et al. [39] investigated the effects of AgNPs on G- bacteria. The study demonstrated that they were more effective at high concentrations (>10 ppm) compared

to low concentrations (<10 ppm). Han et al. [40] found that AgNPs at concentrations of 0.06–0.98 ppm showed antibacterial activity against both G- and G+ bacteria. In the current study, the efficacy of AgNPs was correlated with their concentration, and they were effective even at the lowest concentration (1.56 ppm), confirming the results from Alizadeh et al. and Han et al.

Regarding the effectiveness of CuNPs, there are certain discrepancies in the literature associated with the relationship between the way they are synthesized and their biocidal capacity. Shankar et al. [41] applied green-synthesized CuNPs, which showed antibacterial activity against both G- and G+ bacteria; Chowdhury et al. [42] used nanoparticles obtained using the chemical reduction method. Their nanoparticles showed stronger antibacterial activity against G- than G+ bacteria, which is consistent with our results. The G+ bacterium *A. odontolyticus* exhibited the strongest resistance to CuNPs, in contrast to G- bacteria. A study conducted by Dugal et al. [43] indicated CuNPs' antibacterial potential against G- bacteria at concentrations of 19.60 ppm, which is also consistent with the results of the current study. Despite the high agglomerate-forming potential of the CuNPs (580.7 nm) used in our experiment, they exhibited strong antibacterial properties, which may be related to their small size (1–10 nm).

A study by Kalińska et al. [24] showed AgNPs and CuNPs' antibacterial properties against G+ and G- bacteria. Their AgNPs had a similar zeta potential value to the results of the conducted experiment. However, there were noticeable differences in the zeta potential of CuNPs, which had values from −20.93 to −9.25 mV, while in the current experiment the value was 7.75 mV. There were also differences in the sizes of the NPs. AgNPs in this experiment measured 10–50 nm, while those used by Kalińska et al. were almost twice this size (35–100 nm). In the case of CuNPs, which in our experiment were 1–10 nm, those used by the by Kalińska et al. were 0.5–80 nm. Differences also appeared in the hydrodynamic diameters of NPs, whereas in our study the AgNPs used in the experiment showed less potential for forming agglomerates. At 154.5 nm, the potential was 262 nm for Kalińska et al. The CuNPs in our study showed almost double the potential (580.70 nm) in comparison with the results from Kalińska et al. (288.6 nm). Nevertheless, both the nanoparticles in our study and Kalińska et al.'s studies showed good bactericidal activity. Despite these differences, AgNPs and CuNPs both showed antibacterial activity, which is consistent with the results of our study. Lange et al. [44] used AgNPs that had very similar zeta potential (−26.7 mV) and hydrodynamic diameter (154.1 nm) values to the nanoparticles used in our experiment. However, the zeta potential of the AgCuNP complex (−9.09 mV) in the studies by Lange et al. differed significantly from the value for the complex obtained from our experiment, which took a positive value of 15.63 mV. Despite this, the antimicrobial activity against G+ and G- bacteria in Lange et al.'s study and our study was similar. Research by Belyakova et al. [45] indicated that CuNPs and AgNPs had antibacterial activity against *Fusobacterium necrophorum*, *Treponema* spp., and *Borrelia* spp. bacteria, which are etiological factors that lead to lameness. Our results confirmed these nanoparticles' strong antibacterial activity against the isolated bacteria associated with lameness.

AuNPs were found to promote growth in the studied bacteria, which was not confirmed by other sources in the available literature, including bacteria not even associated with lameness. However, there are available reports that indicate that AuNPs had no antibacterial activity, or that they exhibited biocidal activity only at high concentrations, which is consistent with our results [46]. There are also reports that AuNPs exhibited antimicrobial activity against G- and G+ bacteria, but this was due to the matching of the nanoparticles' functional groups [19], which was not applied in our experiment. In contrast, the AuAgNP and AuCuNP complexes showed strong antibacterial properties even at low concentrations. Similar synergistic interaction results were observed by Lange et al. [44], who pointed out that nanoparticles can disrupt bacteria biofilm and that this phenomenon is important in, for example, bovine mammary gland inflammation.

The available literature is very limited concerning the bacteria associated with DD, and the bacteria isolated for this study have never been associated with digital dermatitis. Therefore, the authors compared the effect of metal NPs on microorganisms, differentiating them in relation to the structural differences between the walls of gram-negative and gram-positive bacteria, which affected their susceptibility to external environmental factors. Isolating and making cultures of these pathogens is challenging, which means the number of available sources is limited and the issue itself is under-researched. Therefore, it is exceedingly difficult to address the reports of other authors. On the other hand, this fact also suggests the importance of conducting further research in this field.

Perhaps the discrepancies in the effects of nanoparticles on the aerobic and anaerobic species that were isolated from diseased hooves were due to the anaerobic species' nature, the structure of the cells and their composition, the metabolic processes of the bacteria, and the characteristic features of the species [33]. In any case, there has been no research in this direction, and this requires further development of the topic.

4. Materials and Methods

4.1. Isolated Bacteria Cultures

Biological material (tissue samples, pus, pus and blood, and other swabs from the cattle diagnosed with lameness) was placed in a saline solution and then inserted into a Stuart orbital incubator SI500 shaker (Reagecon Diagnostics Ltd., Shannon, Ireland) for 24 h at 5 °C. The resulting suspension was seeded onto a Columbia agar + blood/Chocolate agar, CASA (Argenta, Poznań, Poland) and onto brain–heart agar (Biomaxima, Lublin, Poland). The cultures were placed in aerobic and anaerobic environments to maximize the possibility of increasing the numbers of the different isolated pathogen species. The bacterial culture was processed in an aerostat using a GENbag anaer atmosphere generator (bioMérieux, Warsaw, Poland). Material from the cultivated colonies was diagnosed using a MALDI-TOF MS (Bruker, Poznań, Poland) and a VITEK 2 (bioMérieux, Warsaw, Poland) to verify the species that had been isolated.

4.2. Nanoparticles

Commercially available nanoparticles, AuNPs, AgNPs, CuNPs, FeNPs, and PtNPs, which were used in the experiment, were obtained from Nano-tech (Warsaw, Poland). Nanoparticle hydrocolloids were sonicated for 2 min at 500 W and 20 kHz before their use in tests.

4.3. Determination of the Nanoparticles' Morphology

The morphology of the nanoparticles obtained from Nano-Tech Poland was determined by analyzing transmission electron microscopy (TEM) images. The nanoparticles were viewed using a JEM-2000EX transmission electron microscope (JEOL). The nanoparticles' hydrocolloid was sonicated for two minutes and then applied to a molding TEM grids (Formvar on 3 mm 200 mesh Cu grids, Agar Scientific, Stansted, UK) and left to dry for 24 h. Images of the nanoparticles were taken at a voltage of 80 keV.

4.4. Determination of the Physicochemical Properties of Nanoparticles

The zeta potential and size distribution were determined using a Zetasizer Nano ZS (ZEN3500, Malvern Instruments, Malvern, UK). The average size of selected nanoparticles was measured by transmission electron microscopy and by dynamic light scattering (DLS) in order to determine the hydrodynamic size (average agglomerate size).

4.5. Determination of Bacterial Viability after Treatment with Nanoparticles and Their Complexes

A suspension of bacteria was prepared from each isolate at an optical density of 0.5 on the McFarland scale (1.5×10^8 CFU/mL). The suspension was pipetted into a 96-well plate at a volume of 50 µL per well. The experiment used commercially available AuNPs, AgNPs, CuNPs, FeNPs, and PtNPs (Nano-tech, Warsaw, Poland), which were extracted

using physical methods. Following that, 50 µL each of nanoparticle hydrocolloids were added so that the final NP concentrations were as follows: for single nanoparticles—1.56, 3.125, 6.25, 12.5, and 25 ppm; for PtNPs—0.625, 1.25, 2.5, 5, and 10 ppm. The concentrations for the nanocomplexes were 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, and 12.5 ppm. Incubation was carried out for 24 h at 37 °C under anaerobic conditions. After 24 h, 10 µL of Presto Blue reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA) was added to each well and the absorbance was read spectrophotometrically at 570 nm (Tecan, Durham, NC, USA). Viability was determined from the following formula:

$$\frac{\text{absorbance of the experimental sample}}{\text{absorbance of the control sample}} \times 100\%$$

The data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) in STATGRAPHICS® Centurion XVII, version 17.2.05 software (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

5. Conclusions

The conducted in vitro study confirmed that AuNPs, AgNPs, and CuNPs have antibacterial activity against selected digital dermatitis pathogens and confirms their synergistic effect, however their effects varied according to their concentrations. AgNPs and CuNPs exhibited the strongest antibacterial properties, whereas the most active complex was AgCuNPs ($p \leq 0.05$). The highest concentration tested for AuNPs was 25 ppm, and this reduced the viability of *Sphingomonas paucimobilis*, *Ochrobactrum gallinifaecis*, and *Actinomyces odontolyticus* by 14.80%, 14.76%, and 6.92%, respectively. In the case of AgNPs and CuNPs, a strong biocidal effect was observed at the lower concentrations of 12.5 ppm and 6.25 ppm, respectively. The AgCuNP complex, at concentrations of 6.25 and 12.5 ppm, decreased pathogen viability to 1–6%. PtNPs and FeNPs showed very weak antibacterial activity, and, in certain cases, selected NPs that promoted bacterial growth; in contrast, all nanocomplexes reduced pathogen viability. The study suggests that AgCuNPs may provide an alternative to antibiotics in the treatment of digital dermatitis, but further in vivo experiments are required to confirm their biocidal properties under herd conditions.

Author Contributions: Conceptualization, writing—original draft preparation, review and editing, investigation, M.K.; writing—original draft preparation, review and editing, A.K.; methodology and investigation, S.J. and M.W.; supervision, review and editing, S.S.; supervision, conceptualization, formal analysis, funding acquisition and supervision, M.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Financial support for this study was obtained from project nr. POIR.01.01.01-00-2127/20-00, entitled “NanoCow—Development and Implementation of a Line of Products for the Prevention of Mastitis and Lameness Against Bacterial and Fungal Infections with the Use of Nanomaterials” provided by the National Centre for Research and Development. This is the first part of a PhD thesis of Magdalena Kot.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data available on request.

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

References

1. Steinfeld, H. The livestock revolution—A global veterinary mission. *Vet. Parasitol.* **2004**, *125*, 19–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ndou, S.P.; Muchenje, V.; Chimonyo, M. Animal welfare in multipurpose cattle production Systems and its implications on beef quality. *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 1049–1064.
3. Miglior, F.; Fleming, A.; Malchiodi, F.; Brito, L.F.; Martin, P.; Baes, C.F. A 100-Year Review: Identification and genetic selection of economically important traits in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 10251–10271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Schroeder, C.M.; Parlor, K.W.; Marsh, T.L.; Ames, N.K.; Goeman, A.K.; Walker, R.D. Characterization of the predominant anaerobic bacterium recovered from digital dermatitis lesions in three Michigan dairy cows. *Anaerobe* **2003**, *9*, 151–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wilson-Welder, J.H.; Alt, D.P.; Nally, J.E. Digital Dermatitis in Cattle: Current Bacterial and Immunological Findings. *Animals* **2015**, *5*, 1114–1135. [[CrossRef](#)]
6. Zinicola, M.; Lima, F.; Lima, S.; Machado, V.; Gomez, M.; Döpfer, D.; Guard, C.; Bicalho, R. Altered Microbiomes in Bovine Digital Dermatitis Lesions, and the Gut as a Pathogen Reservoir. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120504. [[CrossRef](#)]
7. Knappe-Poindecker, M.; Gilhuus, M.; Jensen, T.K.; Kitgaard, K.; Larssen, R.B.; Fjeldaas, T. Interdigital dermatitis, heel horn erosion, and digital dermatitis in 14 Norwegian dairy herds. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 7617–7629. [[CrossRef](#)]
8. Krull, A.C.; Shearer, J.K.; Gorden, P.J.; Cooper, V.L.; Phillips, G.J.; Plummer, P.J. Deep Sequencing Analysis Reveals Temporal Microbiota Changes Associated with Development of Bovine Digital Dermatitis. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 3359–3373. [[CrossRef](#)]
9. Laven, R.A.; Logue, D.N. Treatment strategies for digital dermatitis for the UK. *Vet. J.* **2006**, *171*, 79–88. [[CrossRef](#)]
10. Evans, N.J.; Murray, R.D.; Carter, S.D. Bovine digital dermatitis: Current concepts from laboratory to farm. *Vet. J.* **2016**, *211*, 3–13. [[CrossRef](#)]
11. Berry, S.L.; Read, D.H.; Famula, T.R.; Mongini, A.; Döpfer, D. Long-term observations on the dynamics of bovine digital dermatitis lesions on a California dairy after topical treatment with lincomycin HCl. *Vet. J.* **2012**, *193*, 654–658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Morones, J.B.; Elechiguerra, J.L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J.B.; Ramirez, J.T.; Yacaman, M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2346–2353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kim, J.S.; Kuk, E.; Yu, K.N.; Kim, J.H.; Park, S.J.; Lee, H.J.; Kim, S.H.; Park, Y.K.; Park, Y.H.; Hwang, C.Y.; et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2007**, *3*, 95–101. [[CrossRef](#)]
14. Cavalieri, F.; Tortora, M.; Stringaro, A.; Colone, M.; Baldassarri, L. Nanomedicines for antimicrobial interventions. *J. Hosp. Infect.* **2014**, *88*, 183–190. [[CrossRef](#)]
15. Panáček, A.; Kvítek, L.; Pucek, R.; Kolář, M.; Večeřová, R.; Pizúrová, N.; Sharma, V.K.; Nevěčná, T.; Zbořil, R. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16248–16253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Espinosa-Cristobal, L.F.; Martinez-Castanon, G.A.; Martinez-Martinez, R.E.; Loyola-Rodriguez, J.P.; Patino-Marin, N.; Reyes-Macias, J.F.; Ruiz, F. Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Mater. Lett.* **2009**, *63*, 2603–2606. [[CrossRef](#)]
17. Saravanan, M.; Nanda, A. Extracellular synthesis of silver bionanoparticles from *Aspergillus clavatus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Colloids Surf. B* **2010**, *77*, 214–218. [[CrossRef](#)]
18. Mi, G.; Shi, D.; Wang, M.; Webster, T.J. Reducing Bacterial Infections and Biofilm Formation Using Nanoparticles and Nanostructured Antibacterial Surfaces. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, e1800103. [[CrossRef](#)]
19. Li, X.; Robinson, S.M.; Gupta, A.; Saha, K.; Jiang, Z.; Moyano, D.F.; Sahar, A.; Riley, M.A.; Rotello, V.M. Functional Gold Nanoparticles as Potent Antimicrobial Agents against Multi-Drug-Resistant Bacteria. *ACS Nano* **2014**, *8*, 10682–10686. [[CrossRef](#)]
20. Wernicki, A.; Puchalski, A.; Urban-Chmiel, R.; Dec, M.; Stęgierska, D.; Dudzic, A.; Wójcik, A. Antimicrobial properties of gold, silver, copper and platinum nanoparticles against selected microorganisms isolated from cases of mastitis in cattle. *Med. Weter* **2014**, *70*, 564–567.
21. Jan, H.; Gul, R.; Andleeb, A.; Ullah, S.; Shah, M.; Khanum, M.; Ullah, I.; Hano, C.; Bilal Haider Abbasi, B.H. A detailed review on biosynthesis of platinum nanoparticles (PtNPs), their potential antimicrobial and biomedical applications. *J. Saudi Chem. Soc.* **2021**, *25*, 101297. [[CrossRef](#)]
22. Vitta, Y.; Figueroa, M.; Calderon, M.; Ciangherotti, C. Synthesis of iron nanoparticles from aqueous extract of *Eucalyptus robusta* Sm and evaluation of antioxidant and antimicrobial activity. *Mater. Sci. Energy Technol.* **2020**, *3*, 97–103. [[CrossRef](#)]
23. Ramyadevi, J.; Jeyasubramanian, K.; Marikani, A.; Rajakumar, G.; Rahuman, A.A. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Mater. Lett.* **2012**, *71*, 114–116. [[CrossRef](#)]
24. Kalińska, A.; Jaworski, J.; Wierzbicki, M.; Gołbiewski, M. Silver and Copper Nanoparticles—An Alternative in Future Mastitis Treatment and Prevention? *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1672. [[CrossRef](#)]
25. Munita, J.M.; Arias, C.A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*, 481–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Majumder, S.; Jung, D.; Ronholm, J.; George, S. Prevalence and mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from mastitic dairy cattle in Canada. *BMC Microbiol.* **2021**, *21*, 1–14. [[CrossRef](#)]
27. Singer, R.S.; Finch, R.; Wegener, H.C.; Bywater, R.; Walters, J.; Lipsitch, M. Antibiotic resistance—The interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3*, 47–51. [[CrossRef](#)]
28. Schwarz, S.; Kehrenberg, C.; Walsh, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2001**, *17*, 431–437. [[CrossRef](#)]
29. Martinez, J.L.; Fajardo, A.; Garmendia, L.; Hernandez, A.; Linares, J.F.; Martinez-Solano, L.; Sánchez, M.B. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **2009**, *34*, 44–65. [[CrossRef](#)]
30. Carlet, J.; Pulcini, C.; Piddock, L.V.J. Antibiotic resistance: A geopolitical issue. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 949–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Khezerlou, A.; Alizadeh-Sani, M.; Azizi-Lalabadi, M.; Ehsani, A. Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses. *Microbiol. Pathog.* **2018**, *123*, 505–526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Lee, J.W.; Son, J.; Yoo, K.M.; Lo, Y.M.; Moon, B. Characterization of the antioxidant activity of gold and platinum nanoparticles. *RSC Adv.* **2014**, *38*, 19824–19830. [[CrossRef](#)]
33. Hajipour, M.J.; Fromm, K.M.; Ashkarran, A.A.; Jimenez de Aberasturi, D.; Ruiz de Larramendi, I.; Rojo, T.; Serpooshan, V.; Parak, W.J.; Mahmoudi, M. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 499–511. [[CrossRef](#)]
34. Tang, S.; Zheng, J. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, e1701503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hernandez, J.; Shearer, J.K. Efficacy of oxytetracycline for treatment of papillomatous digital dermatitis lesions on various anatomic locations in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2000**, *216*, 1288–1290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Umadevi, M.; Rani, T.; Balakrishnan, T.; Ramanibai, R. Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Prepared Under an Ultrasonic Field. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol.* **2011**, *4*, 1491–1496.
37. Shamaila, S.; Zafar, N.; Riaz, S.; Sharif, R.; Nazir, J.; Naseem, S. Gold Nanoparticles: An Efficient Antimicrobial Agent against Enteric Bacterial Human Pathogen. *Nanomaterials* **2016**, *6*, 71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Rai, M.K.; Deshmukh, S.D.; Ingle, A.P.; Gade, A.K. Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J. App. Microbiol.* **2012**, *112*, 841–852. [[CrossRef](#)]
39. Alizadeh, H.; Salouti, M.; Shapouri, R. Intramacrophage antimicrobial effect of silver nanoparticles against *Brucella melitensis* 16M. *Sci. Iran.* **2013**, *20*, 1035–1098. [[CrossRef](#)]
40. Han, D.W.; Woo, Y.I.; Lee, M.H.; Lee, J.H.; Lee, J.; Park, J.C. In-Vivo and In-Vitro Biocompatibility Evaluations of Silver Nanoparticles with Antimicrobial Activity. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2012**, *12*, 5205–5209. [[CrossRef](#)]
41. Shankar, S.; Rhim, J.W. Effect of copper salts and reducing agents on characteristics and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Mater. Lett.* **2014**, *132*, 307–311. [[CrossRef](#)]
42. Chowdhury, M.N.K.; Beg, M.D.H.; Khan, M.R.; Mina, M.F. Synthesis of copper nanoparticles and their antimicrobial performances in natural fibres. *Mater. Lett.* **2013**, *98*, 26–29. [[CrossRef](#)]
43. Dugal, S.; Mascarenhas, S. Chemical synthesis of copper nanoparticles and its antibacterial effect against gram negative pathogens. *J. Adv. Sci. Res.* **2015**, *6*, 1–4.
44. Lange, A.; Grzenia, A.; Wierzbicki, M.; Strojny-Cieslak, B.; Kalińska, A.; Gołębiewski, M.; Radzikowski, D.; Sawosz, E.; Jaworski, S. Silver and Copper Nanoparticles Inhibit Biofilm Formation by Mastitis Pathogens. *Animals* **2021**, *11*, 1884. [[CrossRef](#)]
45. Belyakova, N.; Kovalenko, A.; Bordova, Y. Development of Drugs for Treatment of Mortellaro's Disease in Cattle. In *Advances in Biological Sciences Research, Proceedings of the 1st International Symposium Innovations in Life Sciences (ISILS 2019), Belgorod, Russia, 10–11 October 2019*; Atlantis Press: Paris, France, 2019.
46. Zhang, Y.; Dasari, T.P.S.; Deng, H.; Yu, H. Antimicrobial Activity of Gold Nanoparticles and Ionic Gold. *J. Environ. Sci. Health C* **2015**, *33*, 286–327. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Mgr inż. Magdalena Kot

Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

magdalena_kot@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Aleksandra Kalińska, Sławomir Jaworski, Mateusz Wierzbicki, Sebastian Smulski, Marcin Gołębiowski. *In Vitro* Studies of Nanoparticles as a Potentially New Antimicrobial Agent for the Prevention and Treatment of Lameness and Digital Dermatitis in Cattle. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 6146

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: opracowaniu koncepcji i metodologii doświadczenia, prowadzeniu badań, analizie, interpretacji i walidacji danych, przygotowaniu i krytycznej weryfikacji manuskryptu, prowadzeniu procesu recenzyjnego, redakcji i korekcy manuskryptu, co stanowi 79 % pracy.

Magdalena Kot

podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Dr inż. Aleksandra Kalińska

Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

aleksandra_kalinska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Aleksandra Kalińska, Sławomir Jaworski, Mateusz Wierzbicki, Sebastian Smulski, Marcin Gołębiewski. *In Vitro* Studies of Nanoparticles as a Potentially New Antimicrobial Agent for the Prevention and Treatment of Lameness and Digital Dermatitis in Cattle. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 6146

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na prowadzeniu nadzoru nad prowadzonymi badaniami, co stanowi 3 % pracy.



podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Dr hab. Sławomir Jaworski, prof. SGGW

Katedra Nanobiotechnologii

Instytut Biologii

slawomir_jaworski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Aleksandra Kalińska, Sławomir Jaworski, Mateusz Wierzbicki, Sebastian Smulski, Marcin Gołębiewski. *In Vitro* Studies of Nanoparticles as a Potentially New Antimicrobial Agent for the Prevention and Treatment of Lameness and Digital Dermatitis in Cattle. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 6146

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metodologii doświadczenia oraz prowadzeniu badań, co stanowi 5 % pracy.

podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Dr hab. Mateusz Wierzbicki, prof. SGGW

Katedra Nanobiotechnologii

Instytut Biologii

mateusz_wierzbicki@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Aleksandra Kalińska, Sławomir Jaworski, Mateusz Wierzbicki, Sebastian Smulski, Marcin Gołębiowski. *In Vitro* Studies of Nanoparticles as a Potentially New Antimicrobial Agent for the Prevention and Treatment of Lameness and Digital Dermatitis in Cattle. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 6146

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metodologii doświadczenia oraz prowadzeniu badań, co stanowi 5 % pracy.


podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Dr n. wet. Sebastian Smulski

Katedra Chorób Wewnętrznych i Diagnostyki

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

sebastian.smulski@up.poznan.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Aleksandra Kalińska, Sławomir Jaworski, Mateusz Wierzbicki, Sebastian Smulski, Marcin Gołębiowski. *In Vitro* Studies of Nanoparticles as a Potentially New Antimicrobial Agent for the Prevention and Treatment of Lameness and Digital Dermatitis in Cattle. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 6146

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na prowadzeniu nadzoru nad prowadzonymi badaniami, co stanowi 3 % pracy.

Smulski

podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Prof. dr hab. Marcin Gołębiewski
Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
marcin_golebiewski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Aleksandra Kalińska, Sławomir Jaworski, Mateusz Wierzbicki, Sebastian Smulski, Marcin Gołębiewski. *In Vitro* Studies of Nanoparticles as a Potentially New Antimicrobial Agent for the Prevention and Treatment of Lameness and Digital Dermatitis in Cattle. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 6146

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz pozyskanie funduszy, co stanowi 5 % pracy.



podpis

Evaluation of the Antimicrobial, Cytotoxic, and Physical Properties of Selected Nano-Complexes in Bovine Udder Inflammatory Pathogen Control

Mateusz Wierzbicki¹, Magdalena Kot², Agata Lange¹, Aleksandra Kalińska²,
Marcin Gołębiewski², Sławomir Jaworski¹

¹Department of Nanobiotechnology, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, 02-786, Poland; ²Animal Breeding Department, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, 02-786, Poland

Correspondence: Sławomir Jaworski, Department of Nanobiotechnology, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8 street, Warsaw, 02-786, Poland, Email slawomir_jaworski@sggw.edu.pl

Purpose: *Mastitis* in dairy cows is a worldwide problem faced by dairy producers. Treatment mainly involves antibiotic therapy, however, due to widespread antibiotic resistance among bacteria, such treatments are no longer effective. For this reason, scientists are searching for new solutions to combat *mastitis*, which is caused by bacteria, fungi, and algae. One of the most promising solutions, nanotechnology, is attracting research due to its biocidal properties. The purpose of this research was to determine the biocidal properties of nanocomposites as a potential alternative to antibiotics in the control of *mastitis*, as well as to determine whether the use of nanoparticles and what concentration is safe for the breeder and the animal.

Patients and Methods: In this study, the effects of Ag, Au, Cu, Fe, and Pt nanoparticles and their complexes were evaluated in relation to the survival of bacteria and fungi isolated from cattle diagnosed with *mastitis*, their physicochemical properties, and their toxicity to bovine and human mammary epithelial cells BME-UV1 and HMEC (human microvascular endothelial cells). Moreover, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, and *Prototheca* sp. invasion was assessed using the alginate bead (bioprinted) model. The NPs were tested at concentrations of 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 mg/l for Au, Ag, Cu and Fe NPs, and 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/l for Pt.

Results: With the exception of Fe and Pt, all exhibited biocidal properties against isolates, while the AgCu complex had the best effect. In addition, nanoparticles showed synergistic effects, while the low concentrations had no toxic effect on BME-UV1 and HMEC cells.

Conclusion: Synergistic effects of nanoparticles and no toxicity to bovine and human cells might, in the future, be an effective alternative in the fight against microorganisms responsible for *mastitis*, and the implementation of research results in practice would reduce the percentage of dairy cows suffering from *mastitis*. The problem of increasing antibiotic resistance is posing a global threat to human's and animal's health, and requires comprehensive research to evaluate the potential use of nanoparticles – especially their complexes – as well as to determine whether nanoparticles are safe for the breeders and the animals. The conducted series of studies allows further consideration of the use of the obtained results in practice, creating a potentially new alternative to antibiotics in the treatment and prevention of *mastitis* in dairy cattle.

Keywords: cattle, mastitis, bacteria, fungi, nanocomposites

Introduction

The most common and expensive issue occurring in cattle herds is *mastitis*, ie, inflammation of the udder tissue. Despite advancing science and some innovative solutions, this problem is faced by breeders worldwide. *Mastitis* reduces the animal's health condition, negatively affects their welfare, and results in financial losses.¹

Mastitis is a multifactorial disease that is primarily caused by microorganisms such as bacteria: gram-positive *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus uberis*, and gram-negative *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. and *Mycoplasma* spp.² as well as fungi, especially the yeast *Candida albicans*. In recent years,

there have also been cases involving algae, such as *Prototheca* sp., which is highly resistant to all available commercial therapeutics, among other antibiotics.³

Despite the implementation of *mastitis* control strategies and an increasing knowledge of this disease, it is an ongoing issue with an increasing frequency of occurrence. Particularly alarming is the fact that there is increasing antibiotic resistance among bacteria, due to their overuse and incorrect usage. Currently available agents—among others, antibiotics, antifungal, and antibacterial agents—are not very effective,² therefore, it is crucial to search for new, effective alternatives.

In recent years, an increasing number of studies have targeted the use of metal nanoparticles (NPs). They are especially appreciated because of their numerous properties. These include drug delivery,⁴ antiviral properties,⁵ antifungal,⁶ anti-parasitic,⁷ therefore, they are very often used in medicine,⁸ pharmacy,⁹ and cosmetology.¹⁰ In vitro studies also confirm anticancer activities of nanocomposites.¹¹

The scope of recent research using nanoparticles has been developing specifically in the context of bacterial control, due to their unique properties and affinity for bacterial cells, which is dependent on the morphological and physicochemical properties of the nanoparticles.^{12,13} There are different methods of nanoparticle synthesis. These can be biological method, which is the most environmentally friendly of all possible synthesis methods. This method uses various living organisms including: bacteria, viruses,¹⁴ but also yeasts,¹⁵ fungi,¹⁶ algae,¹⁷ as well as land plants, their extracts,^{18,19} and even submerged plants,^{20,21} which exhibit biocidal properties. Nanoparticles can also be synthesized by chemical methods using various chemicals, and by physical methods using, for instance, UV radiation, ultrasound, and laser rays as well as various reducing agents.^{22,23} Unfortunately, both chemical and physical methods of synthesis use toxic chemicals, which have a significant negative impact on the environment. Nanoparticle synthesis works based on two methods, first is top-down which involves breaking down a large mass into smaller ones, and the second method is bottom-up, which works the opposite way – materials of nano-size are combined into larger structures.²⁴ However, the most important feature of nanoparticles in the context of their use in combating pathogens, is the bacteria's inability to develop resistance to them.²⁵

Previous studies have also shown that metal nanoparticles interact with the external structures of bacteria (the membrane and cell wall), which can lead to disruption of the membrane potential, damage to the cell membrane, and activation of oxidative stress.^{26,27}

The previously described literature reports suggest that the application of several types of nanoparticles (Au, Ag, Cu, Fe, and Pt) and the exploitation of their synergistic effects as complexes, might, in the future, be an effective alternative in the fight against the microorganisms responsible for *mastitis*. The implementation of research results in practice would help breeders around the world and reduce the percentage of dairy cows suffering from *mastitis*, thereby increasing their welfare. The nanoparticles' lack of toxicity to human mammary epithelial cells (HMEC) and the bovine mammary epithelial cell-line BME-UV1 has recently been confirmed,²⁸ however, there is a shortage of information in the literature about the cytotoxic effects of nanoparticle complexes. In addition, there have been no studies indicating the effect of nanocomposites (Au, Ag, Cu, Pt, and Fe NPs) on pathogens isolated from the milk from cows with subclinical *mastitis*.

The aim of this study was to determine the biocidal effects of commercially available nanoparticles (Ag, Cu, Au, Pt, and Fe) obtained by physical methods, on bacteria, fungi, and algae isolated from cows diagnosed with *mastitis*. The conducted study also determined the effect of their physicochemical properties (morphology, size of selected nanoparticles their zeta potential, and hydrodynamic diameters). The purpose of this study was also to test nanocomposites of the above-mentioned NPs due to their potential synergistic effects against mastitic pathogens. The aim was also to determine the applicability of this technology not only in terms of the effectiveness of the biocidal properties of nanoparticles against mastitic pathogens but also in terms of safety against other cells. Therefore, studies were conducted to determine the toxicity of single nanoparticles and their complexes against bovine and human mammary epithelial cells BME-UV1 and HMEC. Thus, according to the stated purpose it was possible to determine whether the use of nanoparticles and what concentration is safe for the breeder and the animal. Among the main goals was also determining the level of reactive oxygen species, which are responsible for inducing oxidative stress, making the nanoparticles exhibit antibacterial activity.

In this study, we assessed the toxicity of Au, Ag, Cu, Pt, and Fe NPs and their complexes on human and bovine mammary epithelial cells as well as bacterial and fungal isolates such as *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus sciuri*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Prototheca* sp., *Citrobacter koseri*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis*. The biological material used was mastitic milk collected from Holstein-Friesian cows with diagnosed

mastitis (SCC > 400,000/mL). Subsequently, the cultured colonies were submitted for identification using a MALDI-TOF MS apparatus (Bruker, Poznań, Poland), resulting in precise and reliable identification. For selected strains of microorganisms, the study of the invasion of microorganisms and cell viability in biofilm was carried out in a method utilizing bioprinted alginate beads.

Materials and Methods

Morphology of Nanoparticles

Hydrocolloidal Ag, Au, Cu and Pt nanoparticles were purchased from the Nano-Tech Poland (Warsaw, Poland), while the Fe nanoparticles were purchased from 3d-nano (Cracow, Poland), with a purity >97.0%. It was produced by a nonexplosive, high-voltage method, using a high-purity metal (99.9999%) and high-purity demineralized water. To determine the morphology of the nanoparticles, transmission electron microscopy (TEM) images were acquired using a JEM-1220 microscope (Jeol, Tokyo, Japan) at 80 kV with a Morada 11-megapixel camera (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany). Samples were prepared by placing droplets of hydrocolloids at a concentration of 10 mg/l onto formvar-coated copper grids (Agar Scientific, Stansted, UK) that were air-dried before observation.

Physicochemical Properties of Selected Nanoparticles (Size, Zeta Potential, and Average Hydrodynamic Size)

Zeta potential measurements were performed by microelectrophoresis with Smoluchowski approximation and size distribution measurements by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano-ZS90 analyzer (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) after stabilization of the colloids for 120 s at 25 °C in triplicate. FT-IR analysis of Ag and Cu nanoparticles has been carried out in our recent publications.^{29,30}

The Cell Culture of BME-UVI and HMEC Cells

The BME-UV1 cells were purchased from the Cell Bank of The Lombardy and kindly provided by Prof. M. Gajewska (Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Poland) and were maintained in DMEM/F12, RPMI-1640, and NCTC 135 medium (Thermo Fisher Scientific) at a ratio of 5:3:3, which was enriched with alpha lactose (0.1%, Merck), glutathione (1.2 mM, Merck), bovine insulin (1 µg/mL, Merck), bovine holo-transferrin (5 µg/mL, Thermo Fisher Scientific), hydrocortisone (1 µg/mL, Merck), L-ascorbic acid (10 µg/mL, Merck), 10% FBS (Thermo Fisher Scientific), and an antibiotic and an antimycotic Thermo Fisher Scientific).

HMEC cells were obtained from Thermo Fisher Scientific and were maintained in HuMEC Ready Medium (Thermo Fisher Scientific) containing bovine pituitary extract (BPE) at a concentration of 50 µg/mL (Thermo Fisher Scientific), HuMEC Supplement Kit (Thermo Fisher Scientific), and an antibiotic and an antimycotic (Thermo Fisher Scientific). The cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air.

Cell Viability Assay

To determine cell viability, a PrestoBlue HS assay (Thermo Fisher Scientific) metabolic activity analysis was performed. The cells were plated in a 96-well plate at 1×10^4 cells per well and incubated for 24 hours. The culture medium was then removed, and dilutions of nanoparticles in a new medium were added at final concentrations of 0.1, 0.5, 1, 2, and 2.5 mg/l at 100 µL per well. The control group consisted of cells in a medium without the addition of nanoparticles. After 24 hours of incubation, the culture medium was removed and 100 µL of new culture fluid containing 10% PrestoBlue HS reagent was added. After two hours of incubation in a cell culture incubator, the fluorescence (excitation wavelength 560 nm, emission wavelength 590 nm) was measured using a microplate reader (Infinite M200, Tecan, USA). The study was conducted as three independent experiments with three replications.

Prior to the actual analysis of cell metabolic activity, the potential for interference of nanoparticles with the PrestoBlue assay (Thermo Fisher Scientific) was assessed. The interference test was performed in exactly the same way as the actual analysis but without the presence of cells. The results of the interference tests are presented in the [Supplementary Figure S1A](#).

Membrane Perforation Analysis

To evaluate the integrity of the BME-UV1 and HMEC cell membranes, a CyQUANT Cell Proliferation Assay (Thermo Fisher Scientific) was used to determine the amount of lactate dehydrogenase (LDH) released from the cells. Cells were plated in a 96-well plate at a density of 1×10^4 cells per well, and then incubated for 24 hours. After incubation, the culture medium was removed and 100 μL per well of fresh medium containing 10% nanoparticles was added at final concentrations of 0.1, 0.5, 1, 2, and 2.5 mg/L. In the case of the BME-UV1 cells, in order to reduce interference by the LDH present in the FBS culture medium, the FBS content was reduced to 2%. The control group consisted of cells cultured in a medium without the addition of nanoparticles. After 24 hours of incubation, the culture plates were centrifuged; 50 μL of culture medium was transferred to a new 96-well plate and a reaction mixture was added. The plate was incubated for 20 minutes at room temperature in the absence of light. The reaction was then stopped by adding 50 μL of reaction-stopping solution per well. Absorbance was measured at 490 nm and 680 nm using a plate reader (Infinite M200, Tecan, USA). The absorbance value measured at 680 nm was subtracted from the value measured at 490 nm. The study was conducted as three independent experiments with three replications.

Prior to the actual analysis of membrane perforation, the potential for NDs to interfere with the assay was assessed. The interference test was performed in exactly the same way as the actual analysis but without the presence of cells. The results of the interference tests are presented in [Supplementary Figure S1B](#).

Evaluation of the Morphology of BME-UV1 and HMEC Cells After Treatment with Nanoparticles

To obtain morphological images of the BME-UV1 and HMEC cell lines, 5×10^4 cells were transferred to 24-well plates. After 24 hours of incubation, nanoparticles were added to a culture media to produce a final concentration of 2.5 $\mu\text{g/mL}$. After 24 hours, cell morphology was analyzed using a CKX41 inverted light microscope (OLYMPUS, Japan) with a 20x phase-contrast objective.

Bacteria Cultures

Samples of mastitic milk were collected from farms from July 2021 to March 2022. The collected samples were submitted to standard microbiological procedures for initial multiplication and preliminary species identification: strains were isolated and then cultured on solid and liquid media. Specialized microbiological media (Biomaxima, Poland) were used to culture the strains: nutrient broth for general microbial culture, Mannitol Salt Lab-Agar, Edwards Lab-Agar with the addition of bovine blood, Chromogenic Uri-Color Lab-Agar, MacConkey Lab-Agar, Salmonella-Shigella Lab-Agar, Chromogenic Candida Lab Agar, Rose Bengal Lab-Agar, TBX Lab-Agar, Chromogenic Coliform Lab-Agar, LB Broth, Rogosa LS Lab-Agar, Reinforced Clostridial Medium, Legionella CYE Lab-Agar Base, Listeria acc., Oxford Lab-Agar Base, Enterococcus Confirmatory Lab-Agar, Eijkman Lactose Medium, Prototheca Isolation Medium according to Pore (1973),³¹ and Sabouraud dextrose agar (all from Argenta, Poland). Subsequently, the selected colony samples were subjected to identification on a MALDI-TOF MS (Bruker, Poznań, Poland).

Determination of the Survival of Microorganisms Isolated from Mastitic Milk Treated with Au, Ag, Pt, Cu, and Fe Nanoparticles and Their Complexes

The viability of microorganisms treated with Ag, Au, Cu, Fe, and Pt nanoparticles at selected concentrations was determined. For this purpose, cell suspensions with an optical density (OD) of 0.5 on the McFarland scale were prepared. The microorganism suspension, in a volume of 100 μL , was transferred to 96-well plates. Concentrated nanoparticle hydrocolloids were added to the wells to obtain the following nanoparticle concentrations (after mixing): 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 mg/L for Au, Ag, Cu and Fe, and 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/L for Pt. The incubation of the microorganisms with nanoparticles was carried out for 24 hours at 37 °C. Then, 20 μL of tetrazolium salt solution was added to each well. The amount of formazan produced (spectrophotometric measurement at 450 nm) was compared to the control group, in which the microorganisms had not been treated with nanoparticles, and the percentage of cell viability in the test group was calculated on this basis. After analyzing the results, dual-nanoparticle complexes were prepared, which showed inhibitory effects against the tested microorganisms. An analogous analysis to that described above was carried out for the complexes.

Determination of Reactive Oxygen Species (ROS)

The detection of intracellular ROS was determined using DCFDA (2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate) (Cat. No. 287,810, Sigma, St Louis, MO, USA). The microbial strains were cultured in a Mueller–Hinton broth medium (BioMaxima, Lublin, Poland) in a shaking incubator at 37 °C overnight. The nanocomposites were prepared by dilution in deionized water (final concentration 12.5 µg/mL) and sonicated for 30 min before use. The inoculum of microorganisms (1.5×10^8 cells per well) with the tested nanoparticles (final volume 100 µL) was placed in 96-well plates and incubated at 37 °C for 2 hours. A DCFDA reagent was prepared according to protocol, and 10 µL of the mixture was added to each well. Shortly after, the fluorescence measurements were conducted with an excitation wavelength at 495 nm and an emission wavelength at 527 nm using an Infinite M200 microplate reader (Infinite M200, Tecan, Durham, NC, USA). The results were replicated a minimum of three times for each group.

Assessment of Microbial Invasion

Beads were printed in a µ-Slide 8-well-chambered coverslip (Ibidi, Gräfelfing, Germany) with 6 µL of alginate with *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, or *Prototheca* sp. Alginate beads were crosslinked with 50 mM calcium chloride (Cellink, Göteborg, Sweden) for 1 minute. Subsequently, appropriate microbiologic media containing nanoparticles with a final concentration of 2.5 mg/l were added to the chambers and incubated for 48 hours. Media without nanoparticles were considered to be the control. After incubation, images of the chambered coverslip were made using a Scan 4000 colony counter (Interscience, Saint Nom la Brétèche France). For the confocal microscope analysis of biofilm formation after cell migration from alginate beads, each chamber was washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) (Thermo Fisher Scientific) so that the alginate beads and non-adherent microorganisms were washed away. The dead cells were then stained with Image-IT DEAD Green Viability Stain (Thermo Fisher Scientific; final concentration 0.1 µg/mL) for 30 minutes. After washing with PBS, the dead and live cells were stained with Hoechst 33,342 for 15 minutes (Thermo Fisher Scientific; final concentration 5 µg/mL). Cells were imaged using a FV-1000 confocal microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) equipped with an incubation chamber that maintained a temperature of 37 °C (Solent Scientific Ltd, Portsmouth, United Kingdom). Determination of invasion of microorganism from the alginate gel bead after treatment with AuNPs, AgNPs, CuNPs, and their complexes, was assessed using turbidity analysis and confocal microscopy assessment of the produced biofilm.

Statistical Analysis

The results of the tests on the toxicity of Ag, Cu, Au, Pt, and Fe nanoparticles and their complexes on bovine and human mammary epithelial cells—BME-UV1 and HMEC (respectively)—were statistically processed using multivariate analysis of variance ANOVA using GraphPad Prism 8 software. Differences between groups were analyzed using Dunnett's test. The results were expressed as mean values with standard deviations. Differences with a *p*-value of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

The statistical analysis used in the study of the survival rate of microorganisms isolated from mastitic milk treated with Au, Ag, Pt, Cu, and Fe nanoparticles and their complexes was developed using one-way analysis of variance (ANOVA) using STATGRAPHICS® Centurion XVII software, version 17.2.05 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

Results

Morphology of the Nanoparticles Analyzed from TEM Images

Transmission electron microscope (TEM) images was analyzed to evaluate morphology of the nanomaterials and their complexes (Figure 1). All the nanoparticles had a spherical morphology and a size range of approximately 20–60 nm (AgNP), 10–50 nm (AuNPs), 10–20 nm (CuNPs), 10–70 nm (FeNPs), 5–100 nm (PtNPs).

Physicochemical Properties of Selected Nanoparticles and Their Complexes

Table 1 shows the zeta potential of the nanoparticles and complexes used, which allows the stability of the dispersion and its durability over time to be assessed. Of the tested nanoparticles, all had a negative zeta-potential, while the most

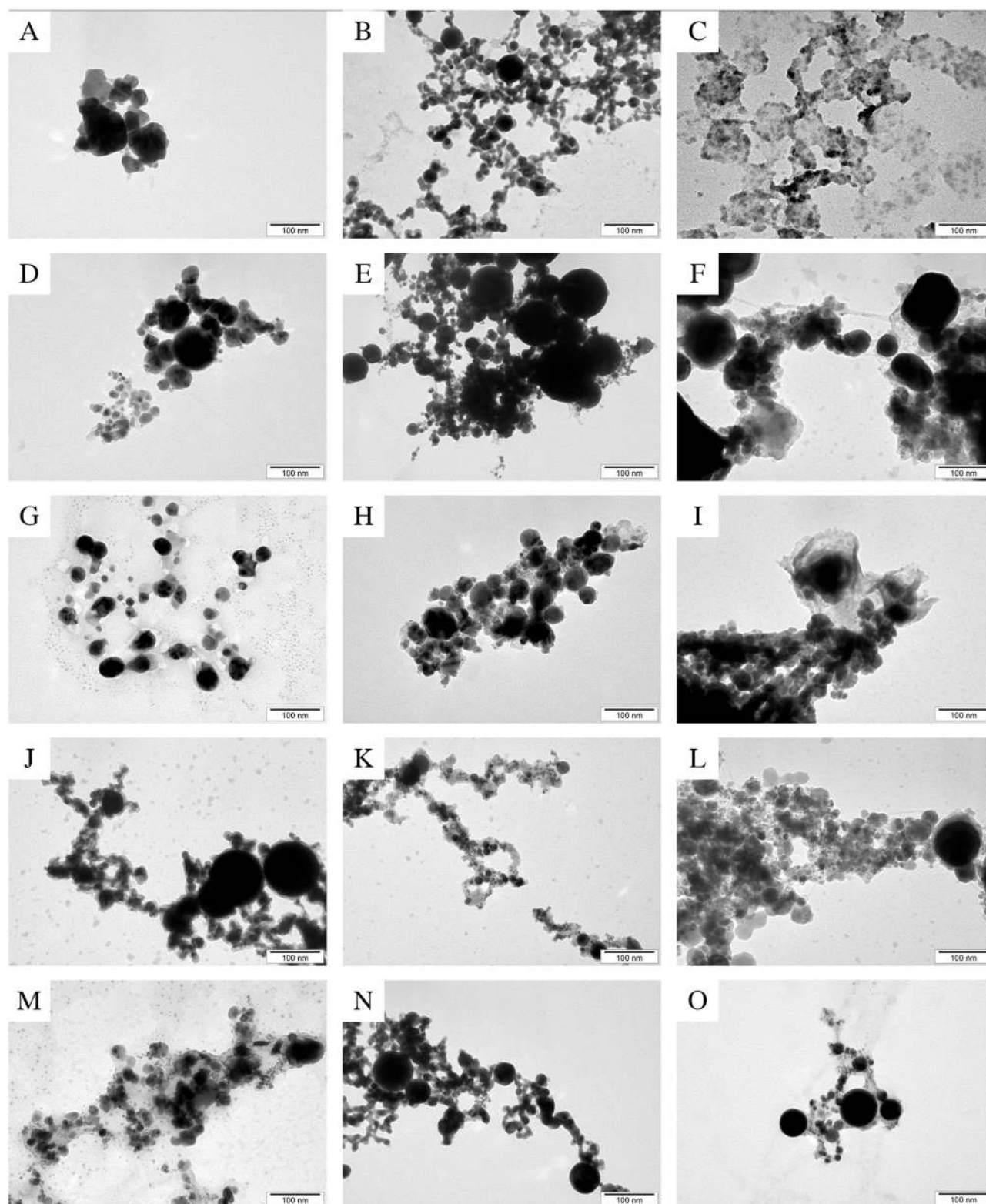


Figure 1 Transmission electron microscopy images of the nanoparticles and their complexes. (A) - AgNPs, (B) - AuNPs, (C) - CuNPs, (D) - FeNPs, (E) - PtNPs, (F) - AgFeNPs, (G) - AuAgNPs, (H) - AuFeNPs, (I) - CuAgNPs, (J) - CuAuNPs, (K) - CuPtNPs, (L) - CuFeNPs, (M) - PtAgNPs, (N) - PtAuNPs, (O) - PtFeNPs.

negative potential was found for FeNPs and AgNPs (about -38 mV). The AgCuNPs and CuAuNPs complexes had a potential closest to 0 (-13.2 and -18.9 respectively), which may account for their poorer dispersion stability performance. All the values established for hydrodynamic diameter reached positive values: from 143.8 to 538 nm.

Table 1 Zeta Potential (mV), Hydrodynamic Diameter (Nm), and Size (Nm) of the Used Nanoparticles and Complexes

Nanoparticle	Zeta Potential (mV)		Hydrodynamic Diameter (nm)		Size (nm)
	Values	Average	Values	Average	Values
Ag	-39.3 -39.2 -36.0	-38.2	127.5 130.4 173.6	143.8	25–80
Au	-31.0 -31.4 -33.6	-32	142.5 191.0 229.6	187.7	10–60
Cu	-23.8 -23.0 -22.0	-22.9	643.7 544.7 425.8	538	10–50
Pt	-32.1 -33.3 -33.0	-32.8	251.1 456.4 142.1	283.2	125
Fe	-38.0 -39.3 -38.1	-38.5	58.77 154.5 644.2	285.8	5–85
AgAu	-31.8 -38.0 -36.2	-35.3	128.7 147.0 221.1	165.6	5–50
AgCu	-13.4 -13.8 -12.5	-13.2	142.7 267.7 202.1	204.2	10–100
CuAu	-19.1 -18.9 -18.7	-18.9	191.9 456.2 553.6	400.6	10–120

The largest values were found for CuNPs (538 nm), while a slightly smaller value was obtained for the CuAuNP complex (400.6 nm). The smallest hydrodynamic diameter was obtained for AgNPs. The sizes of the nanoparticles used in the experiment are shown in [Table 1](#). Small measurements were obtained for AgAuNP and AuNP complexes (up to 50–60 nm), as well as for CuNP (10–50 nm); however, the size of the nano-copper NP was difficult to determine due to impurities and poor quality. The AgCuNP and CuAuNP complexes reached the largest sizes (up to 100–120nm).

Nanoparticle Interference Study Using the PrestoBlue HS Test, and CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay (Thermo Fisher Scientific)

The results of the interference test, with nanoparticles at concentrations of 0.1, 0.5, 1, 2, and 2.5 mg/l, are shown in [Supplementary Figure S1](#). There was no significant observable interference between the nanoparticles and their complexes, and the PrestoBlue HS test for any of the tested concentrations. This indicated that this assay does not interfere with the results and could be used for the rest of the experiment with BME-UV1 and HMEC cells.

Testing the Viability and Cell Membrane Integrity of the BME-UVI and HMEC Cells After Nanoparticle Treatment

The viability of BME-UV1 and HMEC cells was determined using a PrestoBlue HS assay that measured cell oxidoreductive activity. The results of cell viability after treatment with nanoparticles at concentrations of 0.1, 0.5, 1,

2, and 2.5 mg/L are shown in Figure 2, where A is the viability of the BME-UV1 cells and B is the viability of HMEC cells. Significant decreases in cell viability were observed for BME-UV1 and HMEC cells after treatment with copper nanoparticles at concentrations higher than 0.1 mg/L and for copper nanoparticle complexes (AgCuNPs, CuPtNPs, CuAuNPs, CuFeNPs). For other nanoparticles, toxicity to BME-UV1 cells did not occur or occurred only at the highest concentration tested, for example, for AgPtNP and AgFeNP complexes. For HMEC cell viability after treatment with Pt

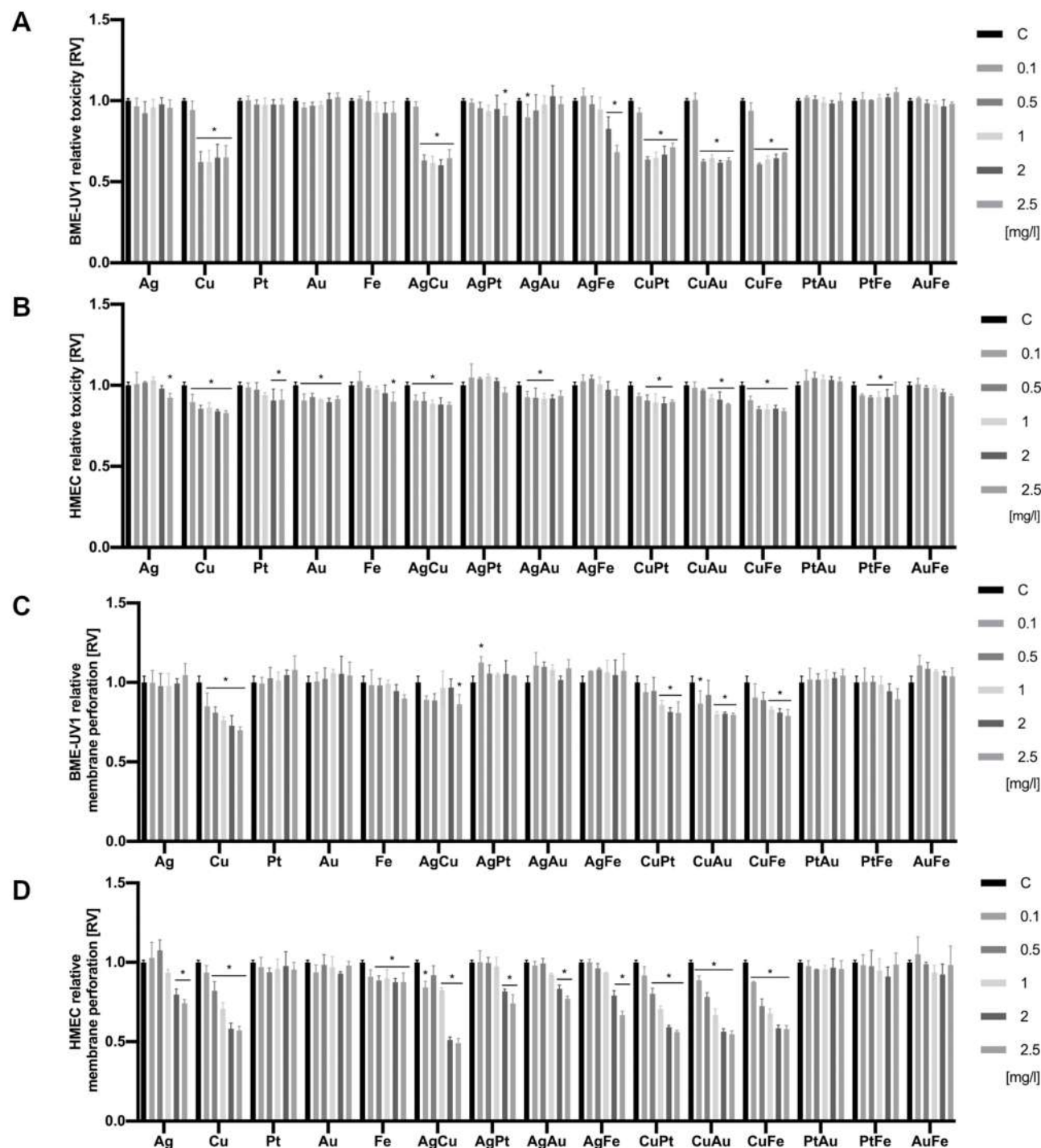


Figure 2 Toxicity of (A) - BME-UV1 cells and (B) - HMEC cells, after treatment with nanoparticles using the PrestoBlue assay. Examination of the cell membranes' integrity: (C) - epithelial BME-UV1 cells and (D) - HMEC cells, after treatment with nanoparticles.

Notes:*Indicates significantly statistical differences from control (C) at $p < 0.05$.

and Fe nanoparticles and their complexes, a toxicity of 10–15% was observed for the higher tested concentrations. For other nanoparticles, toxicity for either cell lines was not observed.

The integrity of cell membranes after the treatment of the epithelial BME-UV1 and HMEC cells with nanoparticles at concentrations of 0.1, 0.5, 1, 2, and 2.5 mg/l was assessed using an assay that measured the lactate dehydrogenase (LDH) enzyme secreted from the cells, an elevated level of which indicates cell damage. The results are shown in [Figure 2](#), where C is the integrity of the BME-UV1 cell membrane and D is the integrity of HMEC cell membrane. In relation to the influence of nanoparticles on BME-UV1 cells, CuNPs and its complexes reduced LDH secretions at all concentration. A similar effect was observed for FeNPs and PtFeNPs. However, increased perforation of cell membranes occurred at a concentration of 0.1 mg/L with AgPtNP, AgAuNP, AgFeNP, and AuFeNP complexes. In contrast, in the case of the HMEC cell line, CuNPs and its complexes as well as FeNPs decreased LDH secretions. The higher concentrations tested (2 and 2.5 mg/l) for single AgNPs as well as for AgCuNP, AgAuNP, and AgFeNP complexes also resulted in a decrease in spontaneous LDH secretions. Increased perforation of cell membranes for this line was observed for concentrations of 0.1–0.5 mg/l for AgNPs, and 0.1mg/l for AuFeNPs complex.

Morphology Analysis of the BME-UV1 and HMEC Cells After Nanoparticle Treatment

The morphology of the BME-UV1 cells was evaluated after treating the cells with nanoparticles at a concentration of 2.5 mg/l. Images were taken at 200x magnification. The images are shown in [Supplementary Figure S2](#). The morphology of the cells after treatment with nanoparticles did not change; however, an increase in the number of rounded cells was observed for the cells that were treated with AgNPs or its complexes, indicating potential toxicity. HMEC cells were also treated with nanoparticles at a concentration of 2.5 mg/L, and their morphology was evaluated by taking images at 200x magnification. The morphology of the cells did not change after treatment with nanoparticles, as shown in [Supplementary Figures S2 and S3](#).

Identification of Selected Pathogens

The identification of cultured pathogens was carried out using a MALDI-TOF instrument (Bruker, Poznan, Poland), which compares the molecular weight of biomolecules in the sample to a database, allowing the species or type of microorganism present in the sample to be determined. The results of the identification process are presented in [Supplementary Table S1](#).

Viability Analysis of the Microorganisms Isolated from Mastitic Milk Treated with Au, Ag, Pt, Cu, and Fe Nanoparticles

Among the tested nanoparticles, AgNPs exhibited the strongest antibacterial properties as shown in [Table 2](#). *S. uberis* were the most susceptible bacteria to its effect: for concentrations above 6.25 mg/l the survival rate was 0%. The same results were obtained using a concentration of 25 mg/l against *S. marcescens* and *C. koseri*. Though *S. sciuri* were the most resistant bacteria to the influence of nano-silver, even for the lowest concentration (1.56 mg/l) of applied nanoparticles the survival rate decreased to 16%. Slightly weaker results were observed for CuNPs, with *S. sciuri* being most susceptible to their effects. Gold nanoparticles were less effective than AgNPs and CuNPs. The greatest resistance to AuNPs' action was shown by *S. sciuri*, where, for the highest concentration, the survival rate was still 66%. *E. coli* was also resistant to AuNP concentrations of 1.56–12.5 mg/l, having no effect or slightly reducing survival by a maximum of 3%; while at the highest concentration of 25 mg/l, survival dropped by as much as 83%. The most sensitive bacteria to nano-gold were *S. aureus*, where even the lowest concentration (1.56 mg/l) reduced their survival rate by 74%. *S. uberis*, on the other hand, exhibited resistance to AuNP concentrations of 1.56–3.125 mg/l, but for higher concentrations than 6.25 mg/l, the survival rate was 0%. PtNPs and FeNPs showed no or minor antibacterial properties (the maximum reduction in survival rate was 9%) even for the highest concentrations; therefore, they were excluded from the next part of the experiment, in which nanoparticle complexes were used.

In the case of mastitic fungi, PtNPs mainly showed no or minor biocidal properties; however, for a concentration of 10 mg/l the survival rate of *C. glabrata* decreased by 61%. *C. albicans* were most susceptible to FeNPs at a concentration of 25 mg/l, reducing their survival rate by 75%. For the remaining concentrations' effectiveness on the isolated fungi and algae, no reduction in survival greater than 8% was observed after the application of FeNPs and PtNPs. Poor bioactive

Table 2 Viability Analysis of the Bacteria, Fungi, and Algae Isolated from Mastitic Milk Treated with Au, Ag, Pt, Cu, and Fe Nanoparticles

Nanoparticles (mg/l)	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Prototheca sp.</i>
Control group	100±12.5	100±2.44	100±4.33	100±3.7	100±1.04	100±11.8	100±6.01	100±9.26	100±0.5	100±1.4
Au1.56	97.8±3.08	99.8±3.04	103.3±23.2	93±5.8	84.4±3.80	26.8±1.80*	98.39±3.70	62.66±1.75*	99.65±0.34	87±6.2
Au3.125	93.1±6.98	105.4±3.23	103.0±1.38	81±1.56	98.0±3.18	23.9±0.93*	106.86±0.88	66.63±1.75*	96.30±0.84	82.2±3.6*
Au6.25	0*	94.7±1.77	94.0±12.1	65±3.4*	89.6±2.37	19.6±1.53*	107.82±0.72	69.09±1.80*	97.01±2.8	69±5.2*
Au12.5	0*	88.4±1.74	97.1±1.54	13.7±4.0*	74.9±4.17*	16.6±0.72*	110.64±6.74	67.55±1.46*	83.04±0.71*	56.1±1.7*
Au25	0*	66.5±10.4*	17.1±6.46*	3.8±0.2*	38.9±2.6*	17.0±0.90*	85.37±13.8*	68.26±1.41*	37.62±0.8*	51.62±4.8*
Ag1.56	13.3±5.78*	16.2±1.23*	9.61.01*	8.4±0.25*	6.3±0.96*	26.0±0.62*	96.71±3.62	42.69±3.54*	79.37±0.27*	21.14±0.3*
Ag3.125	3.3±2.30*	15.3±1.37*	5.2±1.29*	5.4±1.87*	5.7±0.22*	21.7±0.37*	71.14±9.3*	28.80±3.61*	39.60±0.85*	13.16±0.15*
Ag6.25	0	16.2±1.68*	4.9±1.76*	3.7±1.2*	5.7±0.42*	17.1±0.71*	5.96±0.87*	16.28±1.63*	35.83±0.53*	8.46±0.4*
Ag12.5	0	16.8±2.57*	4.8±2.05*	2.7±0.2*	4.6±1.05*	14.6±0.71*	4.24±0.12*	10.72±0.43*	11.61±4.04*	5.21±0.13*
Ag25	0	18.4±0.91*	3.4±1.68*	0*	3.3±2.26*	2.1±0.82*	4.96±0.03*	5.19±0.26*	12.96±0.24*	0*
Pt0.625	116.5±11.4	91.1±3.98	100.2±4.52	102±2.3	98.9±5.27	96.1±7.81	106.72±2.13	103.13±2.12	94.66±0.53	96.4±1.2
Pt1.25	114.2±15.9	99.3±7.39*	102.4±2.63	109±4.5	100.2±9.00	97.3±2.57	101.06±3.26	98.87±5.66	92.07±0.56	94.8±0.6
Pt2.5	117.9±5.89	93.5±1.86	105.8±4.42	99±2.1	95.0±1.94	96.4±21.9	105.91±3.79	95.46±2.18	89.11±4.17	94.7±4.1
Pt5	100.6±14.0	96.9±2.14	101.0±44.2	99±3.9	94.1±6.70	96.0±23.1	110±2.67	101.55±8.68	89.77±5.4	98.4±0.8
Pt10	124.8±29.2	96.8±3.16	105.0±0.35	95±2.3	91.5±5.31	94.2±34.5	111.10±2.67	100.80±10.62	69.17±2.63*	98.2±1.87
Cu1.56	67.0±24.1*	28.8±2.09*	87.9±2.48	98.4±4.8	70.7±2.85*	27.4±14.1*	112.39±1.98	71.58±0.53*	66.46±1.02*	77.18±0.19*
Cu3.125	17.2±1.91*	11.2±1.57*	37.5±1.37*	95.4±3.7	51.7±8.31*	27.7±15.6*	109.58±0.40	68.17±0.76*	31.57±0.74*	76.12±1.8*
Cu6.25	2.5±4.03*	5.6±0.73*	4.4±0.79*	35±3.4*	5.3±1.58*	14.8±0.68*	52.23±8.26*	61.71±6.11*	10.02±0.13*	77.34±0.5*
Cu12.5	7.9±0.62*	4.2±0.27*	2.5±0.56*	4.5±0.41*	4.5±1.07*	15.8±0.42*	2.73±0.36*	54.08±3.42*	6.85±0.06*	53.64±0.12*
Cu25	7.9±0.87*	4.9±0.17*	1.8±0.30*	3.0±0.28*	4.7±1.06*	14.0±0.64*	1.45±0.09*	12.44±0.17*	4.88±0.19*	12±0.01*
Fe1.56	111.9±8.4	109.3±3.41	108.7±0.82	104±9.08	95.8±1.93	102.0±2.4	97.08±4.33	100±7.14	100.49±1.53	101.6±1.5
Fe3.125	128.2±9.2*	108.0±8.92	112.7±8.2	106±2.6	99.4±4.16	101.3±15.9	111.83±2.02	101.56±10.49	103.22±0.41	99.6±0.4
Fe6.25	138.2±7.2*	116.7±5.5	106.4±2.22	122±4.6*	97.7±2.83	98.7±17.5	101.19±3.83	99.71±3.68	102.31±0.63	100.7±0.9
Fe12.5	141.4±7.7*	117.7±1.38	107.9±7.8	136±3.4*	98.2±2.26	96.0±20.2	94.35±8.30	72.72±17.82*	101.62±1.23	103.2±0.6
Fe25	143.6±6.1*	115.9±4.02	106.1±2.63	132±5.6*	98.3±4.91	99.6±28.5	104.63±5.04	63.97±1.35*	102.04±0.28	104.3±2.4
p-value	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

Notes: * Significant differences in comparison to control (p≤0.05); average values ± SD from four repetitions.

properties were also shown by AuNPs. The most resistant fungi to its effects were *C. albicans*, where a reduction in survival was observed for concentrations of 1.56 and 25 mg/l. *C. parapsilosis* were the most sensitive fungi to nano-gold, while the 25 mg/l concentration reduced the survival of *C. glabrata* by up to 62%, which was the greatest decrease in viability observed after the application of this nanoparticle. Slightly higher antifungal properties were exhibited by CuNPs, especially against *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *Prototheca* sp., in which their viability decreased by 23–34% after applying the lowest concentration (1.56 mg/l), while for the highest concentration (25 mg/l), a decrease in survival to 2.5–12% was observed. The strongest antifungal properties were exhibited by AgNPs, and the most sensitive fungus to these nanoparticles were *Prototheca* sp., where a concentration of 1.55 mg/l decreased survival rate to 21%, while, when the highest tested concentration of 25 mg/l was applied, survival fell to 0%. The most resistant fungus to AgNPs were *C. albicans*; however, the biocidal properties of the nanoparticles were only observed for concentrations higher than 6.25 mg/l, decreasing viability by 95%.

Viability Analysis of Microorganisms Isolated from Mastitic Milk Treated with Au, Ag, and Cu Nanoparticle Complexes

Among the tested nanoparticle complexes presented in Table 3, CuAuNPs showed the lowest biocidal properties. *E. coli*, *S. marcescens*, and *C. koseri* were the most resistant bacteria to the effect of this complex, where the tested concentrations showed biocidal activity above 6.25 mg/l. Concentrations of 0.78–3.125 mg/l for these pathogens showed no or minor antibacterial properties, and the maximum decrease in survival rate reached 12% for *S. marcescens*. The most sensitive bacteria to CuAuNPs were *S. sciuri* and *S. aureus*, in which survival rates at the highest concentration were reduced to 1.5–1.8%. Slightly superior antibacterial properties were characterized by the AgAuNP complex, which fully destroyed the bacterial cells of *S. uberis* at concentrations 6.25–12.5 mg/l. Also susceptible to this complex were *E. coli*, which, for the highest concentration of nanoparticles, had a survival rate of 1%, and also *S. aureus*, with a survival rate of 1.7%. However, the most resistant bacteria were *C. koseri*, for which the survival rate decreased by only 6% for the lowest concentration (0.78 mg/l), while for 12.5 mg/l it reached 7.6%, which is comparable to the other results. The strongest biocidal properties were demonstrated by the AgCuNP complex, which at the lowest concentration of 0.78 mg/l reduced the survival rate of pathogens such as *S. uberis*, *S. sciuri*, *E. coli*, and *S. aureus* by 95–97%. *S. uberis*, for concentrations of 6.25–12.5 mg/l for this complex showed 0% survival, as did *S. marcescens* for concentrations of 12.5 mg/l. *C. koseri* proved to be the most resistant bacteria for the lowest concentration (0.78 mg/l), however, the survival rate nevertheless decreased by about 60% after using this concentration.

The results of the viability analysis of fungi and algae treated with nanoparticle complexes were similar to the results obtained from the nanoparticle complexes used against mastitic bacteria. The weakest antifungal activity was exhibited by the CuAuNP complex. The most resistant fungi were *C. parapsilosis*, where the application of the highest concentration (12.5 mg/l) reduced survival by 13%. Although *C. albicans* were resistant to this complex, applying the highest concentration led to a decrease in survival rate to 2.58%. *C. glabrata* were the most sensitive of the fungi to CuAuNPs, where the lowest concentration reduced their survival rate by 50%, while the highest concentration caused an 80% reduction. The fungi that was most sensitive to the AgAuNP and AgCuNP complexes were *Prototheca* sp., where the highest concentration of 12.5 mg/l resulted in overall cell death. For the other pathogens, as the concentration of the AgAuNPs increased, it exhibited stronger antifungal properties. Of these pathogens, *C. parapsilosis* showed the greatest resistance to this most active complex, but nevertheless, showed a 95% decrease in viability at the highest concentration.

Determination of Reactive Oxygen Species (ROS)

Figure 3 shows the level of reactive oxygen species (ROS) after the application of AgCuNP, AgAuNP, and CuAuNP complexes. The highest number of reactive oxygen species analyzed across all tested bacteria and the yeast *C. albicans*, was observed after adding the AgCuNP complex to the culture medium. It was this complex that showed the strongest biocidal properties in reducing the survival rate of the tested pathogens. In the case of other tested microorganisms, such as *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, and *Prototheca* sp., the greatest increase in the amount of ROS was observed after the application of the AgAuNP complex.

Table 3 Viability Analysis of the Bacteria, Fungi, and Algae Isolated from Mastitic Milk Treated with Au, Ag, and Cu Nanoparticle Complexes

Nanoparticles (mg/l)	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Prototheca</i> sp.
Control group	100±3.1	100±8.04	100±4.54	100±2.44	100±1.69	100±3.7	100±8.45	100±1.12	100±0.61	100±2.6
AgAu0.78	4.6±0.07*	5.9±0.35*	3.4±0.06*	21.2±3.68*	94.3±3.51	3.5±0.13*	118.18±6.32	85.44±2.46*	64.78±2.32*	52.36±2.8*
AgAu1.56	4.8±0.18*	6.4±0.37*	2.6±0.19*	3.3±0.21*	6.9±1.16*	3.6±0.13*	70.04±0.75*	71.73±2.73*	55.47±0.54*	17.84±0.12*
AgAu3.125	2.1±0.21*	6.4±0.27*	2.6±0.17*	2.8±0.21*	5.4±0.51*	3.6±0.13*	7.42±0.75*	59.39±2.59*	49.44±0.23*	7.2±0.24*
AgAu6.25	0*	6.3±0.30*	2.9±0.13*	2.8±0.18*	5.0±0.39*	3.2±0.17*	4.81±0.13*	40.54±4.89*	37.26±0.37*	2.4±0.11*
AgAu12.5	0*	7.0±0.28*	1.1±0.46*	4.2±0.56*	7.6±0.67*	1.7±0.10*	4.76±0.05*	7.91±0.65*	25.39±1.39*	0*
AgCu0.78	5.3±1.20*	5.0±0.46*	3.2±0.45*	22.3±4.80*	41.1±6.61*	3.6±0.31*	42.59±10.17*	88.90±1.61	38.71±0.33*	18.27±0.62*
AgCu1.56	4.7±0.67*	4.0±0.16*	2.8±0.41*	4.7±3.43*	4.9±0.85*	3.4±0.32*	3.88±0.18*	82.57±1.26*	31.52±0.62*	5.28±0.14*
AgCu3.125	4.1±0.36*	3.2±0.62*	2.3±0.29*	2.5±0.66*	4.0±0.85*	2.9±0.19*	3.07±0.21*	45.91±2.67*	27.16±0.50*	3.84±0.17*
AgCu6.25	0*	2.1±0.05*	1.9±0.06*	1.8±0.16*	2.7±0.32*	2.2±0.19*	2.72±0.12*	5.50±0.35*	24.95±0.22*	1.23±0.02*
AgCu12.5	0*	1.7±0.06*	2.0±0.03*	0*	2.6±0.10*	2.1±0.14*	1.78±0.09*	4.50±0.06*	20.06±0.12*	0*
CuAu0.78	103.2±3.64	60.9±13.0*	101.2±3.42	106.8±8.78	103.1±6.93	65.9±9.66*	115.01±5.84	99.48±1.38	47.42±0.68*	70.2±1.5*
CuAu1.56	70.7±3.14*	13.8±2.31*	98.3±3.61	86.8±12.7	100.9±2.50	26.5±10.6*	117.60±3.83	97.75±16.08	40.79±0.15*	64.87±0.9*
CuAu3.125	6.5±2.75*	4.1±0.90*	97.5±2.78	88.1±3.08	97.6±4.27	2.7±0.22*	115.51±4.26	94.31±0.77	34.87±0.09*	52.6±0.9*
CuAu6.25	3.0±0.34*	1.7±0.30*	27.0±3.09*	55.9±1.70*	11.1±1.14*	2.2±0.29*	68.23±8.78*	89.62±0.84	28.65±0.17*	28.6±0.7*
CuAu12.5	2.5±0.21*	1.5±0.28*	3.8±0.06*	1.7±0.39*	3.0±0.65*	1.8±0.19*	12.58±0.06*	86.92±2.65*	19.18±0.14*	9.2±0.14*
p-value	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

Notes: *Significant differences in comparison to control (p ≤ 0.05); average values ± SD from four repetitions.

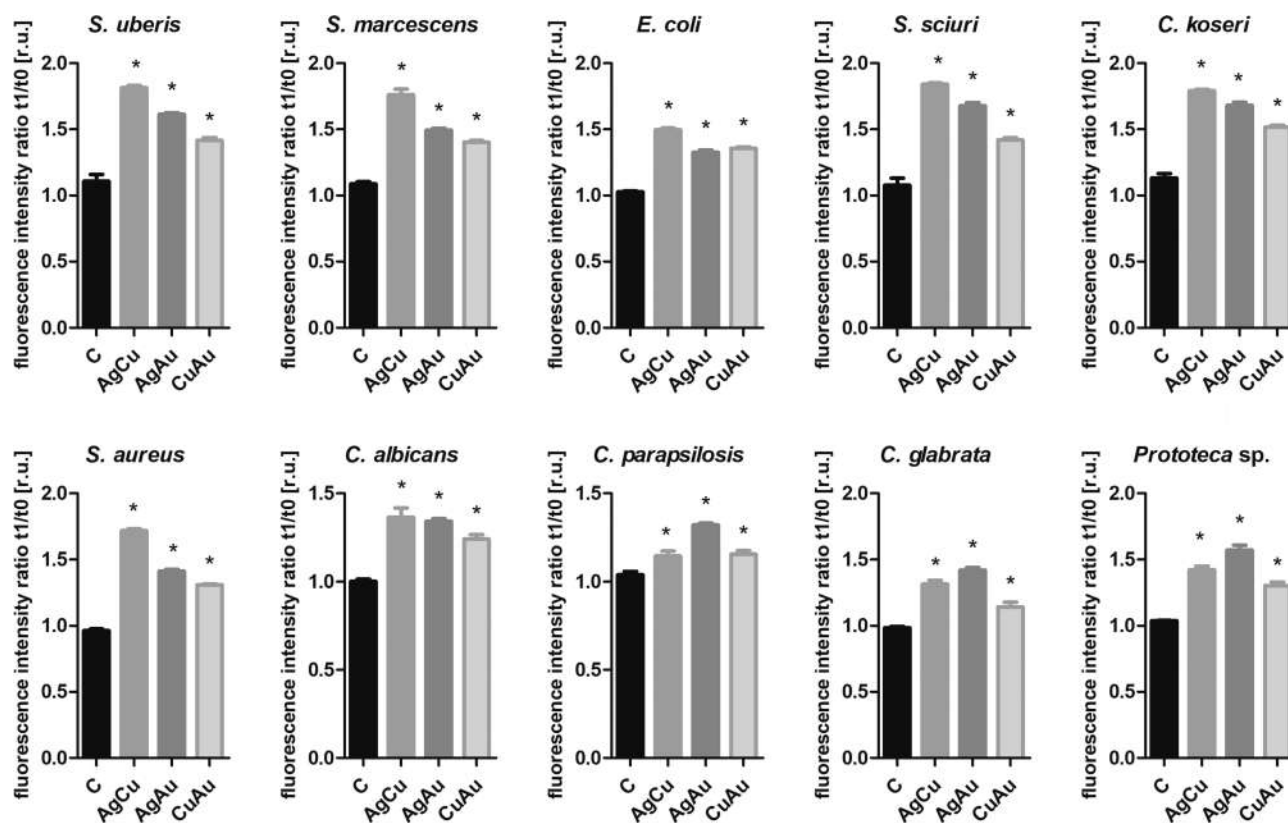


Figure 3 The level of reactive oxygen species after incubation of the tested microorganisms with AgCuNP, AgAuNP and CuAuNP complexes. Statistically significant differences are marked with an asterisk (p -value >0.05).

Assessment of Microbial Invasion After Treatment with AgNPs, AuNPs, CuNPs, and Their Complexes

The invasion of *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, and *Prototheca* sp. was assessed with an alginate bead model in which the beads were bioprinted. Determination of invasion of microorganism from the alginate gel bead after treatment with AgNPs, AuNPs, CuNPs, and their complexes was assessed using turbidity analysis and confocal microscopy assessment of the biofilm produced. Turbidity analysis, which also shows alginate beads, demonstrated that, in the case of *E. coli* and *S. aureus*, invasion was inhibited by AgNPs and AgNP complexes (AgCuNPs, AgAuNPs) (Figure 4A). Biofilm analysis, which was carried out using a confocal microscope after the staining of live and dead cells, confirmed the effectiveness of the AgNPs and AgNP complexes in inhibiting invasion in the case of *E. coli* and *S. aureus* (Figure 4B). In addition, in the case of *E. coli*, an increase in the number of dead cells was observed after the use of CuNPs, AuNPs, and the CuAu complex. Concerning *S. aureus*, the same nanoparticles led to a reduction in the number of cells in the biofilm that had been formed. Treating *C. albicans* with nanoparticles significantly increased the resulting number of dead cells, which was particularly apparent in the cases of CuNPs and AuNPs, and their complexes. Furthermore, AgNPs and AgNP complexes, as well as the CuAu complex, increased the number of dead *Prototheca* sp. cells in the biofilm.

Discussion

In studies evaluating the biocidal effectiveness of nanoparticles against pathogens, in the context of their potential use in practical applications, it is essential to determine not only their effect on pathogen survival but also to assess the survival of cells—in this case, bovine BME-UV1 cells and human mammary epithelial cells (HMEC). This is a crucial issue, as highly toxic nanoparticles in high concentrations could lead to cell death, damaging animals' and humans' health. For this reason, this study was conducted to determine the effects of Ag, Au, Cu, Fe, and Pt NPs, and their complexes, against cells that would be exposed to nanoparticles in practical use. The study showed that, indeed, certain nanoparticles exhibit

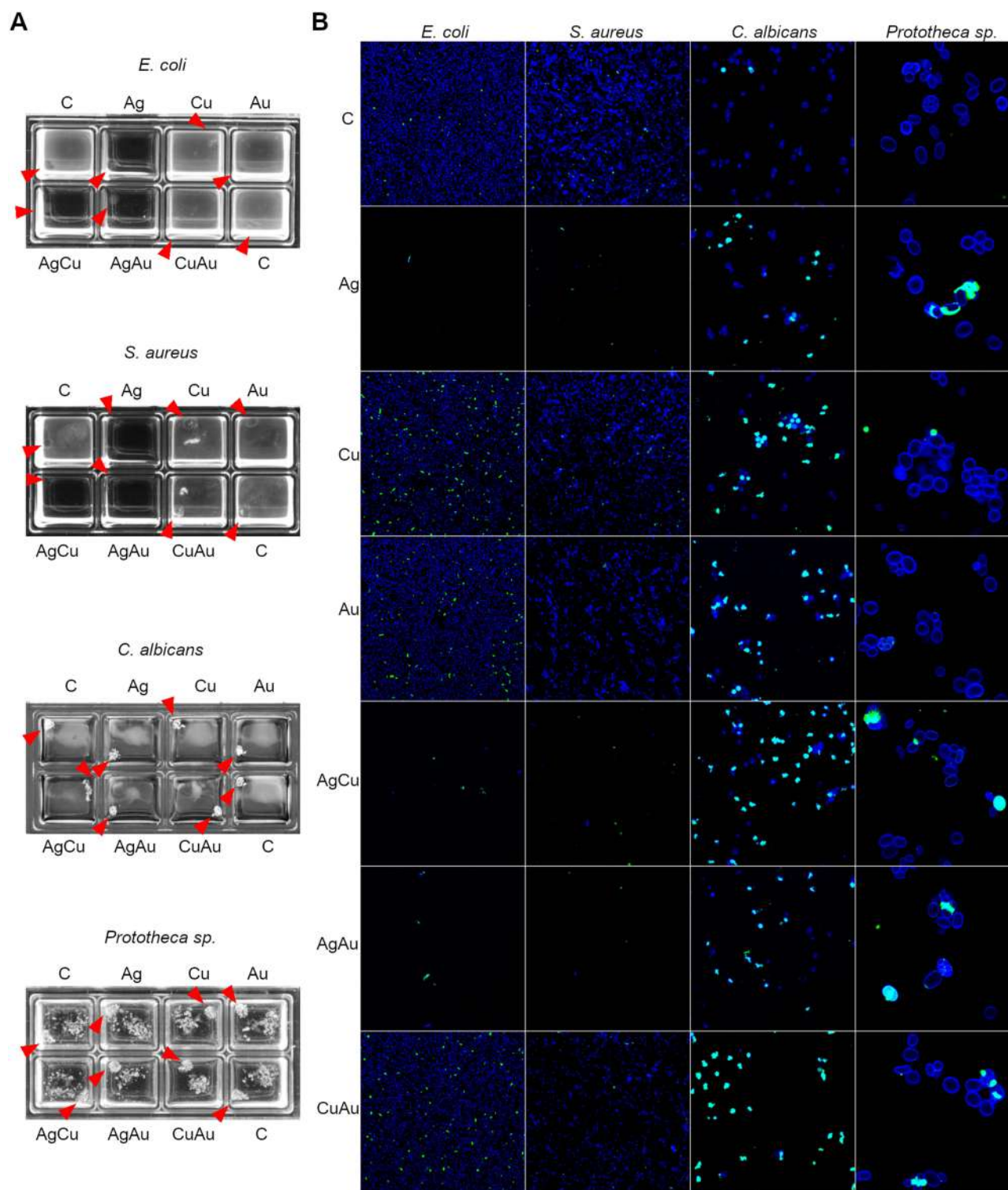


Figure 4 The assessment of microbial invasion with alginate bead (bioprinted) model. Microorganisms in alginate were bioprinted on 8-well culture plates and treated with nanoparticles at a concentration of 2.5 mg/l; Ag - silver nanoparticles, Cu - copper nanoparticles, Au - gold nanoparticles and its complexes (AgCu, AgAu, CuAu). Untreated beads were considered to be controls - C. **(A)** The assessment of culture-medium turbidity after treating beads containing microorganisms with nanoparticles. Red arrowheads indicate alginate beads. **(B)** Merged confocal microscope images of stained microorganisms in a biofilm formed on a culture dish (marked in blue) and dead cells (marked in green).

toxicity against BME-UV1 bovine cells, especially CuNPs in concentrations above 0.1 mg/l. All tested complexes containing copper nanoparticles acted similarly. AgPtNP and AgFeNP complexes were also toxic, however only at the highest concentration—2.5mg/l. Cu nanoparticles also showed toxicity to human HMEC cells, at the same concentration observed for BME-UV1 bovine cells. The available literature is limited with respect to such studies; while there are reports presented by Ahmed et al,³² stating that AuNPs show toxicity to a variety of tissues from mammalian cells, this result was not actually confirmed by the authors' performed analyses. The toxicity of gold nanoparticles against human cells was also tested by Connor et al.³³ The results obtained by these authors showed a lack of cytotoxicity against the cells, which is consistent with the results obtained in the current experiment.

The cell-membrane integrity assay determines the level of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH), which increases with cell damage. In the case of the BME-UV1 cells, CuNPs and all of the Cu complexes decreased LDH secretions; however, elevated levels of this enzyme were observed for AgPtNPs, AgAuNPs, AgFeNPs, and AuFeNPs. In a study by Kalinska et al, elevated levels of LDH were observed after treatment with AgNPs and AgCuNPs,²⁸ which is partially consistent with the results obtained here. In the current study, analysis conducted on the HMEC cell line showed that increased cell perforation occurred after the application of low concentrations of AgNPs and AuFeNPs. The results obtained by Kalinska et al only confirmed increased leakage for 0.5mg/l AgNPs.²⁸ In recent years, due to the growing problem of antibiotic resistance, there has been a growing interest in new antibacterial agents based on metal nanoparticles and metal ions. The literature also shows studies on the antibacterial effect of some new metal chelates containing Cu(II), VO(II), Pd(II), Fe(III), Zn(II), and Mn(II) ions. Zones of growth inhibition were observed after administration of the complexes in various microorganisms, both gram-positive and gram-negative bacteria such as *E. coli*, *B. subtilis*, *S. marcescens*, *M. luteus*.^{34,35}

The survival of mastitic pathogens was studied by Wernicki et al.³⁶ Among the pathogens isolated by these authors were *E. coli*, *S. aureus*, *S. uberis*, *C. albicans*, and *C. crusei*. In their research, the authors tested the biocidal properties of Au, Ag, Pt and Cu NPs. Their study showed that the applied nanoparticles' strongest biocidal properties were exhibited by AgNPs and CuNPs against all pathogens, which is consistent with the results obtained in the current experiment. In these authors' study, AgNPs at a concentration of 12.5 mg/l inhibited the growth of all pathogens, while concentrations above 6.25 mg/l inhibited the growth of *S. aureus* and *S. uberis*. In contrast, in the current study, a concentration of 12.5 mg/l resulted in the survival rate of *S. aureus* being reduced by 86%. In the case of *S. uberis*, its survival rate was reduced to 0 even at the lower concentration of 6.25 mg/l, in comparison to *S. aureus*, in the studies by Wernicki et al.³⁶ *E. coli* viability decreased to 5% for a concentration of 12.5 mg/l AgNPs. The study by Wernicki et al showed that 25 mg/l CuNPs fully inhibited the growth of all pathogens. Results obtained by the authors of the current study showed that these nanoparticles, at the same concentration of 25 mg/l, reduced the survival of pathogens by 86–98%. According to these authors, AuNPs showed weaker antimicrobial activity in comparison to AgNPs and CuNPs, which is consistent with the current study's obtained results. PtNPs showed the weakest biocidal properties in the study by Wernicki et al,³⁶ while the current study's results showed that PtNPs not only showed poor biocidal properties, only causing a decrease in pathogen viability at the highest tested concentration (10 mg/l), but also, in some cases, showed no biocidal properties at all. A study by Dehkordi et al³⁷ showed that 10 µg/mL AgNPs inhibited the growth of *S. aureus* by 90%. A study carried out by Abdel-Rahman et al³⁸ also indicated the antibacterial properties of AgNPs against *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. marcescens*, *E. coli*; however, used NPs were synthesized with biogenic method using extract of *Moringa Oleifera*.

In the current study, a concentration of 12 mg/l of AgNPs was tested on *S. aureus*: the survival rate was reduced by 86%; thus the values are similar to those obtained by Dehkordi et al.³⁷ Tests on AgNPs suspended in gel conducted by Jain et al³⁹ also showed biocidal properties against *E. coli*, *S. aureus*, and also *C. albicans* at 12.5 µg/mL. The authors reported that gram-negative bacteria were more susceptible to the NPs' effects than gram-positive bacteria. Nanoparticles exhibit antifungal activity against *C. glabrata* and *C. parapsilosis* as proven by Mekky et al.⁴⁰ Mastitis caused by *Prototheca* sp. is a particular problem in dairy herds due to its high resistance to all disinfectants. A study conducted by Ely et al⁴¹ suggested that AgNPs may provide a solution in the control of this algae, and this was in accordance with the results obtained in the current study, since the survival rate of *Prototheca* sp. for these nanoparticles at a concentration of 25 mg/l, decreased to 0, which demonstrates their strong biocidal properties. Similar results were observed for NP complexes of AgCu and AgAu. Nanoparticles have the ability to interact synergistically, allowing their complexes to

exhibit stronger biocidal properties at lower concentrations than the higher concentrations of single nanoparticles.²⁸ This theory was confirmed in the studies by Kot et al,⁴² as well as those performed by Lange et al,²⁷ and is also consistent with the results obtained in the current study. One of the main purposes of the conducted research, was to determine the biocidal properties of nanoparticles against mastitic pathogens. However, the literature also indicates that there are other nanostructures such as metal ions that exhibit antimicrobial, antifungal and anticancer properties, which may also provide a new solution for combating pathogens.^{43,44}

Conclusion

There is a growing number of research reports exploring alternative substances for the prevention and treatment of bovine udder inflammation caused by bacteria, fungi and even algae, or a combination of these etiological factors, which may find application in dairy cattle. One of the most promising approaches is to target research toward nanotechnology due to their biocidal properties. In vitro experiments have shown that silver, copper, and gold nanoparticles, and their complexes, exhibit no toxicity to bovine or human cells while showing the greatest biocidal potential against pathogens causing *mastitis* in cattle. AgCuNP concentrations of 6.25 and 12.5 mg/l have been shown to inhibit the proliferation of *mastitis* pathogens such as *S. uberis*, *E. coli*, *C. albicans*, and *Prototheca* sp. by up to 100%. *Candida* sp. and *Prototheca* sp. are pathogens that are difficult or impossible to control with antibiotics in herds. *Mastitis* induced by *Prototheca* sp. currently has no developed treatment; therefore, the obtained results have the potential for global innovation; however, it is necessary to test the biocidal properties of nanoparticles under field conditions. A bacterial cell inhibition of 98% was observed for *S. aureus*, an infectious indicator pathogen of *mastitis*. Additionally, this indicates the high potential of these solutions under field conditions, as this bacterium is one of the most difficult to treat, especially in dairy cows, due to its resistance to the most common antibiotics. The biocidal properties of selected nanomaterials have proven to be active agents for *mastitis* prevention but are harmless to bovine and human cells. The results suggest that they could be used in practical applications by breeders worldwide; however, it is necessary to test the biocidal properties of nanoparticles in vivo.

Data Sharing Statement

Data are available upon request from the authors.

Funding

Financial support for this study was obtained from project nr. POIR.01.01.01-00-2127/20-00, entitled “NanoCow—Development and Implementation of a Line of Products for the Prevention of Mastitis and Lameness Against Bacterial and Fungal Infections with the Use of Nanomaterials” provided by the National Centre for Research and Development. The publication was cofinanced by Science development fund of the Warsaw University of Life Sciences - SGGW.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Fogsgaard KK, Røntved CM, Sørensen P, Herskin MS. Sickness behavior in dairy cows during *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Sci.* 2012;95:630–638. doi:10.3168/jds.2011-4350
2. Cheng WN, Han SG. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments—A review. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2020;33:1699–1713. doi:10.5713/ajas.20.0156
3. Ranjan R, Swarup D, Patra RC, Nandi D. Bovine protothecal mastitis: a review. *CAB Rev.* 2015;1. doi:10.1079/PAVSNNR20061017
4. Adeyemi OS, Sulaiman FA. Evaluation of metal nanoparticles for drug delivery systems. *J Biomed Res.* 2015;29:145–149. doi:10.7555/JBR.28.20130096
5. Rai M, Deshmukh SD, Ingle AP, Gupta IR, Galdiero M, Galdiero S. Metal nanoparticles: the protective nanoshield against virus infection. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42:46–56. doi:10.1128/am.26.4.648-649.1973
6. Cruz-Luna AR, Cruz-Martínez H, Vásquez-López A, Medina DI. Metal nanoparticles as novel antifungal agents for sustainable agriculture: current advances and future directions. *J Fungi.* 2021;7:1033. doi:10.1016/j.molstruc.2021.131017
7. Benelli G. Gold nanoparticles—against parasites and insect vectors. *Acta Trop.* 2018;178:73–80. doi:10.1016/j.actatropica.2017.10.021

8. Rai M, Ingle AP, Birla S Y, Santos CAD. A. Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Crit. Rev Microbiol.* **2016**;42:696–719. doi:10.3109/1040841X.2015.1018131
9. Al-Farraj ES, Alahmadi M, Mohamed WS, Alsaedi WH, Abu-Dief AM. Development of VSe₂@ Cu₂Se nano-composites via facile one-pot hydrothermal method for pharmaceutical applications. *Phys Scr.* **2023**;98:095004. doi:10.1088/1402-4896/aceada
10. Dhanjal DS, Mehra P, Bhardwaj S, et al. Mycology-nanotechnology interface: applications in medicine and cosmetology. *Int J Nanomed.* **2022**;17:2505–2533. doi:10.2147/IJN.S363282
11. Abu-Dief AM, Alrashdeh FM, Emran KM, Al-Abdulkarim HA. Development of some magnetic metal–organic framework nano composites for pharmaceutical applications. *Inorg Chem Commun.* **2022**;138:109251. doi:10.1016/j.inoche.2022.109251
12. Khezerlou A, Alizadeh-Sani M, Azizi-Lalabadi M, Ehsani A. Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses. *Microb Pathog.* **2018**;123:505–526. doi:10.1016/j.micpath.2018.08.008
13. Bashal AH, Khalil KD, Abu-Dief AM, El-Atawy MA. Cobalt oxide-chitosan based nanocomposites: synthesis, characterization and their potential pharmaceutical applications. *Int J Biol Macromol.* **2023**;253:126856. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.126856
14. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine.* **2010**;6:257–262. doi:10.1016/j.nano.2009.07.002
15. Kowshik M, Ashtaputre S, Kharrazi S, et al. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. *Nanotechnology.* **2003**;14:95. doi:10.1088/0957-4484/14/1/321
16. Sastry M, Ahmad A, Khan MI, Kumar R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr Sci.* **2003**;85:162–170.
17. Armendariz V, Herrera I, Peralta-Videa JR, et al. Size controlled gold nanoparticle formation by avena sativa biomass: use of plants in nanobiotechnology. *J Nanopart Res.* **2004**;6:377–382.
18. Ekrikaya S, Yilmaz E, Celik C, et al. Investigation of ellagic acid rich-berry extracts directed silver nanoparticles synthesis and their antimicrobial properties with potential mechanisms towards enterococcus faecalis and candida albicans. *J Biotechnol.* **2021**;341:155–162. doi:10.1016/j.jbiotec.2021.09.020
19. Abu-Dief AM, Abdel-Rahman LH, Abd-El Sayed MA, Zikry MM, Nafady A. Green synthesis of AgNPs⁰ utilizing Delonix regia extract as anticancer and antimicrobial agents. *ChemistrySelect.* **2020**;5:13263–13268. doi:10.1002/slct.202003218
20. Koca FD, Demirezen Yilmaz D, Duman F, Ochoy I. Comparison of phytotoxic effects of bio-synthesised copper oxide nanoparticle and ionic copper on elodea canadensis. *Chem Eco.* **2018**;34:839–853. doi:10.1080/02757540.2018.1494162
21. Ceylan R, Demirbas A, Ochoy I, Aktumsek A. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extracts of three sideritis species from Turkey and evaluations bioactivity potentials. *sustain. Chem Pharm.* **2021**;21:100426. doi:10.1016/j.scp.2021.100426
22. Kumar H, Venkatesh N, Bhowmik H, Kuila A. Metallic nanoparticle: a review. *Biomed J Sci Tech Res.* **2018**;4:3765–3775. doi:10.26717/BJSTR.2018.04.001011
23. Ijaz I, Gilani E, Nazir A, Bukhari A. Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. *Green Chem Lett Rev.* **2020**;13:223–245. doi:10.1080/17518253.2020.1802517
24. Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv Colloid Interface Sci.* **2010**;156:1–13. doi:10.1016/j.cis.2010.02.001
25. Tang S, Zheng J. Antibacterial activity of silver nanoparticles: structural effects. *Adv Healthc Mater.* **2018**;7:doi:10.1002/adhm.201701503
26. Radzikowski D, Kalińska A, Ostaszewska U, Gołębiowski M. Alternative solutions to antibiotics in mastitis treatment for dairy cows - a review. *Anim Sci Pap Rep.* **2020**;38:117–133.
27. Lange A, Grzenia A, Wierzbicki M, et al. Silver and copper nanoparticles inhibit biofilm formation by mastitis pathogens. *Animals.* **2021**;11:1884. doi:10.3390/ani11071884
28. Kalińska A, Jaworski S, Wierzbicki M, Gołębiowski M. Silver and copper nanoparticles—an alternative in future mastitis treatment and prevention? *Int J Mol Sci.* **2019**;20:1672. doi:10.3390/ijms20071672
29. Lange A, Sawosz E, Wierzbicki M, et al. Nanocomposites of graphene oxide—silver nanoparticles for enhanced antibacterial activity: mechanism of action and medical textiles coating. *Materials.* **2022**;15(9):3122. doi:10.3390/ma15093122
30. Lange A, Sawosz E, Daniluk K, et al. Bacterial surface disturbances affecting cell function during exposure to three-compound nanocomposites based on graphene materials. *Nanomaterials.* **2022**;12(17):3058. doi:10.3390/nano12173058
31. Pore RS. Selective medium for the isolation of Prototheca. *Appl Microbiol.* **1973**;26(4):648–649. doi:10.1128/am.26.4.648-649.1973
32. Ahamed M, AlSalhi MS, Siddiqui MKJ. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta.* **2010**;411(23–24):1841–1848. doi:10.1016/j.cca.2010.08.016
33. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small.* **2005**;1:325–327. doi:10.1002/smll.200400093
34. Aljohani ET, Shehata R, Abu-Dief AM. Design, synthesis, structural inspection of Pd²⁺, VO₂⁺, Mn²⁺, and Zn²⁺ chelates incorporating ferrocenyl thiophenol ligand: DNA interaction and pharmaceutical studies. *App Organomet Chem.* **2021**;35:e6169. doi:10.1002/aoc.6169
35. Abu-Dief AM, El-khatib RM, El Sayed SM, et al. Tailoring, structural elucidation, DFT calculation, DNA interaction and pharmaceutical applications of some aryl hydrazone Mn (II), Cu (II) and Fe (III) complexes. *J Mol Struct.* **2021**;1244:131017. doi:10.1016/j.molstruc.2021.131017
36. Wernicki A, Puchalski A, Urban-Chmiel R, et al. Antimicrobial properties of gold, silver, copper and platinum nanoparticles against selected microorganisms isolated from cases of mastitis in cattle. *Med Weter.* **2014**;70:564–567.
37. Dehkordi SH, Hosseinpour F, Kahrizangi AE. An in vitro evaluation of antibacterial effect of silver nanoparticles on staphylococcus aureus isolated from bovine subclinical mastitis. *Afr J Biotechnol.* **2011**;10:10795–10797. doi:10.5897/AJB11.1499
38. Abdel-Rahman LH, Al-Farhan BS, Abou El-ezz D, Abd-El Sayed MA, Zikry MM, Abu-Dief AM. Green biogenic synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of moringa oleifera: access to a powerful antimicrobial, anticancer, pesticidal and catalytic agents. *J Inorg Organomet Polym.* **2022**;32:1422–1435. doi:10.1007/s10904-021-02186-9
39. Jain J, Arora S, Rajwade JM, Omray P, Khandelwal S, Paknikar KM. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Mol Pharm.* **2009**;6:1388–1401. doi:10.1021/mp900056g
40. Mekky AE, Farrag AA, Hmed AA, Sofy AR. Antibacterial and antifungal activity of green-synthesized silver nanoparticles using Spinacia oleracea leaves extract. *Egypt J Chem.* **2021**;64:5781–5792. doi:10.21608/EJCHEM.2021.74432.3673

41. Ely VL, Pereira DIB, da Costa MM, et al. Activity of biogenic silver nanoparticles against isolates of prototheca species from bovine mastitis. *Lett Appl Microbiol.* **2022**;75:24–28. doi:10.3168/jds.2011-4350
42. Kot M, Kalińska A, Jaworski S, Wierzbicki M, Smulski S, Gołębiewski M. In vitro studies of nanoparticles as a potentially new antimicrobial agent for the prevention and treatment of lameness and digital dermatitis in cattle. *Int J Mol Sci.* **2023**;24:6146. doi:10.1016/j.micpath.2018.08.008
43. Abu-Dief AM, El-Khatib RM, Aljohani FS, et al. Synthesis and intensive characterization for novel Zn (II), Pd (II), Cr (III) and VO (II)-Schiff base complexes; DNA-interaction, DFT, drug-likeness and molecular docking studies. *J Mol Struct.* **2021**;1242:130693. doi:10.5713/ajas.20.0156
44. Mohamad ADM, Abualreish MJA, Abu-Dief AM. Antimicrobial and anticancer activities of cobalt (III)-hydrazone complexes: solubilities and chemical potentials of transfer in different organic co-solvent-water mixtures. *J Mol Liq.* **2019**;290:111162. doi:10.1002/adhm.201701503

Nanotechnology, Science and Applications

Dovepress

Publish your work in this journal

Nanotechnology, Science and Applications is an international, peer-reviewed, open access journal that focuses on the science of nanotechnology in a wide range of industrial and academic applications. It is characterized by the rapid reporting across all sectors, including engineering, optics, bio-medicine, cosmetics, textiles, resource sustainability and science. Applied research into nano-materials, particles, nano-structures and fabrication, diagnostics and analytics, drug delivery and toxicology constitute the primary direction of the journal. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/nanotechnology-science-and-applications-journal>

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Mgr inż. Magdalena Kot
Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
magdalena_kot@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Mateusz Wierzbicki, Magdalena Kot, Agata Lange, Aleksandra Kalińska, Marcin Gołębiowski, Sławomir Jaworski. Evaluation of the Antimicrobial, Cytotoxic, and Physical Properties of Selected Nano-Complexes in Bovine Udder Inflammatory Pathogen Control. *Nanotechnol Sci Appl.* 2024, 17, 77-94

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zbieraniu, analizie i interpretacji danych, interpretacji wyników, przygotowaniu i krytycznej weryfikacji manuskryptu, prowadzeniu procesu recenzyjnego, korekcji manuskryptu, co wynosi 57 % pracy.

Magdalena Kot
podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Dr hab. Mateusz Wierzbicki, prof. SGGW

Katedra Nanobiotechnologii

Instytut Biologii

mateusz_wierzbicki@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Mateusz Wierzbicki, Magdalena Kot, Agata Lange, Aleksandra Kalińska, Marcin Gołębiewski, Sławomir Jaworski. Evaluation of the Antimicrobial, Cytotoxic, and Physical Properties of Selected Nano-Complexes in Bovine Udder Inflammatory Pathogen Control. *Nanotechnol Sci Appl.* 2024, 17, 77-94

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metodologii doświadczenia oraz prowadzeniu badań i analizie danych, co wynosi 10 % pracy.



podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Dr inż. Agata Lange

Katedra Nanobiotechnologii

Instytut Biologii

agata_lange1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Mateusz Wierzbicki, Magdalena Kot, Agata Lange, Aleksandra Kalińska, Marcin Gołębiewski, Sławomir Jaworski. Evaluation of the Antimicrobial, Cytotoxic, and Physical Properties of Selected Nano-Complexes in Bovine Udder Inflammatory Pathogen Control. *Nanotechnol Sci Appl.* 2024, 17, 77-94

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na prowadzeniu badań, co wynosi 5 % pracy.

Agata Lange

podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Dr inż. Aleksandra Kalińska
Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
aleksandra_kalinska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoly Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Mateusz Wierzbicki, Magdalena Kot, Agata Lange, Aleksandra Kalińska, Marcin Gołębiewski, Sławomir Jaworski. Evaluation of the Antimicrobial, Cytotoxic, and Physical Properties of Selected Nano-Complexes in Bovine Udder Inflammatory Pathogen Control. *Nanotechnol Sci Appl.* 2024, 17, 77-94

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na prowadzeniu nadzoru merytorycznego, co wynosi 3 % pracy.


podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Prof. dr hab. Marcin Gołębiewski
Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
marcin_golebiewski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Mateusz Wierzbicki, Magdalena Kot, Agata Lange, Aleksandra Kalińska, Marcin Gołębiewski, Sławomir Jaworski. Evaluation of the Antimicrobial, Cytotoxic, and Physical Properties of Selected Nano-Complexes in Bovine Udder Inflammatory Pathogen Control. *Nanotechnol Sci Appl.* 2024, 17, 77-94

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na nadzorze prac, opracowaniu koncepcji badań oraz pozyskanie funduszy, co stanowi 5 % pracy.



podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Dr hab. Sławomir Jaworski, prof. SGGW

Katedra Nanobiotechnologii

Instytut Biologii

slawomir_jaworski@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Mateusz Wierzbicki, Magdalena Kot, Agata Lange, Aleksandra Kalińska, Marcin Gołębiewski, Sławomir Jaworski. Evaluation of the Antimicrobial, Cytotoxic, and Physical Properties of Selected Nano-Complexes in Bovine Udder Inflammatory Pathogen Control. *Nanotechnol Sci Appl.* 2024, 17, 77-94

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metodologii doświadczenia oraz prowadzeniu badań i analizie danych, co wynosi 10 % pracy.

podpis

Article

Nanoparticles as New Antifungals in the Prevention of Bovine Mycotic Mastitis Caused by *Candida* spp. and *Diutina* spp.—In Vitro Studies

Magdalena Kot ^{1,*} , Agata Lange ² , Weronika Jabłońska ¹ , Aleksandra Kalińska ¹ , Barbara Nasiłowska ³ ,
Wojciech Skrzeczanowski ³  and Marcin Gołębiowski ¹ 

¹ Animal Breeding Department, Warsaw University of Life Sciences, 02-786 Warsaw, Poland; s207303@sggw.edu.pl (W.J.); aleksandra_kalinska@sggw.edu.pl (A.K.); marcin_golebiowski@sggw.edu.pl (M.G.)

² Department of Nanobiotechnology, Warsaw University of Life Sciences, 02-786 Warsaw, Poland; agata_lange1@sggw.edu.pl

³ Institute of Optoelectronics, Military University of Technology, gen. S. Kaliskiego 2, 00-908 Warsaw, Poland; barbara.nasilowska@wat.edu.pl (B.N.); wojciech.skrzeczanowski@wat.edu.pl (W.S.)

* Correspondence: magdalena_kot@sggw.edu.pl

Abstract: Bacterial infections are the primary cause of *mastitis* in dairy cattle. Fungal *mastitis* occurs in 1–12% of cases. Antibiotic therapy, the standard treatment for *mastitis*, has led to antibiotic-resistant bacteria, reducing treatment efficacy and increasing fungal *mastitis* occurrence. Antibiotics lack biocidal effects on fungi, which often exhibit resistance to anti-fungal agents. This study evaluated the antifungal properties of nanoparticles (NPs) against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Diutina rugosa* var. *rugosa*, *Diutina catenulata*, and *Diutina rugosa*. Tested NPs included gold (AuNPs), silver (AgNPs), copper (CuNPs), iron with hydrophilic carbon coating (FeCNPs) (1.56–25 mg/L), and platinum (PtNPs) (0.625–10 mg/L), along with their complexes. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) at 0.75–25 mg/L for AuNPs, AgNPs, CuNPs, and FeCNPs and 0.313–10 mg/L for PtNPs, as well as fungal sensitivity to standard antifungals, were determined. Each strain showed different sensitivities depending on the NPs used and their concentrations. *C. glabrata* was the most resistant to nanoparticles, while *D. catenulata* was the most susceptible. PtNPs and FeCNPs showed no or weak biocidal properties. Some mycotic-resistant strains were sensitive to nanoparticles. This study indicates a high in vitro antifungal potential for the application of nanoparticles, especially AgCuNPs, as a new effective non-antibiotic agent for the prevention and control of mycotic *mastitis* in dairy cattle.

Keywords: *mastitis*; *Candida* spp.; *Diutina* spp.; nanoparticles; fungi; dairy cattle; mycotics



Academic Editor: Keykavous Parang

Received: 21 March 2025

Revised: 25 April 2025

Accepted: 29 April 2025

Published: 8 May 2025

Citation: Kot, M.; Lange, A.; Jabłońska, W.; Kalińska, A.; Nasiłowska, B.; Skrzeczanowski, W.; Gołębiowski, M. Nanoparticles as New Antifungals in the Prevention of Bovine Mycotic Mastitis Caused by *Candida* spp. and *Diutina* spp.—In Vitro Studies. *Molecules* **2025**, *30*, 2086. <https://doi.org/10.3390/molecules30102086>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Mastitis, also known as udder inflammation, occurs in dairy cattle and is a multi-etiological complex disease, most often associated with an etiological agent such as bacteria. The most common contributors to *mastitis* are bacteria, such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, and *Staphylococcus epidermidis* [1]. Although *mastitis* is most often mentioned in the context of bacterial infections, it is not limited to this etiological agent. It is a fact that bacteria are most often isolated from infected quarters of the udder; however, *mastitis* can also be induced by fungi, but at a much lower frequency. These include species of yeasts and molds. The most

commonly isolated mastitis-inducing yeast is *Candida* spp.: *C. kefir*, *C. rugosa*, *C. krusei* [2], *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, and *C. parapsilosis* [3]. Another decidedly less frequently isolated mastitis-inducing species is *Diutina* spp., e.g., *D. rugosa* [4]. In recent years, the occurrence of protothecal mastitis has also been increasingly reported; this type of mastitis is caused by a pathogenic alga of the genus *Prototheca*, which is particularly resistant to conventional treatment [5]. Mixed-type infections are also common. The fungi that cause mastitis are classified as environmental pathogens. Their occurrence is significantly influenced by the environment. Although fungal mastitis is much less common than bacterial mastitis, leading to its effects being underestimated, it should be noted that it still poses a serious threat to animal health. Fungal species isolated from milk from cows with confirmed mastitis exhibit resistance to antifungal drugs similar to that exhibited by bacterial strains to antibiotics, which means that strains targeted by biocides have varying susceptibility. In addition, in veterinary practice, the identification of the type of fungi is not performed due to their rarer occurrence. At the same time, bacteria are more frequently the main etiological factor in the development of mastitis, leading to the adoption of a treatment strategy using antibiotics, which in turn leads to an increase in the incidence of fungal mastitis [6]. Unfortunately, it is not only that antibiotic treatments might be ineffective due to increasing antibiotic resistance among bacterial strains but also that some antibiotics can act as nutrients for fungal strains. Examples of such types of antibiotics that are in popular use are tetracycline and penicillin—these contain nitrogen, which fungi treat as a source of energy to support their growth [7]. Therefore, antibiotic-based mastitis treatment does not give producers confidence that it will provide a positive biocidal effect against the most common etiological agents, and at the same time, the treatment may intensify the problem of fungal mastitis. It should be remembered that fungal strains, like bacteria, also have characteristic mechanisms for defense, including the ability to form biofilm, which makes them more resistant to unfavorable conditions in the external environment and, therefore, more resistant to applied antifungal agents [8].

The purpose of this study was to determine the basic physicochemical properties of the utilized nanoparticles (AuNPs, AgNPs, CuNPs, FeCNPs—iron NPs coated with carbon—and PtNPs) and nanoparticle complexes that showed the strongest biocidal activity, as well as to determine their antifungal properties against one of the most commonly isolated—*Candida* spp. (*C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis*)—and some of the less commonly isolated species, *D. rugosa* var. *rugosa*, *D. catenulata*, and *D. rugosa*, isolated from the milk of cows diagnosed with subclinical mastitis. In addition, the sensitivity of the isolated microorganisms to available antifungal substances was determined (amphotericin B 20 g/L, econazole 10 g/L, flucytosine 1 g/L, fluconazole 10 g/L, fluconazole 25 g/L, ketoconazole 10 g/L, clotrimazole 10 g/L, and nystatin 100 g/L) using the disc diffusion method. This study also determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of AgNPs, AuNPs, CuNPs, PtNPs, FeCNPs—iron NPs coated with carbon—and their complexes at concentrations of 0.75, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, and 25 mg/L; 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5, and 10 mg/L were used for PtNPs. This research provides insight into and perspective on the potential application of nanoparticles in practice for the prevention of mastitis. This is the first publication in the literature that builds on such a wide variety and comprehensiveness of the conducted analyses, targeting pathogens that have so far been underestimated. The results fill the gaps in previous studies and make an incredibly valuable contribution to the development of research on the control of fungal mastitis in dairy cows using NPs. This is an evaluation of a potential prevention method for herds affected by fungal mastitis based on nanoparticles, while allowing effective prophylaxis in healthy udders; however, in vivo studies are also required.

2. Results

2.1. The Distribution and Occurrence of Isolated Pathogens from Quarter Milk Samples

The preliminary results of tests to identify fungal species for further study are presented in Table 1, which shows the quantitative and qualitative distribution of isolated microorganisms. Out of 67 milk samples, the majority either did not contain microorganisms (32.84%) or had bacterial strains isolated from them (35.82%). In contrast, 20.89% of samples contained fungal strains, which were then subjected to identification.

Table 1. A summary of isolated strains from collected quarter milk samples.

Sample	N	Presence [%]
no growth	22	32.84
contamination	4	5.97
mixed	1	1.49
one strain	0	0
yeasts and fungi	14	20.89
bacteria	24	35.82
algae	2	2.99

2.2. Identification of the Isolated Fungi

In the conducted studies, the following fungi were isolated: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *D. rugosa* var. *rugosa*, *D. catenulata*, and *D. rugosa*. The colonies that were grown were identified using a MALDI-TOF MS apparatus (Bruker, Poznań, Poland). Fungal identification was based on mass spectrometry, and the results are shown in Table 2.

Table 2. Identified fungal strains.

Species	Score	NCBI Number
<i>Candida albicans</i>	2.11	5476
<i>Candida glabrata</i>	2.08	5478
<i>Candida parapsilosis</i>	2.24	5480
<i>Diutina rugosa</i>	2.14	5481
<i>Diutina rugosa</i> var. <i>rugosa</i>	2.22	5481
<i>Diutina catenulata</i>	2.16	45,537

2.3. Nanoparticle Morphology

The morphology of the nanoparticles is presented in Figure 1. The images of the nanoparticles were taken with a transmission electron microscope (TEM) and illustrate the morphology of the metal nanoparticles used in the experiment. All of the tested nanoparticles show a spherical morphology, which follows the morphological standard for nanoparticles, indicating that they have a standardized quality. Only in the case of CuNPs was an atypical appearance observed, which suggests the presence of impurities, probably due to the nanoparticle production process (this is especially evident in the images in Figure 1C,M).

2.4. Physicochemical Properties Analysis of the Nanoparticles: Hydrodynamic Diameter (nm) and Zeta Potential (mV)

Figure 2 shows the basic physicochemical properties of the nanoparticles and their complexes used in this experiment, namely the hydrodynamic diameter, which determines the size of the formed agglomerate. Table 3 presents the detailed numerical values of the physicochemical parameters.

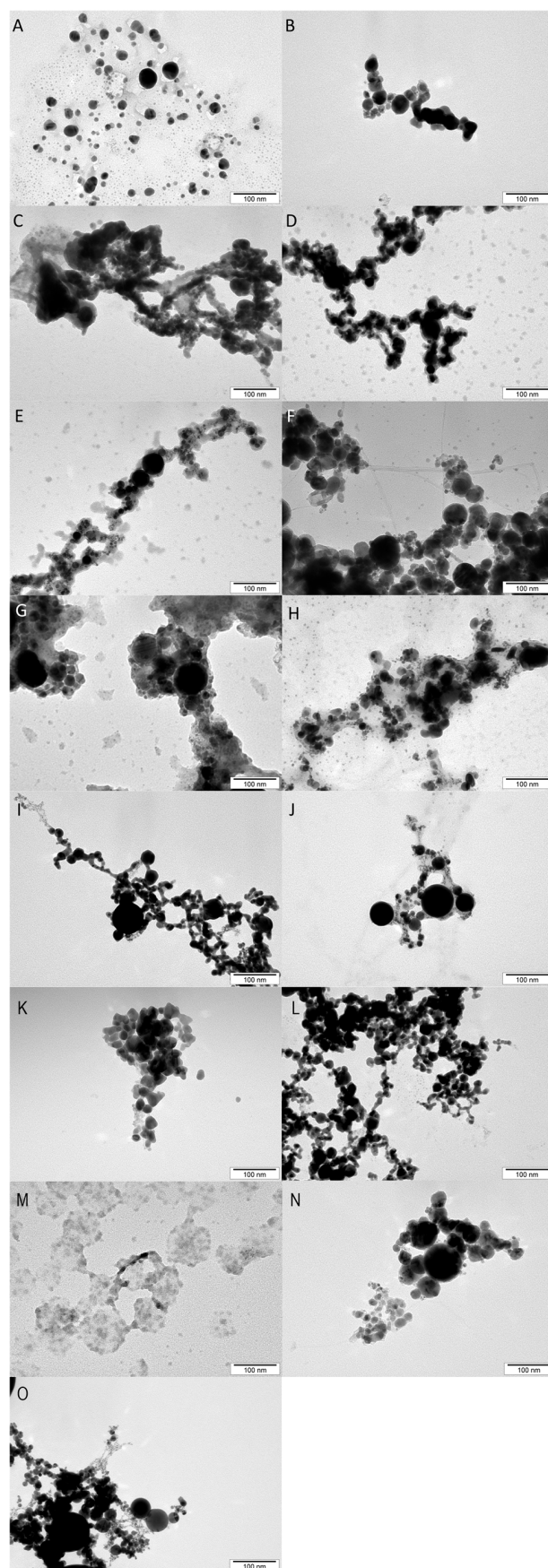


Figure 1. Nanoparticle images taken using a transmission electron microscope (TEM). (A)—AgAu, (B)—AuFeC, (C)—CuAg, (D)—CuAu, (E)—CuPt, (F)—CuFeC, (G)—FeCAg, (H)—PtAg, (I)—PtAu, (J)—PtFeC, (K)—Ag, (L)—Au, (M)—Cu, (N)—FeC (iron NPs coated with carbon), (O)—Pt.

The size distribution of the nanoparticles shown in Figure 2 indicates that three separate size assemblages were present. Two different size assemblages were observed for CuNPs (Figure 2C); the smallest assemblage of nanoparticles measured about 1 nm, while the largest oscillated around 1000 nm. There were also two size assemblages for AuCuNPs (Figure 2H), but here, the smallest assemblage was 7–20 nm and the largest was 40–300 nm, while most nanoparticles were around 100 nm. Double-size assemblages also occurred for the AuPtNP complex, whose lowest values were 40–100 nm and whose highest values were 200–300 nm. Triple-size assemblages occurred for the AgCuNP (Figure 2F) and AuAgNP (Figure 2G) complexes. In the first case, the nanoparticles in the size assemblages were less than 1 nm, less than 10 nm, and about 100 nm, while the AuAgNP complex had values above 10 nm, with the larger assemblages being about 100 nm; this complex also had the largest of all size assemblages, at 4000–6000 nm. In the case of the other nanoparticles and complexes, most values were around 100 nm, but some values reached as high as 500 nm.

The zeta potential of the nanoparticles and their complexes was determined using dynamic laser scattering under electrophoretic conditions, the results of which are shown in Supplementary Figure S1. The zeta potential for some nanoparticles took various values, but all of them were negative. The greatest variation in the measurements of this parameter was observed for the AgCuNP complex (Supplementary Figure S1F), and slightly less for AuCuNPs (Supplementary Figure S1H), AuPtNPs (Supplementary Figure S1J), and FeCCuNPs (Supplementary Figure S1N). Small variations between measurements were observed for the other nanoparticles.

Table 3. Zeta potential measurement values, size distribution, and polydispersity index (Pdl) for the nanoparticles.

Nanoparticles	Average Hydrodynamic Diameter (nm)		Zeta Potential (mV)		Pdl	
	Average	Standard Deviation	Average	Standard Deviation	Average	Standard Deviation
Ag	201.6	4.3	−35.2	1.7	0.4	0.0
Au	295.9	96.2	−14.8	1.2	0.5	0.1
Cu	652.1	174.0	−3.5	0.5	0.4	0.3
Pt	310.2	162.0	−15.3	7.1	0.6	0.2
FeC	746.9	290.0	−27.8	0.9	0.8	0.8
AgAu	308.3	139.2	−30.0	2.5	0.6	0.2
AgCu	378	45.6	−19.7	8.1	0.7	0.0
AgPt	106.1	28.7	−38.1	3.6	0.4	0.1
AgFeC	216.3	3.0	−35.7	1.0	0.3	0.1
AuCu	119.7	7.0	−23.4	1.4	0.3	0.0
AuPt	356.5	43.7	−25.3	3.4	0.7	0.0
AuFeC	165	14.00	−18.0	2.0	0.3	0.0
CuPt	158.8	52.4	−16.8	6.2	0.4	0.1
CuFeC	743.7	373.9	−21	4.5	0.8	0.2
PtFeC	399	136.8	−20.6	0.4	0.5	0.1

The largest hydrodynamic diameters for single nanoparticles were observed for FeC-NPs (iron NPs coated with carbon) (746.9 nm) and CuNPs (652.1 nm), while the complex with the highest average hydrodynamic size was the CuFeCNP complex, reaching 743.7 nm.

The smallest diameter was observed for AgNPs (201.6 nm), while the smallest complex was AgPtNPs, reaching 106.1 nm.

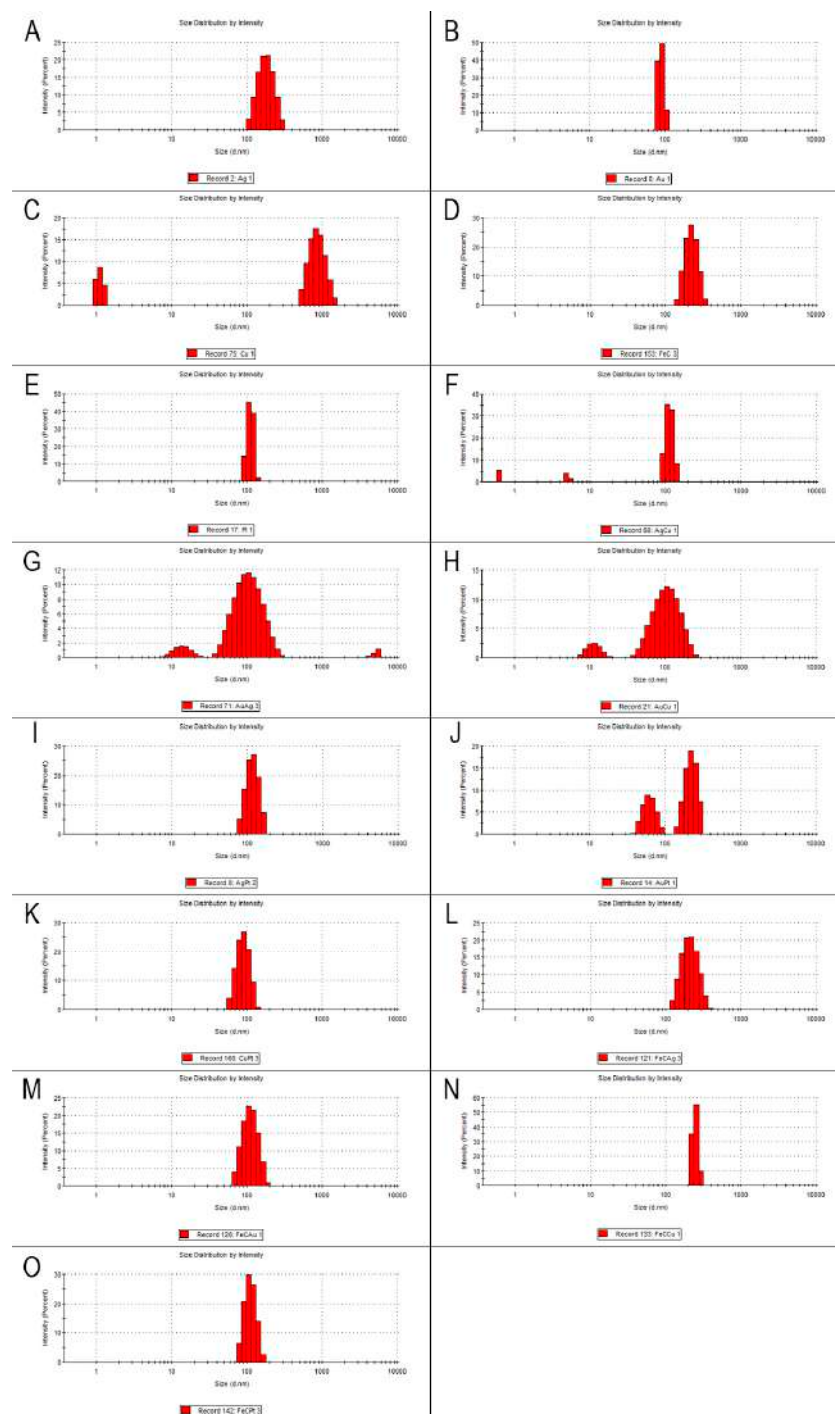


Figure 2. The hydrodynamic diameter of the nanoparticles. (A)—Ag, (B)—Au, (C)—Cu, (D)—FeC (iron NPs coated with carbon), (E)—Pt, (F)—AgCu, (G)—AuAg, (H)—AuCu, (I)—AgPt, (J)—AuPt, (K)—CuPt, (L)—FeCAg, (M)—FeCAu, (N)—FeCCu, (O)—FeCPt.

Negative zeta potential values indicate the type of surface charge on the nanoparticles. Among the single nanoparticles, CuNPs had the least negative zeta potential (−3.5 mV), indicating low colloidal stability, but when considering the morphology of the nanoparticles used in this study, this value indicates physicochemical abnormalities, most likely related to the formation process. The AgNPs had the most negative value among the single nanoparticles (−35.2 mV), while among the complexes, AgPtNPs had the most negative

value (-38.1 mV). In general, the zeta potential values indicated the samples had moderate to low stability. The highest PDI value was observed for FeC (0.8 ± 0.8), while the lowest was observed for AgFeC (0.3 ± 0.1). A PDI value approaching 1 indicates high polydispersity and high particle size variation.

2.5. Laser Emission Spectroscopy Studies of the Tested Nanoparticles

Laser emission spectroscopy allowed the confirmation of the presence of the tested NPs; Ag (328.069 and 338.289 nm) (Figure 3a,b), Pt (306.471 nm) (Figure 3c), Fe (259.837 and 259.940 nm) (Figure 3d), Cu (324.754 nm) (Figure 3e), and Au (267.595 nm) (Figure 3f) were contained in all dispersed aqueous suspensions tested. The results showed that the highest peak intensity occurred in suspensions containing single nanoparticles, the exception being PtNPs. These differences may be due to the uneven distribution of the dried nanoparticles. It is worth noting the low intensity of Pt peaks, which indicates the low content of these nanoparticles in the volume of the liquid tested.

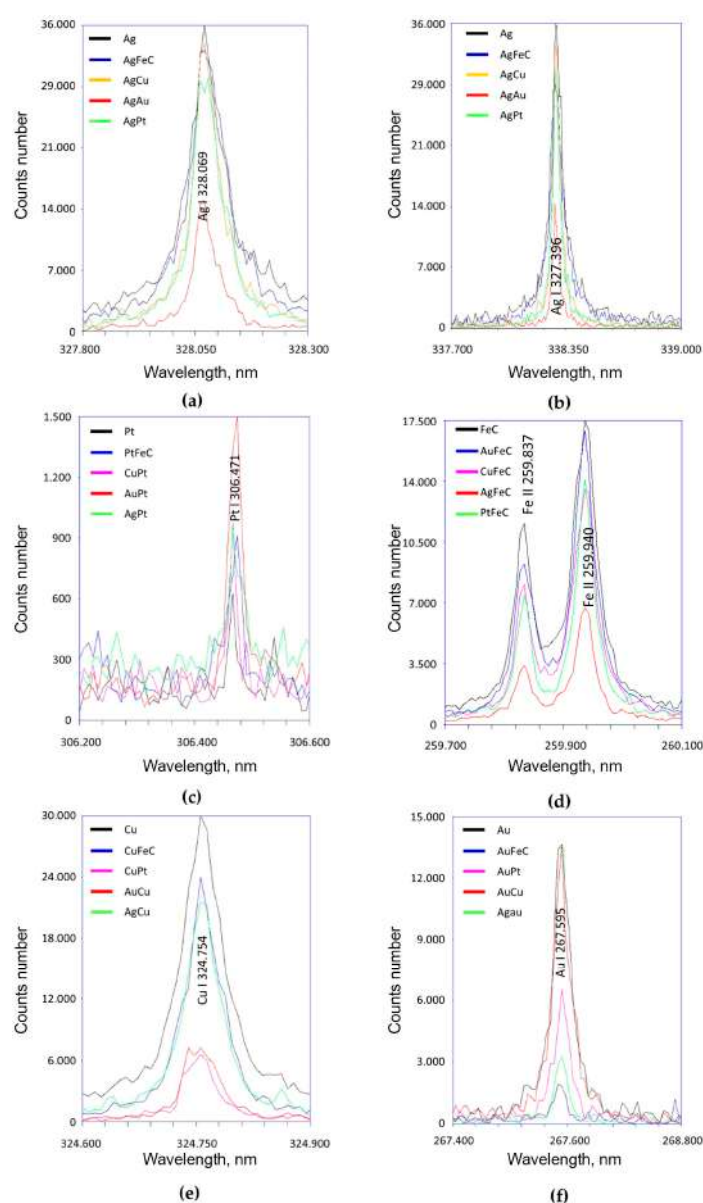


Figure 3. Laser emission spectroscopy studies of selected NPs using different spectral lengths. Where the (a–f) diagram shows measurements for the studied nanoparticles, for different lengths of the spectra.

2.6. Elemental Composition Tests of Nanoparticles (EDX—Energy-Dispersive X-Ray)

The results of the EDX analysis with standard deviations are presented in Table 4. The study confirmed the presence of NPs. The number of NPs varied depending on the type of NPs, and the differences could be due to the formation of agglomerates.

Table 4. EDX analysis of tested nanoparticle.

Element		Mean Weight Value [%]	Mean Atomic Value [%]
AgAu	Ag	91.45 ± 2.06	95.31 ± 1.01
	Au	8.57 ± 2.07	4.87 ± 1.22
AgCu	Ag	85.08 ± 2.05	77.09 ± 2.86
	Cu	14.92 ± 2.05	22.92 ± 2.86
AgFeC	Ag	16.69 ± 0.71	4.05 ± 1.01
	Fe	48.13 ± 11.03	23.41 ± 10.22
	C	35.20 ± 11.53	71.81 ± 11.38
AgPt	Ag	6.49 ± 1.62	11.13 ± 2.62
	Pt	93.51 ± 1.62	88.99 ± 2.40
AuCu	Au	22.37 ± 5.30	8.60 ± 2.32
	Cu	77.63 ± 5.30	91.40 ± 2.32
AuFeC	Au	1.69 ± 1.02	0.43 ± 0.26
	Fe	11.17 ± 7.83	2.79 ± 2.20
	C	87.43 ± 8.87	97.11 ± 2.28
AuPt	Au	88.55 ± 1.94	88.45 ± 1.93
	Pt	11.61 ± 1.96	11.52 ± 1.97
CuFeC	Cu	2.94 ± 2.50	0.79 ± 0.69
	Fe	32.32 ± 0.88	9.64 ± 0.62
	C	64.64 ± 3.27	89.53 ± 1.28
CuPt	Cu	1.74 ± 0.98	4.48 ± 1.76
	Pt	98.49 ± 0.61	95.52 ± 1.76
PtFeC	Pt	2.69 ± 1.37	0.43 ± 0.33
	Fe	8.30 ± 5.36	2.20 ± 1.27
	C	89.20 ± 6.82	97.91 ± 1.32
	Ag	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	Au	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	Cu	100 ± 0.0	100 ± 0.0
FeC	Fe	26.91 ± 4.65	7.37 ± 1.60
	C	73.09 ± 4.65	92.63 ± 1.60
Pt		100 ± 0.0	100 ± 0.0

2.7. Fungicidal Properties of the Tested Nanoparticles

The survival rate results of the isolated fungal strains are presented in Figures 4–11.

2.7.1. Silver Nanoparticles

As shown in the results presented in Figure 4, AgNPs showed similar levels of biocidal activity regardless of the applied concentration; however, the activity varied depending

on the fungal strain. The applied AgNPs showed the strongest biocidal properties against *D. rugosa* and *C. albicans*, whose survival rate in both cases for each applied concentration was 7–5%. Similar survival rates were also observed for *D. catenulata* and *C. parapsilosis*; the survival rate for the highest concentration of 25 mg/L was 8%, while for the lowest concentration, it was 6%. In the case of *C. glabrata*, the survival rate for the lowest applied concentration was 22%.

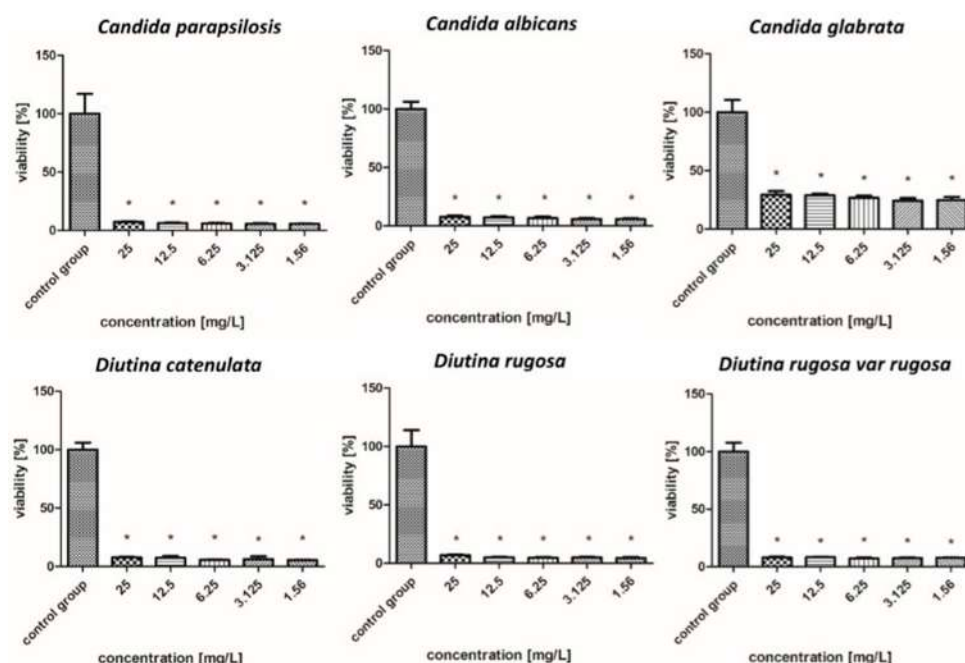


Figure 4. Viability (%) of the fungal strains exposed to silver nanoparticles. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation, and asterisks (*) show statistically significant differences ($p \leq 0.05$) compared with the control group.

2.7.2. Gold Nanoparticles

Figure 5 shows that in the case of AuNPs, pathogen survival increased as the concentration decreased. These nanoparticles showed weaker biocidal properties than AgNPs. The applied nanoparticles showed the weakest antifungal properties against the *C. albicans* and *C. glabrata*, whose survival rate increased from 5–22% for a concentration of 25–6.25 mg/L to 104% for a concentration of 3.125–1.56 mg/L. In the case of *C. parapsilosis*, across all concentrations, the survival rates were 6–24%, but for the lowest concentration of 1.56 mg/L, there was an increased survival rate, reaching more than 100%. *D. catenulata* and *D. rugosa* var. *rugosa* were the most sensitive pathogens to AuNPs, where the survival rate for the highest concentration was 5–7%, and that for the lowest concentration, 1.56 mg/L, was 15–11%.

2.7.3. Copper Nanoparticles

As shown in Figure 6, overall, CuNPs showed improved antifungal properties compared to AuNPs but worse antifungal properties compared to AgNPs. *D. catenulata* was the most susceptible pathogen to CuNPs; at concentrations of 6.25–25 mg/L, it showed very weak survival rates of about 2%, whereas at concentrations of 1.56 and 3.125 mg/L, the values increased, but not significantly, with a survival rate of only 4–5%. In the case of *C. albicans*, *C. glabrata*, *D. rugosa*, and *D. rugosa* var. *rugosa*, high concentrations, i.e., 12.5 and 25 mg/L, reduced the survival rate to 1–7%, while with decreasing concentrations, there was an increase in survival rate, reaching more than 100% in some cases. In contrast, the

survival rate of strains such as *C. parapsilosis* for concentrations of 6.25–25 mg/L ranged from 3% to 8%.

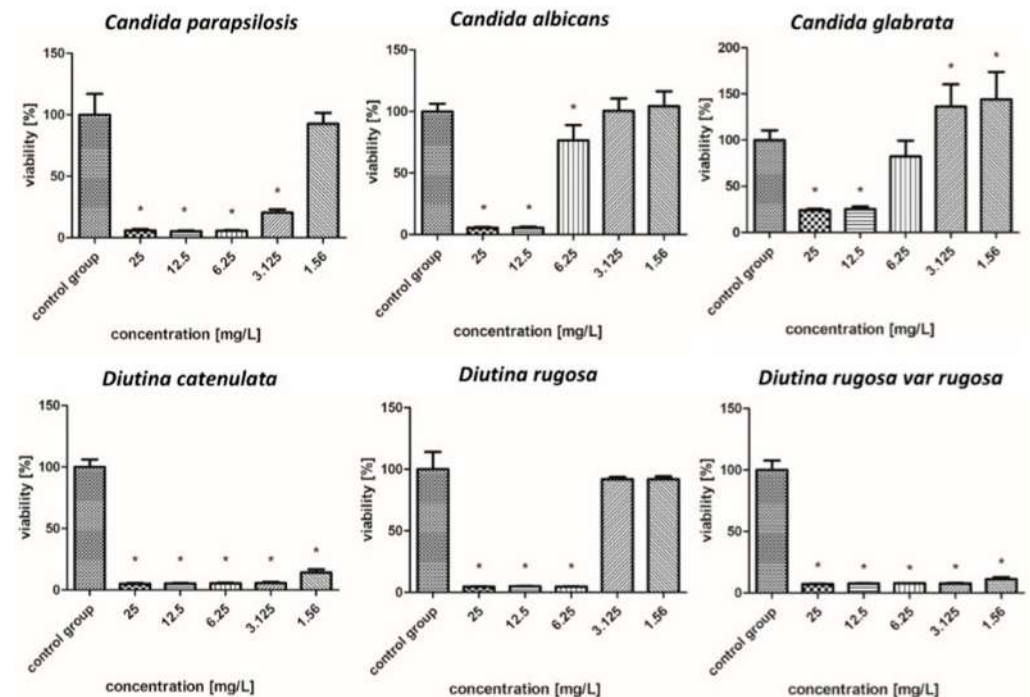


Figure 5. Viability (%) of the fungal strains exposed to gold nanoparticles. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation, and asterisks (*) show statistically significant differences ($p \leq 0.05$) compared with the control group.

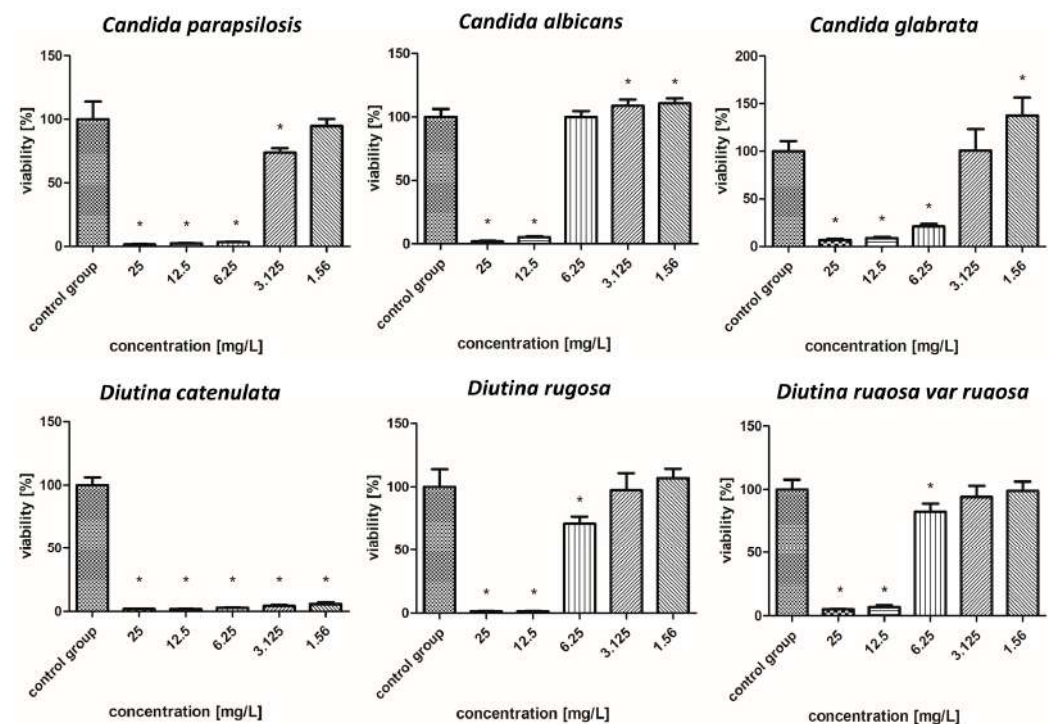


Figure 6. Viability (%) of the fungal strains exposed to copper nanoparticles. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation, and asterisks (*) show statistically significant differences ($p \leq 0.05$) compared with the control group.

2.7.4. Iron Nanoparticles Coated with Carbon

According to Figure 7, FeCNPs—iron NPs coated with carbon—achieved worse effects than CuNPs. In the case of *C. albicans*, *D. catenulata*, *D. rugosa*, and *D. rugosa* var. *rugosa*, when the highest concentrations were used, the survival rates of these pathogens oscillated around 37% to 61%, which increased as the concentration decreased. The most resistant pathogen to the FeCNPs was *C. glabrata*, for which even the highest concentrations showed low or no fungicidal properties, and the most susceptible was *D. rugosa* var. *rugosa*.

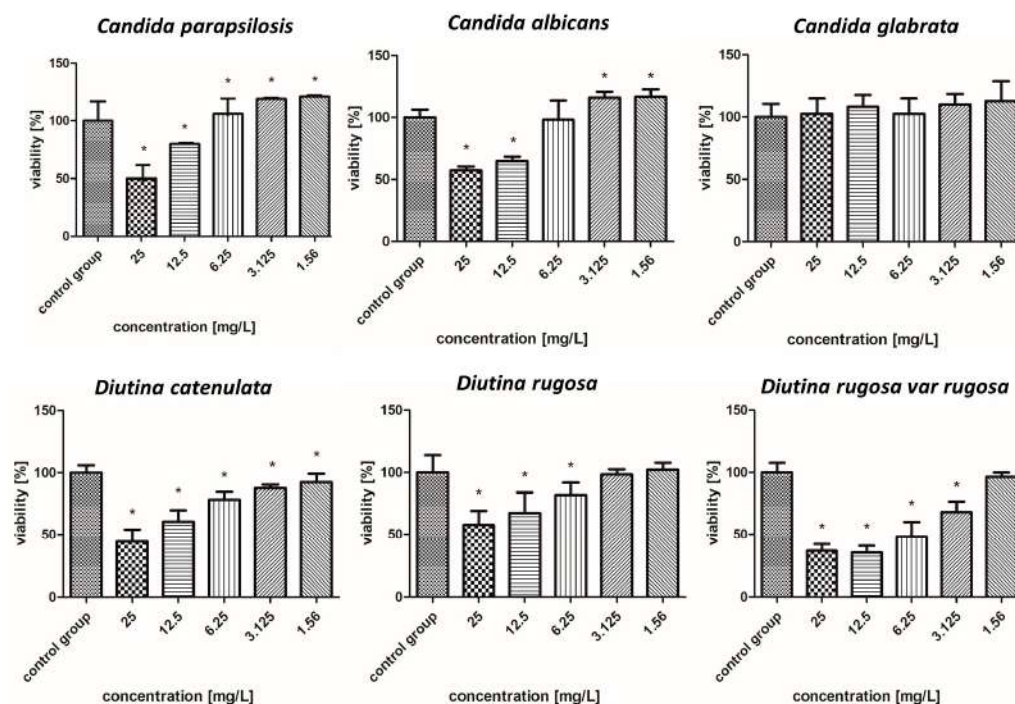


Figure 7. Viability (%) of the fungal strains exposed to iron nanoparticles. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation, and asterisks (*) show statistically significant differences ($p \leq 0.05$) compared with the control group.

2.7.5. Platinum Nanoparticles

As presented in Figure 8, by far the worst results of all the tested nanoparticles regarding fungicidal activity were observed for PtNPs. For all other strains, PtNPs showed poor or no decrease in survival, even for the highest concentrations. Due to the weak antifungal activity of iron and platinum nanoparticles, they were not considered for further study of their effects in nanocomplexes.

2.7.6. Silver–Gold Nanocomplex

Figure 9 illustrates that the nanoparticle complexes showed synergistic effects and achieved stronger fungicidal properties than single nanoparticles, but to varying degrees. The AgAuNP complex showed a similar tendency to AgNPs based on the fact that there were no rapid increases or decreases in the level of a given strain in relation to the concentration of nanoparticles. Strains such as *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *D. catenulata*, *D. rugosa*, and *D. rugosa* var. *rugosa* were most sensitive to the complex, with survival rates for each concentration ranging from 5 to 8%. In the case of *C. glabrata*, the applied complex showed lower efficacy, but nevertheless, the survival rate was 25–35%, depending on the concentration.

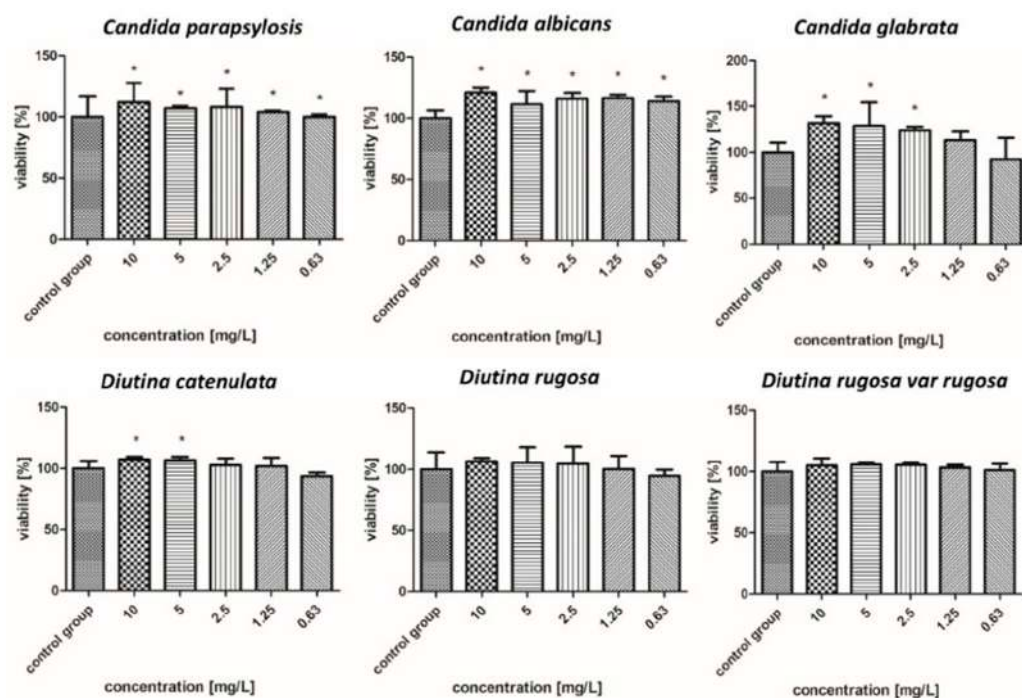


Figure 8. Viability (%) of the fungal strains exposed to platinum nanoparticles. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation, and asterisks (*) show statistically significant differences ($p \leq 0.05$) compared with the control group.

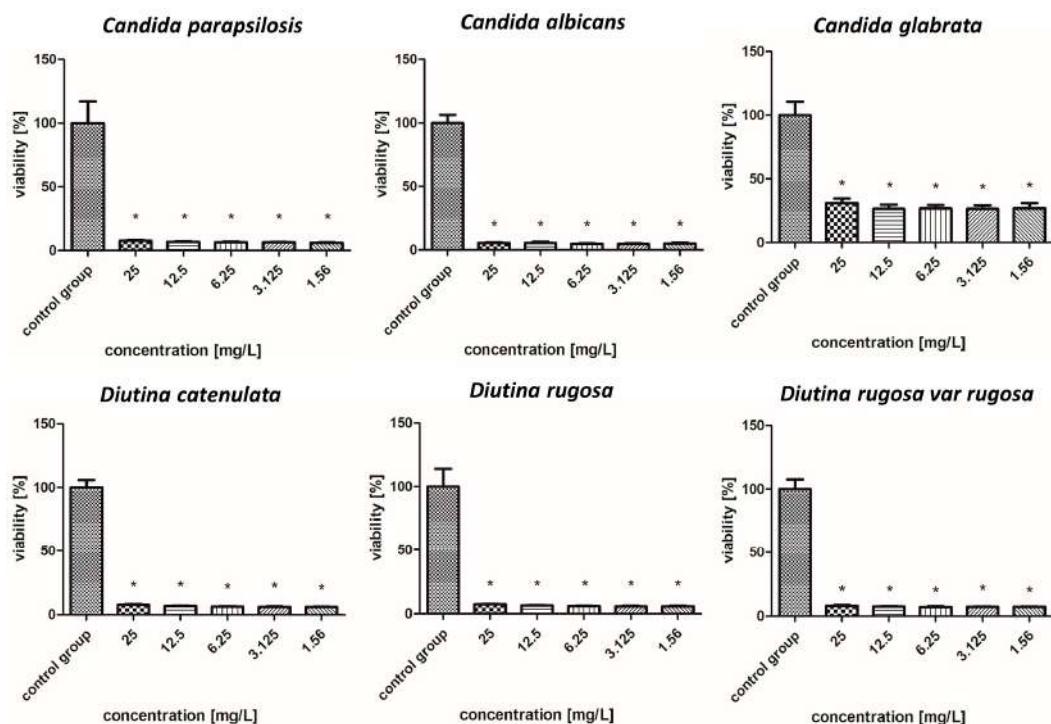


Figure 9. Viability (%) of the fungal strains exposed to silver-gold nanocomplex. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation, and asterisks (*) show statistically significant differences ($p \leq 0.05$) compared with the control group.

2.7.7. Silver-Copper Nanocomplex

Regarding Figure 10, the complex that showed the strongest fungicidal activity among all the tested individual nanoparticles and nanocomplexes was AgCuNPs. For strains of *C. albicans*, *C. parapsylosis*, *D. catenulata*, *D. rugosa*, and *D. rugosa var. rugosa*, the survival rate at

the highest concentration was about 2%. Slightly weaker antifungal activity was observed for *C. glabrata*, whose survival rate was 10%.

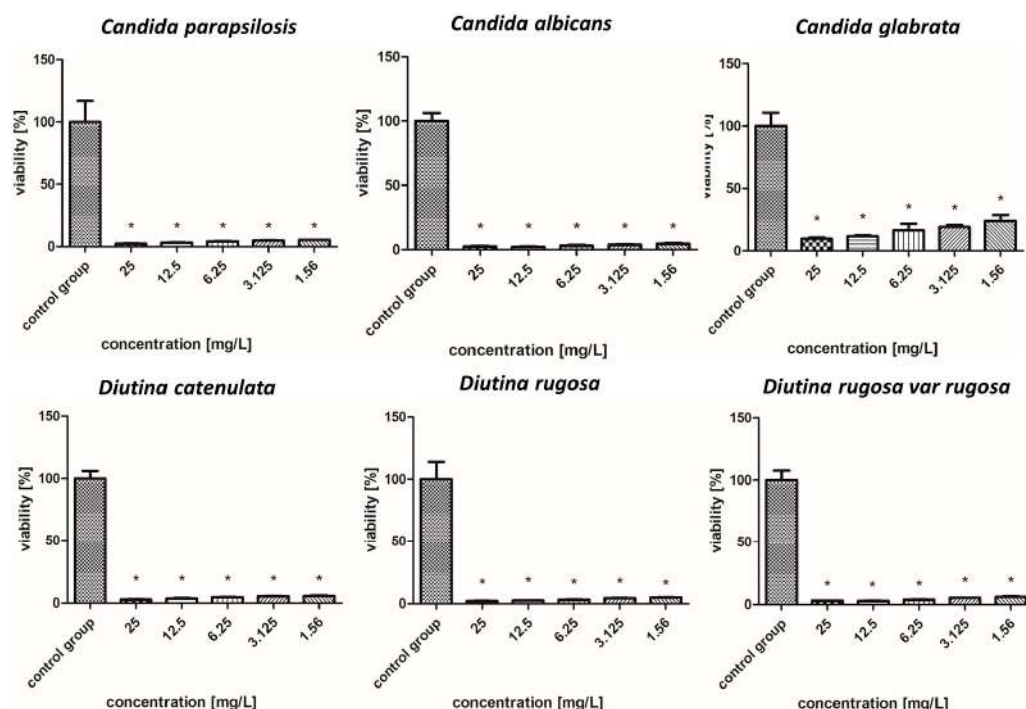


Figure 10. Viability (%) of the fungal strains exposed to silver–copper nanocomplex. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation, and asterisks (*) show statistically significant differences ($p \leq 0.05$) compared with the control group.

2.7.8. Gold–Copper Nanocomplex

As indicated in Figure 11, the AuCuNP complex demonstrated the weakest fungicidal properties among the complexes, but its effect was nevertheless strong. The most sensitive pathogens to this complex were *D. catenulata* and *D. rugosa* var. *rugosa*, in which the highest concentration reduced the survival rate to 1–6%; however, an increase in survival rate at the lowest concentration was also observed (20–41%). Concentrations of 12.5–25 mg/L showed the strongest fungicidal properties against *C. albicans* and *C. glabrata*, reducing their survival to 1–11%, but at lower concentrations (1.56–6.25 mg/L), their survival increased rapidly. Strong biocidal properties were also observed in the case of *C. parapsilosis* and *D. rugosa*, in which, up to a concentration of 6.25 mg/L, the survival rate oscillated between 1 and 10%.

2.8. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) Results After Incubation with Selected NPs

Based on the results presented in Table 5, it is possible to provide a detailed description of the effects of nanoparticles on particular strains of fungi. The results in the table represent the MIC and MFC after NP treatment.

Table 5 shows the pathogens for which MIC and MFC were obtained. If no MIC or MFC was obtained for a particular nanoparticle, the nanoparticle's data were excluded. For strains for which one of the measurements could not be determined, “-” is marked in the table.

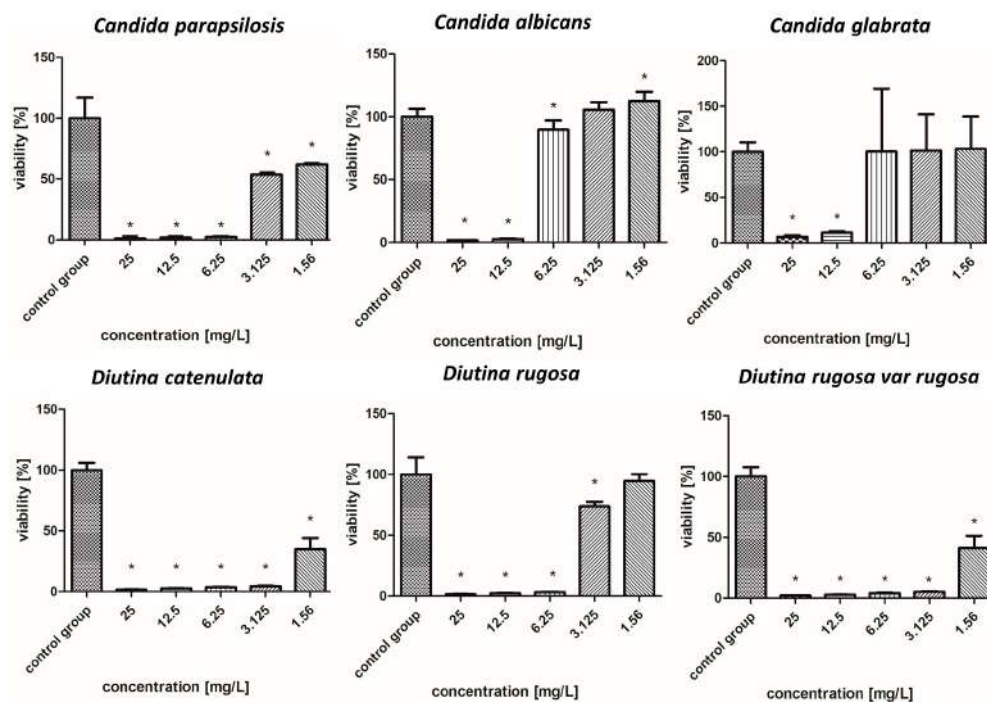


Figure 11. Viability (%) of the fungal strains exposed to gold–copper nanocomplex. The results are presented as the mean $\pm$ standard deviation, and asterisks (*) show statistically significant differences ($p \leq 0.05$) compared with the control group.

Table 5. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) evaluated for six isolated fungal strains.

Pathogen Species	NP Type	MIC (mg/L)	MFC
<i>Diutina rugosa var. rugosa</i>	Ag	6.25	12.5
	Cu	12.5	12.5
	AgAu	6.25	25
	AgCu	25	25
<i>Candida parapsilosis</i>	Ag	3.125	12.5
	AgAu	6.25	25
	AgCu	12.5	25
<i>Candida albicans</i>	Ag	12.5	12.5
	AgAu	12.5	25
	AgCu	25	25
<i>Candida glabrata</i>	Ag	12.5	12.5
	AgAu	12.5	25
	AgCu	25	25
<i>Diutina catenulata</i>	Ag	3.125	12.5
	Au	12.5	25
	Cu	25	-
	Fe	12.5	-
	AgAu	6.25	12.5
	AgCu	0.75	12.5
	AuCu	3.125	3.125

Table 5. Cont.

Pathogen Species	NP Type	MIC (mg/L)	MFC
<i>Diutina rugosa</i>	Ag	6.25	12.5
	AgCu	25	25

2.9. Antifungal Disc Results

The sensitivities of the isolated microorganisms to available mycotic substances using the disc diffusion method are presented in Table 6.

Table 6. Zones of inhibition for pathogen growth after the application of commercially available discs with antifungal agents. Applied agents: FCN25—fluconazole, 25 g/L; FCN10—fluconazole, 10 g/L; ECN10—econazole, 10 g/L; KCA10—ketoconazole, 10 g/L; AMB20—amphotericin B, 20 g/L; FY1—flucytosine, 1 g/L; CTM10—clotrimazole, 10 g/L; and NY100—nystatin, 100 g/L.

Pathogen Species	Applied Agent	Concentration of the Mycotic (g/L)	Zones of Inhibition (mm; Diameter)
<i>Diutina rugosa</i> var. <i>rugosa</i>	fluconazole	25	12
	fluconazole	10	8
	econazole	10	14
	ketoconazole	10	20
	amphotericin B	20	6
	flucytosine	1	10
	clotrimazole	10	22
	nystatin	100	8
<i>Candida parapsilosis</i>	fluconazole	25	18
	fluconazole	10	0
	econazole	10	15
	ketoconazole	10	40
	amphotericin B	20	6
	flucytosine	1	16
	clotrimazole	10	34
	nystatin	100	8
<i>Candida albicans</i>	fluconazole	25	22
	fluconazole	10	20
	econazole	10	14
	ketoconazole	10	22
	amphotericin B	20	10
	flucytosine	1	12
	clotrimazole	10	14
	nystatin	100	14

Table 6. Cont.

Pathogen Species	Applied Agent	Concentration of the Mycotic (g/L)	Zones of Inhibition (mm; Diameter)
<i>Candida glabrata</i>	fluconazole	25	18
	fluconazole	10	8
	econazole	10	16
	ketoconazole	10	14
	amphotericin B	20	10
	flucytosine	1	32
	clotrimazole	10	8
	nystatin	100	18
<i>Diutina catenulata</i>	fluconazole	25	28
	fluconazole	10	0
	econazole	10	20
	ketoconazole	10	30
	amphotericin B	20	10
	flucytosine	1	20
	clotrimazole	10	22
	nystatin	100	16
<i>Diutina rugosa</i>	fluconazole	25	28
	fluconazole	10	0
	econazole	10	20
	ketoconazole	10	30
	amphotericin B	20	10
	flucytosine	1	20
	clotrimazole	10	32
	nystatin	100	16

The largest growth inhibition zone (40 mm) was obtained for *C. parapsilosis* after KCA10 treatment, while after CTM10 treatment, the zone of inhibition was 34 mm. The *C. glabrata* strain, after using flucytosine 1 µg (FY1), had a growth inhibition zone with a radius of 32 mm. The KCA10 formulation was particularly effective against the *D. catenulata* and *D. rugosa* strains, reaching zones of inhibition of 30 mm for both strains. In contrast, the worst-performing agent was fluconazole 10 µg (FCN10) for the strains *C. parapsilosis*, *D. rugosa*, and *D. catenulata*, with values of 0 mm. *D. rugosa* var. *rugosa* with AMB20 applied reached a zone size of 6 mm, as did *C. parapsilosis* with the same agent. The AMB20 formulation also showed high efficacy with *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *D. catenulata*, and *D. rugosa*, resulting in inhibition zones of 10 mm for each of these strains. It is worth pointing out that the AMB20 formulation demonstrated different efficacies depending on the fungal strain. For *C. parapsilosis* and *D. rugosa* var. *rugosa*, the zones of inhibition were 8 mm, 6 mm, and 6 mm, respectively. In contrast, the highest values, 10 mm each, were obtained for *C. albicans*, *C. glabrata*, *D. catenulata*, and *D. rugosa*. Growth inhibition zones of 4 mm were obtained for the *C. glabrata* strain using CTM10 and 8 mm using FCN10.

3. Discussion

There are limited reports in the available literature of studies on the effects of NPs on fungal strains isolated from cows diagnosed with *mastitis*. However, among the available reports, a similar study was conducted by Zhang et al. [9]. In this study, silver nanoparticles (AgNPs) were shown to have potent antifungal activity against various fungal strains, including *C. albicans* and *C. glabrata*. In a study by Wierzbicki et al. [10], *C. albicans* was highly resistant to nanoparticles, but *C. parapsilosis* was sensitive to AuNPs. In our study, *C. parapsilosis* was susceptible to AuNPs, especially at concentrations higher than 6.25 mg/L. While a study by Wierzbicki et al. showed that the survival rate of *C. glabrata* after treatment with AuNPs was reduced by 62%, in our research, the survival rate was reduced by as much as 78% at the highest concentration of 25 mg/L. In their case, 25 mg/L CuAuNPs induced an 80% reduction in the pathogen's colonies, while in our case, growth was inhibited by 93%. *D. rugosa* also ranks among rare fungi responsible for *mastitis* in cattle. *D. rugosa* infections are new to the veterinary literature. Kim et al. [11] determined the sensitivity of fungi to AgNPs using a broth microculture method. Sensitivity was tested for strains such as *Candida* and *Trichophyton mentagrophytes*, with the nanoparticles showing antifungal activity against both genera, which is consistent with our study, in which all three *Candida* strains showed high sensitivity to AgNPs. Khezerlou et al. [12] conducted a study on AuNPs, which showed efficacy against *C. albicans*. In our study, AuNPs were effective against most of the strains tested only at higher concentrations. A study by Yehia and Ali [13] showed that iron nanoparticles (FeNPs) generated antifungal activity against *Candida* spp. Compared to the drug AMB20, which they also used, the FeNPs were more effective in inhibiting the growth of *C. albicans* and *C. parapsilosis*. As reported by Osama et al. [14], AgNPs, CuNPs, and their complexes are effective in reducing pathogen survival in *mastitis* cases. The high effectiveness of complexes of these nanoparticles was proven in this study, where the average survival rate for all concentrations of AgCuNPs for all strains was only 11%. Fan et al. [15] reported that AgNPs are more effective against fungi and yeast compared to CuNPs; however, the results obtained in our study differ from the study by Fan et al.

In the case of *mastitis* caused by *D. rugosa*, according to Bhordia et al. [16], the pathogen is sensitive to some commercial drugs, such as FCN. It has been proven repeatedly that *D. rugosa* is also resistant to AMB20. Our study also confirms this fact concerning resistance to AMB20 and sensitivity to FCN25. The results of a study by Paredes et al. [17] showed that, against the mentioned strain, AMB20 showed an average minimum inhibitory concentration (MIC) value of 0.66 mg/L, while the MIC for FCN averaged 0.81 mg/L. A determination of the sensitivity of antifungal drugs commonly found in human and veterinary medicine was carried out by Stavrou et al. [18]. They further described that AMB is an excellent antifungal therapy against most known strains. On the other hand, a paper by Al-abedi and Khalil [19] showed that 50% of *C. parapsilosis* strains were sensitive to FCN, 45% were sensitive to KCA, 25% were sensitive to NY, and 75% were sensitive to AMB20. Another study conducted by Hasanin et al. [20] involving *C. albicans*, *C. tropicalis*, *P. kudriavzevii*, and *C. glabrata* showed that all the *Candida* isolates used were sensitive to KCA, with zones of inhibition ranging from 24.7 mm to 34.3 mm. In our case, the zone of inhibition for one of the strains, *C. glabrata*, was lower (14 mm in diameter), indicating that the strain was resistant to KCA. However, after applying other antifungals to *C. glabrata*, we proved that this strain is sensitive to FY1, as the zone of inhibition here was 32 mm (diameter). Our results confirm the results obtained by Hasanin et al. for *C. glabrata*, in which this strain showed low survival only at higher concentrations of AgNPs. Hasanin et al. also calculated MIC values for AgNPs. Against *C. albicans*, they obtained MIC values of 0.7 µg/mL and 1 µg/mL. Against *C. glabrata*, the values were 2.7 µg/mL and 4 µg/mL.

Ludwig et al. [21] also conducted MIC tests on AgNPs against *C. albicans*; the lowest inhibitory concentration was 0.21 mg/L, while against *C. parapsilosis*, it was 1.69 mg/L. They calculated MIC values for commercial antifungal drugs as well, which we tested using the disc diffusion method. The results of the study by Ludwig et al. are consistent with those obtained in our experiments, which were conducted on 96-well plates, as shown by the efficacy of AgNPs against various *Candida* strains. Ludwig et al. reported that, against their strains, KCA and FY proved to be the most effective treatment among the other mycotics tested. This agrees with our disc test, in which the largest diameter for the zone of inhibition was obtained for KCA (22 mm). FY, on the other hand, showed worse efficacy in our study. Another paper by Montoya et al. [22] also focused on the determination of MIC values for commercial mycotics conducted against *D. rugosa*. The MIC determined for AMB20 was ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$, indicating that this formulation had high efficacy against *D. rugosa*. FCN (MIC ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$) was also effective; however, in our study, FCN10 was not effective (diameter, 0 mm). Sukumar [23] conducted a study on *C. parapsilosis*, proving that these strains were sensitive specifically to AMB (100 U), CTM10, NY100, and KCA (100 mg). However, only 30% of the strains tested were sensitive to FCN (10 mg).

Pointing out the potential of using nanoparticles in practice, it is also worth highlighting their effect on cells. A study by Chen et al. [24] conducted toxicity tests of AgNPs against red blood cells. The study showed that the hemolysis of these cells varied depending on the NP dose and particle size. Smaller NPs, i.e., reaching 15 nm, showed higher hemolytic capacity than larger ones reaching 50 and 100 nm. A similar conclusion was drawn by Kim et al. [25], whose study pointed out that larger NP sizes (100 nm versus 30 nm) showed less toxicity to blood cells. Similar studies were conducted on chicken embryo blood cells [26]. AgNPs at 2 mg/L in these studies showed a negative effect of these nanoparticles on the morphology of red blood cells, leading to anisocytosis and an increase in the number of immature erythrocytes. Still, they did not lead to hemolysis of these cells. Similar results were obtained in a study by Aseichev et al. [27], in which the hemolysis of nanoparticles decreased with increasing nanoparticle size (5, 10, and 20 nm), but the tests conducted for Au concentrations of 20 μM did not cause hemolysis. Other results were obtained in a study by Purohit et al. [28], whose research showed the toxicity of AuNPs to human red blood cells, but the application of a coating of bovine serum albumin on the NPs caused them to exhibit much lower hemolysis. A study by Kote et al. [29] examining the effects of CuNPs on red blood cells indicated that low concentrations of these NPs (1 mg/mL) and a size of 22 nm showed no toxicity to these cells. Similar results were obtained by Abdulwahab et al. [30], who conducted an experiment on different concentrations of CuNPs: 200, 100, 50, 25, 12.5, and 6.25 mg/L. The study showed that red blood cell hemolysis for a concentration of 100 mg/L was less than 5%. However, it is worth highlighting that the survival rate of red blood cells varies depending not only on the size and concentration of NPs but also on the methods of their synthesis, which should be taken into account when considering the possibility of using NPs in practice.

A similar tendency is observed for other cells, for example, human mammary epithelial cells (BME-UV1) and human microvascular endothelial cells (HMEC), on which studies were conducted by Wierzbicki et al. [10], showing that among the Ag, Au, Cu, Fe, PtNPs and their complexes, only CuNPs and copper-containing complexes showed a reduction in the survival of the aforementioned cells at concentrations higher than 1 mg/L. Slight toxicity (10–15%) was also noted for the highest concentrations. Similar results were obtained by Radzikowski et al. [31] using BME-UV1 cells, which showed that concentrations of 0.5–5 mg/L of AuNPs showed no toxicity to these cells. Another study by Lange et al. [32] using HFFF2 lineage cells and 1 $\mu\text{g/mL}$ Ag, Au, and Cu NPs showed no toxicity. The

indicated reports suggest great potential for the use of nanoparticles in the prevention of fungal *mastitis*, but differences in the effects of individual NPs must be considered.

The mechanisms of action of nanoparticles differ, with different potential mechanisms of action in the prevention of *mastitis*. Silver nanoparticles slowly release silver ions. These ions are highly reactive and can interact with bacterial/yeast cell components, and they can bind to thiol groups in the pathogen's proteins and enzymes, thereby interfering with essential cellular processes like energy production and replication. The literature indicates that AgNPs are able to enter the pathogen's cytoplasm and interact with their DNA and ribosomes, which results in DNA condensation and, later, mutations. Ribosomes, the cellular machinery responsible for translating genetic information into functional proteins, are directly targeted by nanoparticles, leading to the disruption of protein synthesis. This interference halts the production of essential proteins required for bacterial growth and metabolism [33,34]. Based on the findings reported by Długosz et al. [35], it can be inferred that the silver–copper nanoparticle systems (Ag–Cu) utilized in the present study exhibit significant antimicrobial efficacy, consistent with the observations made for nanoparticles synthesized in deep eutectic solvents (DESs). Although not explicitly defined as a chemical “complex”, the Ag–Cu system is understood as a coexistent formulation comprising both silver (AgNPs) and copper nanoparticles (CuNPs) within a unified matrix. The incorporation of these metallic nanoparticles into DES-based systems has been shown to improve their physicochemical stability under variable environmental conditions while maintaining sustained bioactivity over time. Similarly, this was also proven in the work of Martín-Perales et al. [36], in which the combination of silver and copper in a single “system” showed significantly better antimicrobial efficacy than the individual metals used separately. The synergy of silver and copper nanoparticles is based on their complementary properties, where silver releases the Ag⁺ ions mentioned many times before, while copper also releases Cu²⁺ ions. The material used in Martín-Perales et al.'s Ag–Cu@ZIF-8 work was characterized by high porosity, which allows for efficient deposition and controlled release of metal ions, further aiding their long-term performance in the system. The bimetallic bonding of the commercial nanoparticles themselves, as in our study, also creates the conditions for the ion release demonstrated in the mentioned works. Such properties are particularly important in the context of increasing antimicrobial resistance, as the synergy between metals enhances effectiveness against infections, including *mastitis*.

Research on the application of nanoparticles directly to the udder is still in progress, and some commercially available products are already offered to breeders. Nevertheless, scientific data on the agents discussed in this article, among others, are still lacking in terms of safety. Furthermore, in vitro studies are still common. One paper, authored by Garibo Ruiz et al. [37], involves testing nanoparticles in vivo. The aim of the Garibo Ruiz et al. study was to evaluate the effects of Argovit-C, which contains AgNPs, on the susceptibility of *S. aureus* and *S. dysgalactiae* to antibiotics in cows suffering from *mastitis*. The results of the in vivo experiments indicated that Argovit-C AgNPs significantly improved the susceptibility of *S. aureus* and *S. dysgalactiae* to a wide range of antibiotics. These results mean that nanoparticles, which were the main target in our study as well, could be a promising tool in overcoming drug resistance in veterinary medicine. However, survival studies using fungal strains isolated from the affected udder are not practiced, and therefore, this represents a major research gap.

AgAu complexes showed varying efficiency values for various organisms. Such complexes form a complex “interface” structure, which can affect their catalytic activity. Reports indicate that the distribution of silver and copper in AgCu nanoparticles is not conducive to the generation of optimal active sites for interaction with pathogens. Copper may oxidize more readily to form CuO on the surface, which may alter antifungal activity

compared to pure silver nanoparticles. Interactions between metals can cause one metal to suppress the activity of another [38,39]. However, in a study by Medina et al. [40], AgCu showed better antimicrobial activity than monometallic nanoparticles. It was pointed out that the crucial element influencing the effectiveness of a given method is the difference in the methods of experiments. The article by Medina et al. presents the results of a study on the antibacterial properties of nanocomposites based on titanium (TiO_2), however, which were modified with gold (Au), silver (Ag), copper (Cu), and their complexes (Ag-Cu). The article states that Ag-Cu complexes had the lowest minimum bactericidal concentration (MBC). In our study, we obtained the same results with those complexes. Other in vitro studies, however, confirmed that the addition of Ag and Cu NPs to cosmetic cow udder care products synergizes the effects of these mixtures, which also provides an effective method of *mastitis* prevention, further indicating the potential and new opportunities to discover synergistic biocidal properties of NPs [41].

For bacterial infections, bimetallic nanoparticles (in our case in complexes) show stronger antibacterial properties compared to single nanoparticles, which was also shown in a literature review by Daimari et al. [42]. The research cited by the authors also showed that nanoparticles in complexes have strong activity against antibiotic-resistant bacteria and exhibit anti-inflammatory and antibacterial properties against pathogens that cause, for example, skin diseases or pneumonia.

An article by Madkhali et al. [43] discusses the impact of Fe_3O_4 NPs (iron oxide nanoparticles) on reducing biofilm formation by *Candida* strains, especially compared to traditional fluconazole treatment. Our study did not include testing against biofilms, but it is significant that the results of efficacy against fungi varied depending on the concentration of FeCNPs. According to the paper, different concentrations of Fe_3O_4 NPs affected fungal resistance, which corresponds with our results, in which FeCNPs showed a significant relationship between concentration and efficacy. In our study, we observed that efficacy was lower at higher concentrations, although none of the concentrations studied showed total fungal death. In contrast, lower concentrations appeared to be more effective against pathogens, which may suggest that too-high concentrations may unnecessarily decrease the activity of nanoparticles.

According to our observations, PtNPs showed the worst results in our antifungal tests. All remaining nanoparticles showed better results in reducing the survival rate of fungi. PtNPs had no significant effect on fungal survival, even at the highest concentrations, which is in line with the results described in the article by Chlumsky et al. [44], in which they were also found to be less effective in biofilm inhibition. In that article, Chlumsky et al. also studied PdNPs, which instead showed 80% inhibition of the growth of planktonic cells and biofilm, achieving 80% CFU reduction at a concentration of 44.5 mg/L, making them more promising candidates for antifungal and antibacterial applications.

Several investigations have explored how nanoparticles affect fungal strains from mastitis-affected cows. While some studies have found that AgNPs and CuNPs have strong antifungal activity, others, like PtNPs, have shown limited efficacy, particularly in biofilm inhibition. This underscores the need for additional in vivo safety testing of such compounds in the field of animal health.

Another important matter is the physicochemical characteristics of NPs, which affect their biocidal properties. PDI is an indicator that can indicate the homogeneity of particles in solution and determines monodispersity when its value is less than 0.1. This parameter can also signal the aggregation of nanoparticles [45]. In the presented research, all samples were characterized by a higher PDI value, meaning that the hydrocolloids were not homogeneous (Table 3). However, the most similar to monodisperse samples were AgFeC and AuCu, reaching PDI values of 0.3, while values indicating the greatest polydispersity were present

in FeC (iron NPs coated with carbon) and CuFeC samples ($PdI = 0.8$). All analyzed nanoparticles exhibited varying sizes of nanoparticles. The hydrodynamic diameter of all types of nanoparticles exceeded 100 nm; however, in the TEM analysis (Figure 1), individual nanoparticles showed small sizes but clustered to form agglomerates. In zeta potential measurements (Table 3), despite a hydrodynamic diameter of more than 100 nm, AgNPs and Ag complexes (AgAu, AgPt, AgFeC) had values around ± 30 mV, which is considered the limit of colloidal stability and points to monodisperse rosins without aggregates. Nanoparticles characterized by a zeta potential of ± 20 mV have short-term stability, while those with zeta potentials $< \pm 5$ mV aggregate quickly [46]. In our research, only Cu had a zeta potential of less than -5 mV. Considering the results obtained, all types of nanoparticles were able to form agglomerates, even if they showed a zeta potential of more than ± 30 mV, due to the high PdI values as well as the large size of the hydrodynamic diameter, especially since, when visualized by TEM, individual nanoparticles showed small sizes.

Regarding the antifungal properties of metal nanoparticles, the effect they exhibit is influenced by many factors, such as shape, size distribution, surface chemistry, and agglomeration. It is recognized that smaller nanoparticles have a higher surface-to-volume ratio, so they exhibit better antifungal properties [47]. One of the mechanisms by which nanoparticles interact with microbial cells is the release of ions that can contribute to generating reactive oxygen species and thus damage cells [48]. In addition to this, the antifungal action of metal nanoparticles involves changes in the cell wall, causing surface changes and the formation of pits and deformations, as well as penetration into cells and interaction with internal structures [49]. In the presented study, metal nanoparticles, due to the formation of agglomerates, probably did not penetrate the fungal cells, but they contributed to their destruction in another way—by interacting with the cell wall or secreting toxic ions, which should be investigated in future studies providing additional information about the up-and-coming antifungal solution of metal nanoparticles and their composites.

4. Materials and Methods

4.1. Biological Material and the Isolated Fungi Cultures

Quarter milk samples were taken from 20 herds containing dairy cattle of the Polish Holstein-Friesian breed. The farms, which kept 10 to 60 milking cows, were located in the Mazowieckie and Podlaskie provinces. Samples were collected between September 2023 and April 2024 from cows that had subclinical or clinical forms of mastitis present in at least one teat (SCC above 200,000/mL). After disinfecting the teats with 70% ethanol for 30 s, milk samples were collected in sterile tubes ($n = 67$), and microbiological cultures were then performed. Specialized media dedicated to fungal cultures were used, including Sabouraud Chloramphenicol Agar (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), Chromogenic Candida Lab-Agar, and DRBC Lab-Agar (Biomaxima, Lublin, Poland). The prepared cultures were incubated at 37°C for 24–48 h. The colonies that were grown were then identified using a MALD-TOF MS apparatus (Bruker, Poznan, Poland).

4.2. Nanoparticles

The nanoparticles used in the experiment were purchased from a commercially available source. The silver, gold, copper, and platinum nanoparticles were purchased from Nano-tech (Warsaw, Poland), while the iron nanoparticles coated with carbon were purchased from 3D-nano (Krakow, Poland).

4.3. Determination of the Nanoparticles' Morphology

The morphology of the purchased nanoparticles was determined using images taken with a transmission electron microscope (TEM, JEM-1220EX, JEOL, Tokyo, Japan).

A hydrocolloid containing the nanoparticles and distilled water was prepared before the images were taken. The prepared mixture was then sonicated (for 2 min), and then the prepared hydrocolloids were placed on molding TEM grids (Formvar on 3 mm 200 mesh Cu grids, Agar Scientific, Stansted, UK). The Formvar grids were then allowed to dry for 24 h at room temperature, after which the images were taken by applying a voltage of 80 keV to the prepared grids.

4.4. Determination of the Physicochemical Properties of the Nanoparticles

To determine the zeta potential and size distribution of the nanoparticles, hydrocolloids were prepared by mixing nanoparticles and distilled water to obtain a concentration of 10 ppm. Then, a Zetasizer Nano ZS apparatus (ZEN3500, Malvern Instruments, Malvern, UK) was used to perform the analyses. Dynamic light scattering (DLS) was used to determine the hydrodynamic magnitude.

4.5. Laser Emission Spectroscopy Studies of the Nanoparticles

Prior to laser emission spectroscopy studies, dispersed aqueous suspensions containing Ag, Au, Cu, Pt, and FeC (iron NPs coated with carbon) NPs and nanocomplexes of AgAu, AgCu, AgPt, AgFeC, AuCu, AuPt, AuFeC, CuPt, CuFeC, and PtFeC were spotted with a disposable pipette onto 2-inch-diameter Dummy CZ-Si silicon wafers (Microchemicals, Ulm, Germany) and vacuum dried at 50 °C (BMT Vacucell 22L, Brno-Zábrdovice, Czech Republic). The process was repeated 10 times.

Laser emission spectroscopy was carried out in the experimental setup according to Nasiłowska et al. [50]. The plasma was generated using a pulsed Nd:YAG laser, Brio model, by Quantel, wavelength 1064 nm, accumulation (shots number) 1, pulse duration 4 ns, pulse energy 46 mJ, gate delay 500 ns, gate width 500 ns. The laser beam was incident perpendicular to the surface of the sample. The radiation emitted by the plasma was recorded with a spectrometer using an optical head and optical fiber. For each suspension tested, 3–4 measurements were made by moving the sample surface along the x-axis by 1 mm.

4.6. Elemental Composition Tests of Nanoparticles (EDX—Energy-Dispersive X-Ray)

Elemental composition studies were performed using an energy-dispersive X-ray (EDX) detector coupled to FEI's Quanta 250 FEG microscope, according to the methodology of Zielińska-Górska et al. [51].

4.7. Determination of Fungal Viability After Treatment with Nanoparticles and Their Complexes

Suspensions were prepared from the isolated fungi. The cultured fungi were dissolved in a solution of sterile NaCl solution. The prepared suspensions had a value of 1.0 McF. The control group was a mixture of 50 µL of sterile water and 50 µL of fungal suspension. Nanoparticle complexes were created by combining two types of nanoparticles in a ratio of 1:1. This mixture was then vortexed. The experimental groups contained 50 µL of fungal suspension, to which 50 µL of nanoparticles was added at different concentrations: 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, and 25 mg/L for Au, Ag, Cu, and FeCNPs (iron NPs coated with carbon) and 0.625, 1.25, 2.5, 5, and 10 mg/L for PtNPs. The prepared suspensions and nanoparticle concentrations were pipetted into 96-well plates so that each well contained 100 µL of the mixture. The prepared plates were protected with parafilm to reduce evaporation of the suspensions and were then placed in an incubator for 24 h at a temperature of 37 °C.

After this time, 20 μL of XTT Cell Proliferation Assay Kit reagent (Merck, Darmstadt, Germany) was added to each well. The plate was again sealed with parafilm and placed in an incubator for another 24 h. The results were read using spectrophotometric absorbance at a measurement wavelength of 450 nm and a reference wavelength of 690 nm (Elisa reader Infinite M200, Tecan, Durham, NC, USA). The control group had a fungal survival rate of 100%, to which the survival rates in the experimental groups were compared. Numerical criteria were estimated, according to which the biocidal properties of NPs were evaluated as follows: excellent: viability 0–3%; very strong: viability 4–15%; strong: viability 16–30%; good: viability 31–50%; moderate: 51–78%; weak: viability 80–99%; inactive: viability > 100%. The data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) in GraphPad Prism 9 software (version 9.2.0, San Diego, CA, USA). Differences at $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

4.8. Preparation of Fungus Suspensions for Additional Experimental Analysis

The previously identified fungal strains were screened on specialized selective media: Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YPD) (Merck, Darmstadt, Germany), Dichloran-rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC), Candida Ident Agar (Biomaxima, Lublin), and Sabouraud Dextrose Agar (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The strains were cultured on the media for 24 h at 37 °C and then suspended in a 0.9% solution of sterile NaCl, resulting in a suspension density equal to 0.5 on the McFarland scale (OD = 0.5).

4.9. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) was conducted on a 24-well plate in the presence of Glucose Chloramphenicol Broth (GCB) (Pol-Aura, Warsaw, Poland). Serial dilutions of the AgNPs, AuNPs, CuNPs, PtNPs, FeCNPs (iron NPs coated with carbon), AgCuNPs, AgAuNPs, and AuCuNPs were performed on the plates using concentrations of 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, and 25 mg/L, while 0.625, 1.25, 2.5, 5, and 10 mg/L concentrations were used for PtNPs. The pathogen suspension preparation was carried out in accordance with Section 4.8 of this paper prior to the process. Previously prepared fungal suspensions were added to each well after the serial dilutions were conducted. Each plate included a positive control well (without nanoparticles) and a negative control well (without a pathogen or nanoparticles). The plates were then incubated for 24 h at a temperature of 37 °C. After the incubation period, the results were analyzed by determining the presence or absence of turbidity in the wells at the respective concentrations. The absence of turbidity at a given concentration indicated the MIC.

4.10. Determination of the Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

The pathogen suspension preparation was carried out in accordance with Section 4.8 of this paper prior to the process. The day following the MIC determination, an experiment was conducted to determine the minimum fungicidal concentration (MFC). After incubating the MIC plates for 24 h, a portion of the solution was taken from the wells with a sterile inoculating loop. The sample was then transferred to plates containing the solid media listed in previous sections of the methodology. These plates were incubated for 24 h at 37 °C. After this time, the results were read by taking pictures of the plates using an Interscience Scan 4000 (Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France), and the MFC was determined by observing pathogen growth. The absence of growth on the plate indicated the minimum biocidal concentration of the nanoparticles used.

4.11. Evaluation of the Susceptibility to Antifungal Agents Using the Disc Diffusion Method

The pathogen suspension preparation was carried out in accordance with Section 4.8 of this paper prior to the process. The pathogen suspensions were carpet-seeded. A 100 μL

fungal suspension was sampled and distributed equally over the entire surface of the Petri dish, which contained the solid media listed in previous sections of the methodology, using the swab rotation technique. Antifungal discs were applied directly to the dishes with previously inoculated pathogens using the spread plate method. The time between the inoculation of the pathogen suspension and the application of the discs did not exceed 30 min. Discs containing the following antifungal substances were applied to the plates: fluconazole, 10 g/L (FCN10); fluconazole, 25 g/L (FCN25); econazole, 10 g/L (ECN10); ketoconazole, 10 g/L (KCA10); amphotericin, B 20 g/L (AMB20); flucytosine, 1 g/L (FY1); clotrimazole, 10 g/L (CTM10); and nystatin, 100 g/L (NY100) (MASTDISCAS[®], MAST GROUP, Bootle, UK). The discs were applied using sterilized tweezers; both antifungal discs and blank discs were applied to each dish. The blank discs were moistened each time with 15 µL of 0.9% (9 g/L) NaCl solution as a control. The plates prepared in this way were incubated in an inverted position for 24 h at 37 °C. After this time, the results were evaluated by measuring the zone of inhibition for the fungal growth in millimeters.

5. Conclusions

The resistance of pathogens to antimicrobial agents is increasing and is a major problem in the treatment of basic infections in animals and in humans, to whom resistant pathogens spread. This is now a global problem that scientists around the world are working to solve. Among the isolated strains, *C. glabrata* was the most resistant to NPs, but the survival rate of this strain as well as the other strains after NP treatment indicated their high sensitivity to NPs. The nanoparticles showed a synergistic effect, indicating that combining them provides increased biocidal properties. The biocidal properties of NPs varied depending on the concentration and type of NPs. Nevertheless, Ag, Au, Cu, and their complexes showed biocidal properties; in contrast, FeC and PtNPs showed no or weak effects. Only *Diutina* spp. was susceptible to FeCNPs, with a survival rate of 37–53% after application of the highest concentration. PtNPs showed no biocidal properties. All complexes showed very strong biocidal properties, especially AgCuNPs. This complex demonstrated significant antifungal activity, reducing the survival of some strains by up to 90% even at low concentrations (1.5 mg/L) suggesting that this complex should be included in further in vivo studies.

Despite the promising biocidal properties of NPs and their high potential for the prevention and management of *mastitis*, several key issues need to be addressed. It should be kept in mind that nanotechnology and the use of NPs is still a developing subject; therefore, the effects of the long-term use of NPs on livestock health are unknown, and this issue thus requires further research. In the context of their use in practice, it is necessary to consider the type of nanoparticles as well as their origin, methods of synthesis, and physicochemical properties, which affect not only their biocidal properties but also their safety of application. The results of the conducted studies indicate that NPs may be an effective new alternative in the prevention of fungal *mastitis*, which in turn could lead to an increase in milk yields and improve the quality of dairy products and animal welfare. The use of nanoparticles in the prevention of *mastitis* has the potential to modernize breeding practices in the future. Regarding the potential for nanoparticles to be used in the future for the direct prevention of mastitis, it is necessary to conduct thorough studies on their safety in the context of contact with cells. Cell assays will make it possible to determine whether formulations containing nanoparticles interacting with the tissues of a living organism are safe and whether their use leads to unwanted side effects, such as inflammatory reactions or toxicity. However, before nanoparticles reach direct applications, their use in inflammation prevention may be based on surface applications, where their interaction with living cells does not occur. The nanocomplexes could, for example, be used to decontaminate milking equipment or other tools that have come into direct contact with pathogens from the milk of

cows suffering from *mastitis*. However, implementing the use of NPs in practice requires not only confirming their in vivo efficacy and safety but also adapting them for use in practice. Monitoring possible side effects in dairy production will also be an important aspect.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules30102086/s1>. Supplementary Figure S1: The zeta potential of the nanoparticles. (A)—Ag, (B)—Au, (C)—Cu, (D)—FeC, (E)—Pt, (F)—AgCu, (G)—AuAg, (H)—AuCu, (I)—AgPt, (J)—AuPt, (K)—CuPt, (L)—FeCAg, (M)—FeCAu, (N)—FeCCu, (O)—FeCPt.

Author Contributions: Conceptualization, writing—original draft preparation, review and editing, methodology and investigation, M.K.; investigation, A.L.; investigation, writing—original draft preparation, W.J.; conceptualization, review, A.K.; investigation, B.N.; investigation, W.S.; conceptualization, review, M.G. This article is a part of Magdalena Kot's PhD thesis. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available upon request from the corresponding author due to (specify the reason for the restriction).

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

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

NPs	nanoparticles
AgNPs	silver nanoparticles
AuNPs	gold nanoparticles
CuNPs	copper nanoparticles
FeCNPs	iron nanoparticles with hydrophilic carbon coating
PtNPs	platinum nanoparticles
AgCuNPs	silver–copper nanoparticle complex
AgAuNPs	silver–gold nanoparticle complex
AuCuNPs	gold–copper nanoparticle complex
AgPtNPs	silver–platinum nanoparticle complex
AgFeCNPs	silver–iron nanoparticle complex
AuPtNPs	gold–platinum nanoparticle complex
AuFeCNPs	gold–iron nanoparticle complex
CuFeCNPs	copper–iron nanoparticle complex
MIC	minimal inhibitory concentration
MFC	minimal fungicidal concentration
FCN10	fluconazole 10 g/L
FCN25	fluconazole 25 g/L
ECN10	econazole 10 g/L
KCA10	ketoconazole 10 g/L
AMB20	amphotericin B 20 g/L
FY1	flucytosine 1 g/L
CTM10	clotrimazole 10 g/L
NY100	nystatin 100 g/L

References

- Cheng, D.; Zhu, S.; Yin, Z.; Ding, W.; Mu, Z.; Su, Z.; Sun, H. Prevalence of bacterial infection responsible for bovine mastitis. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2010**, *4*, 1110–1116.
- Tarazona-Manrique, L.E.; Villate-Hernández, J.R.; Andrade-Becerra, R.J. Bacterial and fungal infectious etiology causing mastitis in dairy cows in the highlands of Boyacá (Colombia). *Rev. Med. Vet. Zoot.* **2019**, *66*, 208–218. [\[CrossRef\]](#)
- Yeo, S.G.; Choi, W.P. Studies on the Yeast-Like Fungi Associated with Bovine Mastitis 1. Epidemiological Study. *Korean J. Vet. Res.* **1982**, *22*, 121–138.
- Moravkova, M.; Huvarova, V.; Vlkova, H.; Kostovova, I.; Bacova, R. Raw bovine milk as a reservoir of yeast with virulence factors and decreased susceptibility to antifungal agents. *Med. Mycol.* **2021**, *59*, 1032–1040. [\[CrossRef\]](#)
- Ranjan, R.; Swarup, D.; Patra, R.C.; Nandi, D. Bovine protothecal mastitis: A review. *CAB Rev.* **2006**. [\[CrossRef\]](#)
- Bakr, E.M.; El-Tawab, A.E.K.M.A.; Elshemey, T.M.; Abd-Elrhman, A.H. Diagnostic and therapeutic studies on mycotic mastitis in cattle. *Alex. J. Vet. Sci.* **2015**, *46*, 138–145. [\[CrossRef\]](#)
- Ghodasara, S.N.; Gajbhiye, P.U. Clinical bovine fungal mastitis in organized dairy farm. *Mol. Microbiol. Res.* **2015**, *5*, 1–3. [\[CrossRef\]](#)
- Asfour, H.A.E.; Eid, R.H.; El-Wakeel, S.A.; Behour, T.S.; Darwish, S.F. Phenotypic and genotypic investigation of yeast species associated with bovine subclinical mastitis with a special reference to their virulence characteristics. *Int. J. Vet. Sci.* **2022**, *11*, 49–58. [\[CrossRef\]](#)
- Zhang, X.F.; Liu, Z.G.; Shen, W.; Gurunathan, S. Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1534. [\[CrossRef\]](#)
- Wierzbicki, M.; Kot, M.; Lange, A.; Kalińska, A.; Gołębiewski, M.; Jaworski, S. Evaluation of the antimicrobial, cytotoxic, and physical properties of selected nano-complexes in bovine udder inflammatory pathogen control. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2024**, *17*, 77–94. [\[CrossRef\]](#)
- Kim, K.J.; Sung, W.S.; Moon, S.K.; Choi, J.S.; Kim, J.G.; Lee, D.G. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *18*, 1482–1484. [\[PubMed\]](#)
- Khezerlou, A.; Alizadeh-Sani, M.; Azizi-Lalabadi, M.; Ehsani, A. Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites, and viruses. *Microb. Pathog.* **2018**, *123*, 505–526. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Yehia, R.S.; Ali, A.M. Biosynthesis and characterization of iron nanoparticles produced by *Thymus vulgaris* L. and their antimicrobial activity. *Acta Bot. Croat.* **2020**, *79*, 114–120. [\[CrossRef\]](#)
- Osama, E.; El-Sheikh, S.M.; Khairy, M.H.; Galal, A.A. Nanoparticles and their potential applications in veterinary medicine. *J. Adv. Vet. Res.* **2020**, *10*, 268–273.
- Fan, X.; Yahia, L.; Sacher, E. Antimicrobial properties of the Ag, Cu nanoparticle system. *Biology* **2021**, *10*, 137. [\[CrossRef\]](#)
- Bhordia, A.; Kumar, A.; Upadhyay, S. First report of a yeast pathogen *Diutina rugosa* (syn. *Candida rugosa*) in an outbreak of mastitis in Holstein Friesian dairy herd in India. *J. Microbiol. Exp.* **2023**, *11*, 43–44. [\[CrossRef\]](#)
- Paredes, K.; Sutton, D.A.; Cano, J.; Fothergill, A.W.; Lawhon, S.D.; Zhang, S.; Watkins, J.P.; Guarro, J. Molecular identification and antifungal susceptibility testing of clinical isolates of the *Candida rugosa* species complex and proposal of the new species *Candida neorugosa*. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 2397–2403. [\[CrossRef\]](#)
- Stavrou, A.A.; Pérez-Hansen, A.; Lackner, M.; Lass-Flörl, C.; Boekhout, T. Elevated minimum inhibitory concentrations to antifungal drugs prevail in 14 rare species of candidemia-causing Saccharomycotina yeasts. *Med. Mycol.* **2020**, *58*, 987–995. [\[CrossRef\]](#)
- Al-abedi, H.F.; Khalil, I.I. Molecular detection of virulence factor genes in *Candida parapsilosis* isolated from subclinical mastitis goats and antifungal susceptibility in Mosul Province. *Egypt. J. Vet. Sci.* **2025**, *56*, 185–193. [\[CrossRef\]](#)
- Hasanin, M.S.; Emam, M.; Soliman, M.M.; Latif, R.R.; Salem, M.M.; El Raey, M.A.; Eisa, W.H. Green silver nanoparticles based on *Lavandula coronopifolia* aerial parts extract against mycotic mastitis in cattle. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2022**, *42*, 102350. [\[CrossRef\]](#)
- Ludwig, A.; de Jesus, F.P.K.; Dutra, V.; Cândido, S.L.; Alves, S.H.; Santurio, J.M. Susceptibility profile of *Candida rugosa* (*Diutina rugosa*) against antifungals and compounds of essential oils. *J. Mycol. Med.* **2019**, *29*, 154–157. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Montoya, A.M.; Luna-Rodríguez, C.E.; Gracia-Robles, G.; Rojas, O.C.; Treviño-Rangel, R.J.; González, G.M. In vitro virulence determinants, comparative pathogenicity of *Diutina* (*Candida*) *mesorugosa* clinical isolates and literature review of the *D. rugosa* complex. *Mycologia* **2019**, *111*, 395–407. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sukumar, K. Antifungal sensitivity against fungal isolates from bovine mastitis. *Indian J. Vet. Sci. Biotechnol.* **2012**, *8*, 14–15.
- Chen, L.Q.; Fang, L.; Ling, J.; Ding, C.Z.; Kang, B.; Huang, C.Z. Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: Size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, *28*, 501–509. [\[CrossRef\]](#)
- Kim, M.J.; Shin, S. Toxic effects of silver nanoparticles and nanowires on erythrocyte rheology. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *67*, 80–86. [\[CrossRef\]](#)

26. Michalec, S.; Nieckarz, W.; Klimek, W.; Lange, A.; Matuszewski, A.; Piotrowska, K.; Sosnowska, M. Green synthesis of silver nanoparticles from *Chlorella vulgaris* aqueous extract and their effect on *Salmonella enterica* and chicken embryo growth. *Molecules* **2025**, *30*, 1521. [[CrossRef](#)]
27. Aseichev, A.V.; Azizova, O.A.; Beckman, E.M.; Skotnikova, O.I.; Dudnik, L.B.; Shcheglovitova, O.N.; Sergienko, V.I. Effects of gold nanoparticles on erythrocyte hemolysis. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2014**, *156*, 495–498. [[CrossRef](#)]
28. Purohit, R.; Vallabani, N.S.; Shukla, R.K.; Kumar, A.; Singh, S. Effect of gold nanoparticle size and surface coating on human red blood cells. *Bioinspir. Biomim. Nanobiomater.* **2016**, *5*, 121–131. [[CrossRef](#)]
29. Kote, J.R.; Kadam, A.S.; Mane, R.S.; Tehare, K.K.; Mulani, R.M. Studies on anti-mycobacterial activity and cytotoxicity, antioxidant of newly synthesized copper nanoparticles from *Artemisia pallens* L. *Bionano Front.* **2015**, *8*, 157–160.
30. Abdulwahab, Y.; Ahmad, A.; Wahid, I.; Taba, P.; Karim, H. Green synthesis of copper nanoparticles mediated from *Coffea arabica* seeds extract. *Rasayan J. Chem.* **2023**, *16*, 1217–1228. [[CrossRef](#)]
31. Radzikowski, D.; Kalińska, A.; Kot, M.; Jaworski, S.; Wierzbicki, M.; Gołębiewski, M. In vitro evaluation of the antimicrobial properties of nanoparticles as new agents used in teat sealants for mastitis prevention in dry cows. *Biomedicines* **2023**, *11*, 2291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lange, A.; Matuszewski, A.; Kutwin, M.; Ostrowska, A.; Jaworski, S. Farnesol and selected nanoparticles (silver, gold, copper, and zinc oxide) as effective agents against biofilms formed by pathogenic microorganisms. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2024**, *17*, 107–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ondrašovičová, S.; Zigo, F.; Farkašová, Z.; Lacková, Z.; Velgosova, O.; Mačák, L.; Rehan, I.F. Green synthesis of silver nanoparticles and their inhibitory effects on resistant udder pathogens. *J. Appl. Anim. Res.* **2025**, *53*, 2462578. [[CrossRef](#)]
34. Shao, K.; Yang, Y.; Gong, X.; Chen, K.; Liao, Z.; Ojha, S.C. Staphylococcal Drug Resistance: Mechanisms, Therapies, and Nanoparticle Interventions. *Infect. Drug Resist.* **2025**, *18*, 1007–1033. [[CrossRef](#)]
35. Długosz, O.; Żebracka, A.; Sochocka, M.; Franz, D.; Ochnik, M.; Chmielowiec-Korzeniowska, A.; Banach, M. Selective and complementary antimicrobial and antiviral activity of silver, copper, and selenium nanoparticle suspensions in deep eutectic solvent. *Environ. Res.* **2025**, *264*, 120351. [[CrossRef](#)]
36. Martín-Perales, A.I.; Peña-Ortiz, M.; Resende, J.A.; Malpartida, I.; Luque, R.; Balu, A.M. Continuous-flow mechanochemical preparation of Ag-Cu@ ZIF-8 bimetallic system for antimicrobial applications. *Results Eng.* **2025**, *25*, 103581. [[CrossRef](#)]
37. Garibo Ruiz, D.; Nefedova, E.; Shkil, N.N.; Shkil, N.A.; Vazquez-Gomez, R.L.; Pestryakov, A.; Bogdanchikova, N. Silver Nanoparticles Targeting the Drug Resistance Problem of *Streptococcus dysgalactiae*: Susceptibility to Antibiotics and Efflux Effect. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6024. [[CrossRef](#)]
38. Ahmad, H.; Venugopal, K.; Bhat, A.H.; Kavitha, K.; Ramanan, A.; Rajagopal, K.; Manikandan, E. Enhanced biosynthesis synthesis of copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) for their antifungal activity toxicity against major phyto-pathogens of apple orchards. *Pharm. Res.* **2020**, *37*, 246. [[CrossRef](#)]
39. Ma, P.; Guo, M.; Li, C.; Zhang, R.; Wang, Z.; Hou, J.; Zheng, K. In-situ TEM investigation of the oxidation mechanism in highly efficient AuCu alloy nanoparticles. *Nano Res.* **2025**, *18*, 94907400. [[CrossRef](#)]
40. Medina, J.C.; Garcia-Perez, V.I.; Zanella, R. Metallic composites based on Ag, Cu, Au and Ag-Cu nanoparticles with distinctive bactericidal effect on varied species. *Mater. Today Commun.* **2021**, *26*, 102182. [[CrossRef](#)]
41. Kalińska, A.; Jaworski, S.; Wierzbicki, M.; Kot, M.; Radzikowski, D.; Smulski, S.; Gołębiewski, M. Silver and Copper Nanoparticles as the New Biocidal Agents Used in Pre- and Post-Milking Disinfectants with the Addition of Cosmetic Substrates in Dairy Cows. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Daimari, J.; Basumatary, S.; Deka, A.K. Bimetallic nanoparticles from coinage metals (Cu, Ag, Au) and its biomedical applications: A Review. *Nano-Struct. Nano-Objects* **2024**, *39*, 101247. [[CrossRef](#)]
43. Madkhali, O.A. A comprehensive review on potential applications of metallic nanoparticles as antifungal therapies to combat human fungal diseases. *Saudi Pharm. J.* **2023**, *31*, 101733. [[CrossRef](#)]
44. Chlumsky, O.; Purkrtova, S.; Michova, H.; Sykorova, H.; Slepicka, P.; Fajstavr, D.; Demnerova, K. Antimicrobial properties of palladium and platinum nanoparticles: A new tool for combating food-borne pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7892. [[CrossRef](#)]
45. Clayton, K.N.; Salameh, J.W.; Wereley, S.T.; Kinzer-Ursem, T.L. Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics* **2016**, *10*, 054107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
46. Németh, Z.; Csóka, I.; Semnani Jazani, R.; Sipos, B.; Haspel, H.; Kozma, G.; Kónya, Z.; Dobó, D.G. Quality by Design-Driven Zeta Potential Optimisation Study of Liposomes with Charge Imparting Membrane Additives. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1798. [[CrossRef](#)]
47. Cruz-Luna, A.R.; Cruz-Martínez, H.; Vásquez-López, A.; Medina, D.I. Metal Nanoparticles as Novel Antifungal Agents for Sustainable Agriculture: Current Advances and Future Directions. *J. Fungi* **2021**, *7*, 1033. [[CrossRef](#)]
48. Parveen, J.; Sultana, T.; Kazmi, A.; Malik, K.; Ullah, A.; Ali, A.; Rehman, S.U. Phytosynthesized nanoparticles as novel antifungal agent for sustainable agriculture: A mechanistic approach, current advances, and future directions. *J. Nanotechnol.* **2023**, *2023*, 8011189. [[CrossRef](#)]

49. Wahab, S.; Salman, A.; Khan, Z.; Khan, S.; Krishnaraj, C.; Yun, S.-I. Metallic Nanoparticles: A Promising Arsenal against Antimicrobial Resistance—Unraveling Mechanisms and Enhancing Medication Efficacy. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 14897. [[CrossRef](#)]
50. Nasiłowska, B.; Skrzeczanowski, W.; Bombalska, A.; Bogdanowicz, Z. Laser Emission Spectroscopy of Graphene Oxide Deposited on 316 Steel and Ti6Al4V Titanium Alloy Suitable for Orthopedics. *Materials* **2023**, *16*, 2574. [[CrossRef](#)]
51. Zielińska-Górska, M.; Sosnowska-Ławnicka, M.; Jaworski, S.; Lange, A.; Daniluk, K.; Nasiłowska, B.; Sawosz, E. Silver nanoparticles and graphene oxide complex as an anti-Inflammatory biocompatible liquid nano-dressing for skin infected with *Staphylococcus aureus*. *J. Inflamm. Res.* **2023**, *2023*, 5477–5493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Mgr inż. Magdalena Kot
Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
magdalena_kot@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Agata Lange, Weronika Jabłońska, Aleksandra Kalińska, Barbara Nasiłowska, Wojciech Skrzeczanowski, Marcin Gołębiewski. Nanoparticles as New Antifungals in the Prevention of Bovine Mycotic *Mastitis* Caused by *Candida* spp. and *Diutina* spp.—*In Vitro* Studies. *Molecules* 2025, 30, 2086

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji i metodologii doświadczenia, prowadzeniu badań, analizie, interpretacji i walidacji danych, przygotowaniu i krytycznej weryfikacji manuskryptu, prowadzeniu procesu recenzyjnego, redakcji i korekcji manuskryptu, co wynosi 78 % pracy.

Magdalena Kot
podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Dr inż. Agata Lange
Katedra Nanobiotechnologii
Instytut Biologii
agata_langel@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Agata Lange, Weronika Jabłońska, Aleksandra Kalińska, Barbara Nasiłowska, Wojciech Skrzeczanowski, Marcin Gołębiewski. Nanoparticles as New Antifungals in the Prevention of Bovine Mycotic *Mastitis* Caused by *Candida* spp. and *Diutina* spp.—*In Vitro* Studies. *Molecules* 2025, 30, 2086

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na prowadzeniu badań, co wynosi 3 % pracy.

Agata Lange
podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Mgr inż. Weronika Jabłońska

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytet Śląski w Katowicach

weronika.jablonska@us.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Agata Lange, Weronika Jabłońska, Aleksandra Kalińska, Barbara Nasiłowska, Wojciech Skrzeczanowski, Marcin Gołębiewski. Nanoparticles as New Antifungals in the Prevention of Bovine Mycotic *Mastitis* Caused by *Candida* spp. and *Diutina* spp.—*In Vitro* Studies. *Molecules* 2025, 30, 2086

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu badań oraz przygotowanie manuskryptu, co wynosi 5 % pracy.

jabłońska

podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Dr inż. Aleksandra Kalińska
Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
aleksandra_kalinska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Agata Lange, Weronika Jabłońska, Aleksandra Kalińska, Barbara Nasiłowska, Wojciech Skrzeczanowski, Marcin Gołębiewski. Nanoparticles as New Antifungals in the Prevention of Bovine Mycotic *Mastitis* Caused by *Candida* spp. and *Diutina* spp.—*In Vitro* Studies. *Molecules* 2025, 30, 2086

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na prowadzeniu nadzoru merytorycznego, co wynosi 3 % pracy.

podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Dr inż. hab. Barbara Nasiłowska, prof. WAT

Centrum Inżynierii Biomedycznej

Instytut Optoelektroniki

Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego

barbara.nasilowska@wat.edu.pl

Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Agata Lange, Weronika Jabłońska, Aleksandra Kalińska, Barbara Nasiłowska, Wojciech Skrzeczanowski, Marcin Gołębiewski. Nanoparticles as New Antifungals in the Prevention of Bovine Mycotic *Mastitis* Caused by *Candida* spp. and *Diutina* spp.—*In Vitro* Studies. *Molecules* 2025, 30, 2086

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na prowadzeniu badań, co wynosi 3% pracy.



podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Dr inż. Wojciech Skrzeczanowski

Instytut Optoelektroniki

Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego

wojciech.skrzeczanowski@wat.edu.pl

Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego

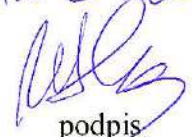
w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Agata Lange, Weronika Jabłońska, Aleksandra Kalińska, Barbara Nasiłowska, Wojciech Skrzeczanowski, Marcin Gołębiowski. Nanoparticles as New Antifungals in the Prevention of Bovine Mycotic *Mastitis* Caused by *Candida* spp. and *Diutina* spp.—*In Vitro* Studies. *Molecules* 2025, 30, 2086

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na prowadzeniu badań, co wynosi 3% pracy.

Wojciech Skrzeczanowski

podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Prof. dr hab. Marcin Gołębiewski
Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
marcin_golebiewski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Agata Lange, Weronika Jabłońska, Aleksandra Kalińska, Barbara Nasiłowska, Wojciech Skrzeczanowski, Marcin Gołębiewski. Nanoparticles as New Antifungals in the Prevention of Bovine Mycotic *Mastitis* Caused by *Candida* spp. and *Diutina* spp.—*In Vitro* Studies. *Molecules* 2025, 30, 2086

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz pozyskanie funduszy, co stanowi 5 % pracy.



podpis

Article

Nanomaterials in the Management of Fungal Udder Inflammation in Cattle as an Effective Preventive Strategy Based on In Vitro Studies

Magdalena Kot ^{1,*} , Weronika Magdalena Jabłońska ² , Agata Lange ³ , Aleksandra Kalińska ¹ 
and Marcin Gołębiowski ¹ 

¹ Animal Breeding and Nutrition Department, Warsaw University of Life Sciences, 02-786 Warsaw, Poland; aleksandra_kalinska@sggw.edu.pl (A.K.); marcin_golebiowski@sggw.edu.pl (M.G.)

² Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Faculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice, Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, Poland; weronika.jablonska@us.edu.pl

³ Department of Nanobiotechnology, Warsaw University of Life Sciences, 02-786 Warsaw, Poland; agata_lange1@sggw.edu.pl

* Correspondence: magdalena_kot@sggw.edu.pl

Simple Summary

The incidence of fungal udder inflammation is increasing, negatively affecting the welfare of dairy cattle and reducing milk production. This disease is often associated with the intensive use of antibiotics, whereas effective methods of controlling fungal infections remain limited. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of nanoparticles against fungi responsible for udder inflammation. The activity of several types of metal nanoparticles and their complexes against isolated fungal strains was evaluated. The results showed that most of the tested nanoparticles effectively inhibited fungal growth even at low concentrations. Importantly, some strains resistant to standard antifungal drugs remained sensitive to nanoparticles. The most effective combinations reduced fungal survival by up to 90%. The results indicate that nanomaterials may be a valuable tool in the future for preventing and supporting the treatment of fungal *mastitis*, reducing losses in livestock farming and the excessive use of traditional drugs.

Abstract

Fungal *mastitis* is rare but poses a significant problem for dairy farmers. It is often underestimated and under-researched, with most studies and treatments focusing on bacterial infections. Antibiotics are ineffective against fungi, and they exacerbate fungal *mastitis*. This study aimed to determine the antifungal properties of silver (Ag), gold (Au), copper (Cu), iron with a hydrophilic carbon coating (FeC), and platinum (Pt) nanoparticles (NPs) at five different concentrations, as well as their complexes, on the survival of fungal strains such as *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamiella pararugosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cutaneotrichosporon mucoides*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Coniochaeta hoffmannii*, and *Kluyveromyces marxianus*. The strains' susceptibility to 8 standard antifungals, along with MIC (minimal inhibitory concentration) and MFC (minimal fungicidal concentration) after NP treatment, was assessed. Clotrimazole and ketoconazole (10 µg) were most effective, while fluconazole (10 µg) and flucytosine (1 µg) showed the weakest activity. The AgCuNP complex demonstrated the strongest biocidal activity against all isolated strains, while FeCNPs and PtNPs showed very weak or no biocidal properties. The study's results provide a basis for further in vivo research, indicating the great potential of nanoparticles in combating fungal *mastitis*, providing an innovative solution against infections caused by drug-resistant pathogens.



Academic Editors: Juan Carlos Gutiérrez and Wuyang Huang

Received: 22 January 2026

Revised: 27 February 2026

Accepted: 28 February 2026

Published: 3 March 2026

Copyright: © 2026 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and

conditions of the [Creative Commons Attribution \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

Keywords: nanoparticles; mycotic mastitis; fungi; fungal infections; antifungal agents; dairy cattle

1. Introduction

Mastitis is mainly caused by bacteria of various origins. It is the main etiological agent with which *mastitis* is mainly associated. The bacteria's distribution and frequency of occurrence depend on many factors, including the country's climate, type of housing system, the feed's nutritional level, whether milking hygiene is used and properly maintained, and overall animal health [1], age, breed, and milk yield [2]. Therefore, the distribution varies significantly; however, it is possible to introduce a categorization by which pathogens isolated from the diseased udder can be classified. There are two categories, environmental and contagious pathogens, based on bacterial origin. Environmental pathogens are present in the immediate environment in which the animal resides and include *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. [3], *Serratia* spp., *Streptococcus equinus*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium* [4]. Meanwhile, infectious pathogens, i.e., those that colonize the cow's udder or teats, include *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis*, and *Corynebacterium bovis* [5]. Another division allows *mastitis* to be classified into three further forms: clinical, subclinical, and chronic. The main determinant that classifies the stage of *mastitis* is the somatic cell count (SCC) in the milk. It is estimated that an SCC of more than 200,000 in 1 mL is evidence of the subclinical form, while a value exceeding 400,000 indicates the clinical form. The chronic form is indicated when *mastitis* recurs with high frequency and when SCC levels remain consistently high, but there is no increase in the number of pathogens. A diagnosis of *mastitis* is also possible by visually assessing the health of the udder and the organoleptic quality. In the case of clinical *mastitis*, the cow's udder can be red, there is visible swelling, and there may be changes in the appearance of the milk, such as a change in color or structural changes and the presence of lumps. Subclinical inflammation is more challenging to diagnose visually because it is not characterized by any external symptoms. Therefore, a *mastitis* diagnosis should be based mainly on an evaluation of SCC levels and an examination of the microbiological quality of the milk. However, it is estimated that subclinical conditions in the herd are far more common than clinical ones, but their detection is decisively lower.

The second etiological factor that leads to *mastitis* is fungi. Fungal strains are classified as environmental pathogens found in the animal's direct environment. The literature reports that they are isolated, e.g., from bedding, floors, dirty milking equipment, and from the hands of personnel [6]. The literature reports many different species isolated from diseased udders, including those of the *Cryptococcus* genus: *C. neoformans*, *C. albidus*, *C. flavus*, *C. laurentii*, and *C. luteolus*; of the *Rhodotorula* genus: *R. glutinis*, *R. minuta*, and *R. rubra*; and of the *Trichosporon* genus: *T. cutaneum* [7]; as well as *Aspergillus amstelodami*, *Aspergillus fumigatus*, *Geotrichum candidum*, and *Saccharomyces* spp. (e.g., *S. fragilis*) [8]. Various yeast species are commonly isolated, with *Candida* spp. being the most frequently identified species in milk from cows diagnosed with *mastitis* [9]. In the literature, as well as in the diagnostic field, the main focus is often on the specific species, which can be limiting in terms of a full, comprehensive diagnosis and understanding of the entire spectrum of pathogens that can contribute to the development of *mastitis*. This approach is due to the fact that in different parts of the world, these particular species are the most commonly isolated. It is estimated that the most common isolates include strains such as *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. albicans*, and *C. parapsilosis* [6]. These are the strains on which

further testing and analysis are most often carried out to study their mechanisms of activity. Unfortunately, this approach leads to the neglect of other pathogens that, although less common, can also cause infections that are more difficult to treat.

Fungal *mastitis* in dairy cows is often underdiagnosed and undertreated because routine diagnostics and research tend to focus primarily on bacterial infections. Infections caused by yeasts can occur in subclinical, chronic, or acute forms, and their under-recognition may result in subtle clinical signs or misinterpretation as bacterial *mastitis*. Consequently, these infections may persist unnoticed, leading to chronic udder inflammation, reduced milk yield, and challenges in herd management. Highlighting fungal *mastitis* is therefore essential for comprehensive diagnosis and for developing effective preventive and therapeutic strategies [10].

The next rare etiological agent is an algae of the genus *Prototheca*. Although cases of infection caused by this pathogen are relatively rare, they should not be underestimated. Protothecal *mastitis* poses a serious therapeutic challenge, mainly due to the high resistance of this microorganism to available antimicrobials [11].

In the treatment of *mastitis*, which is most often caused by bacteria, the predominant method of treatment is antibiotic therapy. Unfortunately, the use of antibiotics leads to an imbalance of the bacterial microflora, including the elimination of protective bacteria that shield the organism from infection. As a result, fungi multiply, increasing the problem of *mastitis* and making it more difficult to treat effectively. It is also worth noting that, in the context of global antibiotic resistance, antibiotics have become less effective in the treatment of *mastitis*. Their use may not only be ineffective but also contribute to the intensification of the fungal *mastitis* problem [12].

An increase in the incidence of fungal infections most often occurs in late winter and early spring, when there are high humidity and high temperatures [13]. It is estimated that, of all cases of *mastitis*, the incidence of fungal *mastitis* is about 1–12% [14]. However, there are also reported cases where fungal *mastitis* occurred in 22% of cases [15]. This value varies depending on the country, prevailing weather conditions, maintenance of milking hygiene, and conditions in the barns. For this reason, there are also differences in the composition of fungal strains. In order to reduce rates of *mastitis*, it is necessary to maintain hygiene levels in the immediate environment in which the animals are located, as well as the hygiene of the teats. This includes litter hygiene and the general cleanliness of the housing, as well as maintaining milking hygiene practices: disinfection of the teats, disinfection and proper use of milking apparatuses, protection of the teats after milking, and general maintenance of the udder's health [2].

Mastitis is a global problem, and despite constant developments in livestock production, there is still a lack of effective alternatives for the prevention and treatment of this disease, which reduces animal welfare and exposes dairy producers to financial losses [16]. Resistance of pathogens to antimicrobial agents is increasing and is a major problem in the treatment of basic infections in not just animals, but also in humans to whom resistant pathogens spread. It is now a global problem that scientists worldwide are working to solve. With antibiotic-associated problems and the difficulty in treating fungal diseases, metal nanoparticles (NPs) are being discussed in the context of substances that have biocidal potential. They have many properties (antibacterial, antifungal, antiviral) [17]; however, one of the most useful properties, in terms of their biocidal activity, is their high affinity for pathogenic cells. Metal NPs can disrupt microbial cells by inducing reactive oxygen species (ROS) production. Elevated ROS levels damage cellular components, particularly lipids in the cell membrane, leading to loss of membrane integrity, increased permeability, and ultimately cell death. Assessment of membrane integrity is therefore an important measure

of the fungicidal effect of NPs, as it reflects both direct physical interactions of NPs with the membrane and oxidative damage caused by ROS [18].

Most research studies have focused on combating bacterial *mastitis*, while fungal *mastitis*—particularly cases caused by rarely isolated and poorly characterized fungal strains—remains largely neglected. This represents a significant knowledge gap, as these rare pathogens, like bacterial ones, pose a threat to animal health and may have implications for human health. Moreover, there is limited research on effective antifungal strategies for these uncommon strains. Recently, the biocidal properties of nanoparticles, especially metal nanoparticles, have gained attention, offering a promising avenue to address this unmet need in antifungal therapy. The above-mentioned issues constitute a research problem that necessitated further investigation. Nanoparticles hold considerable promise for further investigation, particularly in the context of in vivo testing. However, in order to confirm their high biocidal potential, it was necessary to conduct tests.

Therefore, the primary objective of this study was to determine the effect of silver (Ag-NPs), gold (AuNPs), copper (CuNPs), platinum (PtNPs), iron with hydrophilic carbon coating (FeCNPs), and their combinations (AgCuNPs, AgAuNPs, AuCuNPs) on the survival of seven fungal strains isolated from bovine *mastitis*, including *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamiella pararugosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cutaneotrichosporon mucoides*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Coniochaeta hoffmannii*, and *Kluyveromyces marxianus*. These fungal species are rarely isolated in routine diagnostics, partly due to their low prevalence; however, they are clinically relevant, as they have been associated with bovine *mastitis*. Therefore, further research focusing on these rarely isolated pathogens is necessary to better understand their role in the disease and to improve diagnostic and therapeutic strategies. The concentrations of nanoparticles tested were 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, and 25 mg/L, and for PtNPs 0.625, 1.25, 2.5, 5, and 10 mg/L. The concentrations of the nanoparticles were selected based on ranges commonly reported in the literature to allow meaningful comparison with previous studies.

The secondary objectives were to determine MIC (minimal inhibitory concentration) and MFC (minimal fungicidal concentration) after application of NPs. The study also tested the effect of common standard mycotic agents—flucytosine (1 g/L), econazole, ketoconazole, clotrimazole, fluconazole (10 g/L), amphotericin B (20 g/L), fluconazole (25 g/L), and nystatin (100 g/L) on the survival of isolated strains—in order to assess the biocidal potential of NPs. These findings provide a strong foundation for future in vivo studies to evaluate the clinical applicability of these nanoparticles in treating bovine mycotic *mastitis*.

2. Materials and Methods

2.1. Biological Material

For the study, quarter milk was collected from Polish Holstein–Friesian cows with diagnosed subclinical *mastitis* (above 200,000/mL somatic cell count in a particular teat). Cows were kept at the Wilanów-Obory Agricultural Experimental Station in Poland (Mazowieckie county), which is an integral part of the Warsaw University of Life Sciences. The animals included in the study come from a dairy farm where routine breeding practices are carried out as an inherent part of the production cycle. To maintain lactation, reproduction is conducted, and calves are a natural part of this process. Some of the female calves remain on the farm as breeding stock used to replenish the herd. Therefore, the animals used in the study are an integral part of the farm's resident population and were not sourced externally specifically for the purposes of the experiment. Samples were taken in the spring. The milk was collected during evening milking when the milking apparatus detached from the cow's teats. Then, before the milk sample was taken, the teat was disinfected with 70% ethanol and wiped dry. Milk was collected into sterile tubes, which were then placed into a

portable refrigerator. The samples were transported within 30 min at 5 °C to the Warsaw University of Life Sciences microbiology laboratory.

2.2. Isolation of Fungi Strains and Identification

Immediately after transport to the laboratory, microbiological inoculations were performed. Previously prepared microbiological media dedicated to fungal culture, such as Czapek Dox Modified Agar, Oxytetracycline Yeast Extract Agar Base (Pol-Aura, Warsaw, Poland), Sabouraud Chloramphenicol Agar (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), DG-18 Agar (Graso-biotech, Owidz, Poland), and DRBC Lab-Agar (Biomaxima, Lublin, Poland), were used. The cultures were then incubated at 37 °C for 24–48 h. Fungal colonies that differed morphologically were selected from the performed cultures and then inoculated onto new media. The cultures were then sent to an external laboratory for identification using a MALDI-TOF MS apparatus (Bruker, Poznan, Poland).

2.3. Determination of the Nanoparticles' Morphology

The nanoparticles used in the experiment were purchased from Nano-tech (Warsaw, Poland), except for the iron nanoparticles, which were purchased from 3D-nano (Krakow, Poland). The manufacturer of the nanoparticles indicates that they were synthesized using physical methods. In the experiment, nanoparticles from different production batches were used: AuNPs (batch no. 40Z/03/2023), CuNPs (batch no. 49M/02/2023), AgNPs (batch no. 160E/10/2025), PtNPs (batch no. 22P/06/2021), and FeCNPs (batch no. 551312). To determine the morphology of the nanoparticles, a mixture of NPs was prepared with distilled water, which was then sonified. After that, this mixture was applied to TEM Formvar on 3 mm 200 mesh Cu grids (Agar Scientific, Stansted, UK). The formvar grids were then allowed to dry, and images were taken with a JEM-2000EX transmission electron microscope (JEOL, Akishima, Tokyo, Japan) with a voltage of 80 keV.

2.4. Determination of the Physicochemical Properties of the Nanoparticles

The experiment, the zeta potential and hydrodynamic size of the nanoparticles were determined using a Zetasizer Nano ZS apparatus (ZEN3500, Malvern Instruments, Malvern, UK). A 10 mg/L mixture of nanoparticles diluted with distilled water was prepared. The zeta potential was measured in four independent measurements ($n = 4$), while the hydrodynamic size distribution was determined by dynamic light scattering (DLS) based on three independent measurements ($n = 3$).

2.5. Determination of Fungal Viability After Treatment with Nanoparticles and Their Complexes

Fungal suspensions were prepared with OD = 1 McF from the isolated strains using NaCl. The prepared suspension was pipetted into 96-well plates in a volume of 50 µL per well. 50 µL of sterile water were added to the wells that constituted the control groups (100% survival rate). To the remaining wells, 50 µL of nanoparticles were added so that the concentrations in the wells were 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, and 25 mg/L for Au, Ag, Cu, and FeC NPs, and 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 mg/L for Pt NPs. The range of nanoparticle concentrations was selected to cover a broad spectrum of potential biological effects and to allow the assessment of dose–response relationships. Each concentration was pipetted in six replicates. The prepared plates were placed at 37 °C for 24 h, and then 20 µL of XTT Cell Proliferation Assay Kit reagent (Merck, Darmstadt, Germany) was added to each well of the control and experimental groups. The plates were incubated again at 37 °C for 24 h. After this time, the survival results were read using spectrophotometric absorbance at a measurement wavelength of 450 nm and a reference wavelength of 690 nm (ELISA Infinite M200 reader, Tecan, Durham, NC, USA).

2.6. Determination of the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimum Fungicidal Concentrations (MFC)

For MIC determination, sterile 24-well plates were used, into which Glucose Chloramphenicol Broth (GCB) liquid medium (Pol-Aura, Warsaw, Poland) was pipetted at 1 mL per well. The nanoparticles were then pipetted using serial dilution. In this way, the final concentrations of nanoparticles in each individual well were the same as for the 96-well plate experiment, i.e., for AgNPs, AuNPs, CuNPs, PtNPs, FeCNPs, AgCuNPs, AgAuNPs, and AuCuNPs: 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 mg/L, while for PtNPs, concentrations of 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 mg/L were used. Then, 10 µL of fungal suspension (OD = 0.5 McF) was added to each well. The positive control was a well containing 1 mL of liquid medium along with 10 µL of the fungal suspension to verify that the medium was sufficient for pathogen growth. On the other hand, the negative control contained only 1 mL of liquid medium to determine the working environment's sterility and assess the risk of contamination of the plate. The plate was then incubated for 24 h at 37 °C. Subsequently, the occurrence of MIC was assessed as the concentration at which the well was free of turbidity at the bottom.

On the day the MIC results were read, an experiment was conducted to determine the MFC by performing inoculations from suspensions contained in the wells of a 24-well plate. The cultures were performed on solid microbiological media. Such cultures were then incubated for 24 h at 37 °C. MFC was the concentration for which no growth occurred on the media.

2.7. Evaluation of the Susceptibility to Antifungal Agents Using the Disk Diffusion Method

On the dedicated fungal culture media mentioned earlier in the methodology, carpet inoculations were performed using 100 µL of fungal suspension OD = 0.5 McF. Disks containing the following antifungal substances were then placed on the Petri dishes: flucytosine (1 g/L), econazole, ketoconazole, clotrimazole, fluconazole (10 g/L), amphotericin B (20 g/L), fluconazole (25 g/L) and nystatin (100 g/L) (MASTDISCAS[®], MAST GROUP, Liverpool, UK). The prepared Petri dishes were incubated for 24 h at 37 °C with the medium lying down. The size of the zone of growth inhibition was then determined.

2.8. Statistical Analysis

The statistical analysis specifically concerned the survival tests of microorganisms after treatment with nanoparticles and their complexes (determination of fungal viability). Data were analyzed using GraphPad Prism 9 software (version 9.2.0, San Diego, CA, USA). Differences between groups were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test for group comparisons. Graphs and visualizations were generated in GraphPad Prism 9. Mean standard deviation is indicated in the figures. The differences at $p \leq 0.05$ were considered statistically significant and are marked with an asterisk on the figures.

3. Results

3.1. Identification of the Isolated Fungi

The results of pathogen identification indicated that the isolated strains were *P. kudriavzevii*, *W. pararugosa*, *S. cerevisiae*, *C. mucoides*, *W. anomalus*, *C. hoffmannii*, *K. marxianus*. Fungal identification results are shown in Table S1.

3.2. The Nanoparticles' Morphology, Physicochemical Properties Analysis of the Nanoparticles: Hydrodynamic Diameter (nm) and Zeta Potential (mV)

The basic physicochemical properties of the tested nanoparticles are presented in Figures 1–3. Figure 1 illustrates the morphology of the NPs, Figure 2 presents their size distribution, and Figure 3 shows the zeta potential.

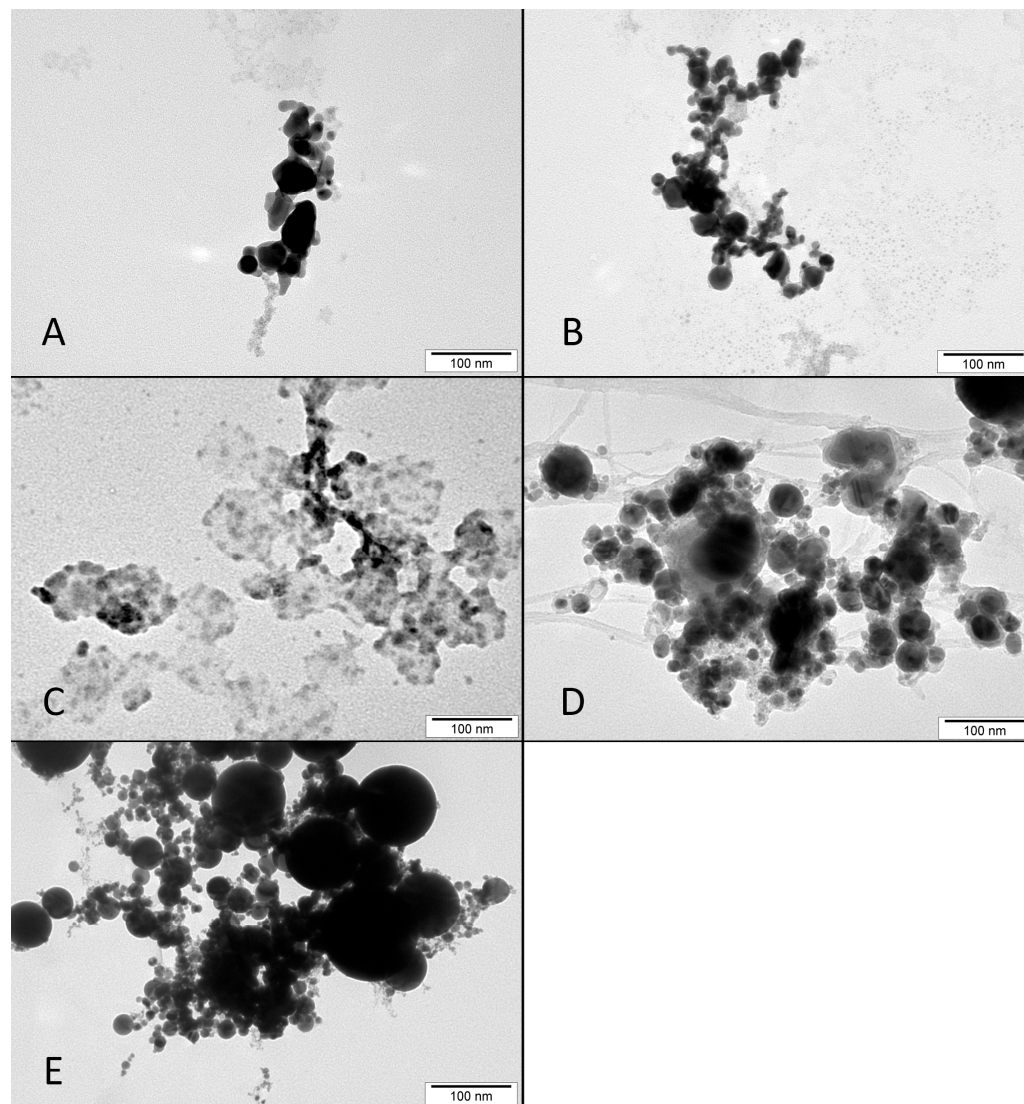


Figure 1. Morphologies of NPs, where (A)—Ag; (B)—Au; (C)—Cu; (D)—FeC; (E)—Pt.

The morphology (Figure 1) of the tested nanoparticles showed the proper shape, which is in accordance with the standard normal characteristics of morphological features. Only in the case of CuNPs (Figure 1C) was a presence of impurities observed, probably related to the nanoparticle production process.

The zeta potential (Figure 2) of the tested NPs differed from each other. The most stable was FeCNPs (Figure 2D), while slightly larger measurement fluctuations were shown by PtNPs (Figure 2E). In contrast, Ag, Au, and CuNPs (Figure 2A–C) showed the largest measurement fluctuations.

As for the size distribution of NPs (Figure 3), differences in the amounts of size fractions were observed. Two size fractions were evident for Ag, FeC, and Pt NPs (Figure 3A,D,E). A single fraction was observed for AuNPs (Figure 3B), while as many as three different size fractions occurred for CuNPs (Figure 3C).

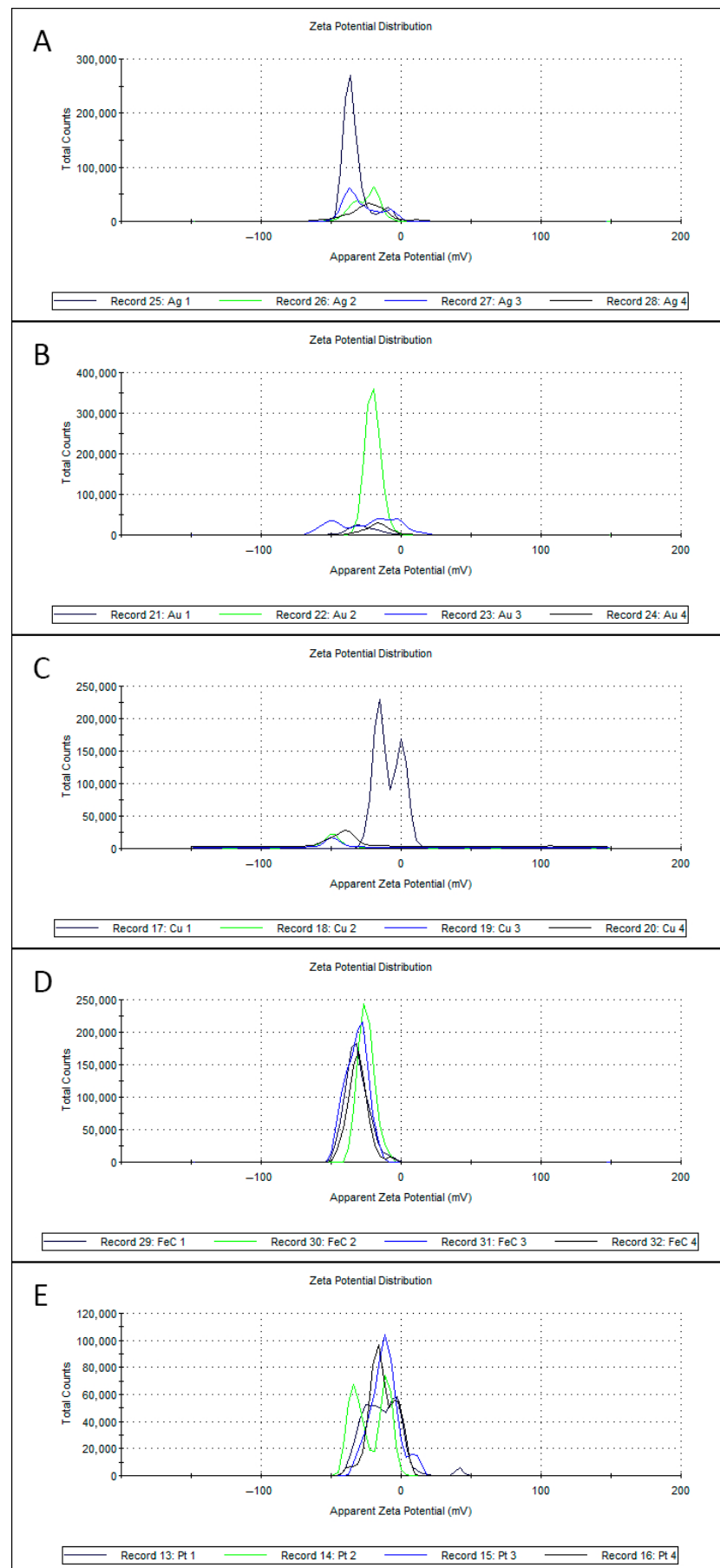


Figure 2. Zeta Potential (mV) of NPs, where: (A)—Ag; (B)—Au; (C)—Cu; (D)—FeC; (E)—Pt.

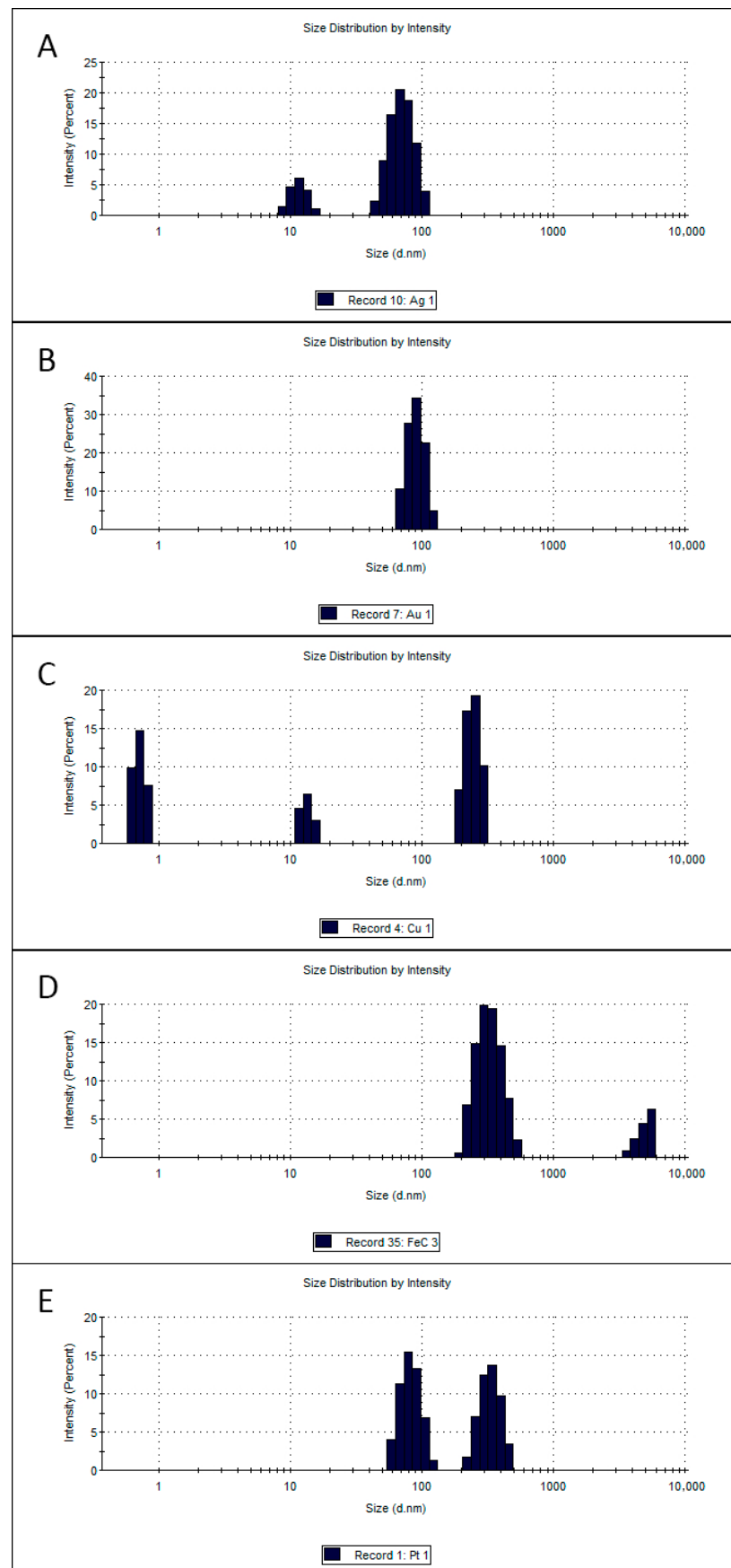


Figure 3. Hydrodynamic Diameter (nm) of NPs, where (A)—Ag, (B)—Au, (C)—Cu, (D)—FeC, (E)—Pt.

3.3. Fungicidal Properties of the Tested Nanoparticles

All tested nanoparticles differed in terms of showing biocidal properties and were dependent on their type and concentrations. The survival rates observed in the experimental groups (i.e., after nanoparticle treatment) were directly compared with the control group, which represented 100% pathogen survival. A synergistic effect of NPs was observed due to which the most fungicidal complex was AgCu NPs, followed by slightly less biocidal properties exhibited by AgAu and CuAu NPs, followed by significantly less biocidal properties exhibited successively (with a decreasing trend of biocidal properties) by NPs of Ag, Cu, Au, FeC, Pt NPs.

In some cases, the survival rates exceed 100%, which may indicate growth-promoting effects at low nanoparticle concentrations. This phenomenon is called hormesis, where a substance exhibits biocidal properties at high concentrations but stimulates microbial defense mechanisms at low concentrations.

Since the nanoparticles were commercially obtained and production methods were unspecified, differences in surface chemistry, coatings, or residual stabilizers may affect the observed antifungal activity.

3.4. Survival Rate of Fungal Strains After Application of AgNPs

As shown in Figure 4, the highest resistance to the applied AgNPs was observed in the case of *S. cerevisiae*, whose survival rate at 25 mg/L reached 119% compared to the control group, and this increase was statistically significant ($p \leq 0.05$). The survival rate at 3.125 mg/L also showed a statistically significant difference compared to the control ($p \leq 0.05$), while for the other concentrations, the survival rate settled around 90–96% with no statistically significant differences ($p > 0.05$). These nanoparticles also showed a weak biocidal effect against *C. hoffmannii*, where, at the highest concentration, the survival rate was 50%, and 35% compared to the control group at the lowest concentration; however, these differences were not statistically significant ($p > 0.05$). In the case of *W. pararugosa*, the survival rate for the applied concentrations of 25 and 1.5 mg/L ranged from 20% to 26%, and these reductions were statistically significant compared to the control group ($p \leq 0.05$). *C. mucoides* and *W. anomalus* were most susceptible to the biocidal effects of these NPs, showing statistically significant reductions in survival rate at all tested concentrations compared to the control group ($p \leq 0.05$).

3.5. Survival Rate of Fungal Strains After Application of AuNPs

Figure 5 illustrates that the applied nanoparticles showed the weakest antifungal properties against *S. cerevisiae*, with a statistically significant decrease in survival compared to the control group only at 6.25 mg/L ($p \leq 0.05$). The survival rate of *K. marxianus* for concentrations of 6.25–25 mg/L decreased to 16–18%, and these reductions were statistically significant for all tested concentrations, while for 3.125–1.56 mg/L, there was a rapid increase in survival rate compared to the control group. A similar trend was observed for *C. hoffmannii*, with an increase from 36% (6.25 mg/L) to 148.8% (3.125 mg/L); all concentrations except 3.125 mg/L were statistically significant ($p \leq 0.05$). The effect of AuNPs on the survival of *C. mucoides* was effective for concentrations of 12.5–25 mg/L (7–9% survival, $p \leq 0.05$), while for a concentration of 6.25 mg/L, there was an increase to 94%, which was not statistically significant ($p > 0.05$) compared to the control group, and further increases at lower concentrations were statistically significant ($p \leq 0.05$). The same was observed for *W. anomalus*, which showed statistically significant reductions at all tested concentrations ($p \leq 0.05$); however, the increase for a concentration of 3.125 mg/L was not as pronounced as with the previously mentioned strains. At concentrations of 6.25–25 mg/L, the survival rate of *W. anomalus* was 10%,

while a concentration of 3.125 mg/L showed a lower biocidal effect, resulting in 54% survival, and the lowest concentration of 1.56 mg/L resulted in an increase to 145%, both statistically significant ($p \leq 0.05$) compared to the control group. In the case of *W. pararugosa*, survival was not statistically significantly different from the control at any concentration ($p > 0.05$). *P. kudriavzevii* survival was 7% across all concentrations; statistically significant reductions were observed at all concentrations except 1.56 mg/L, which was not significant ($p > 0.05$).

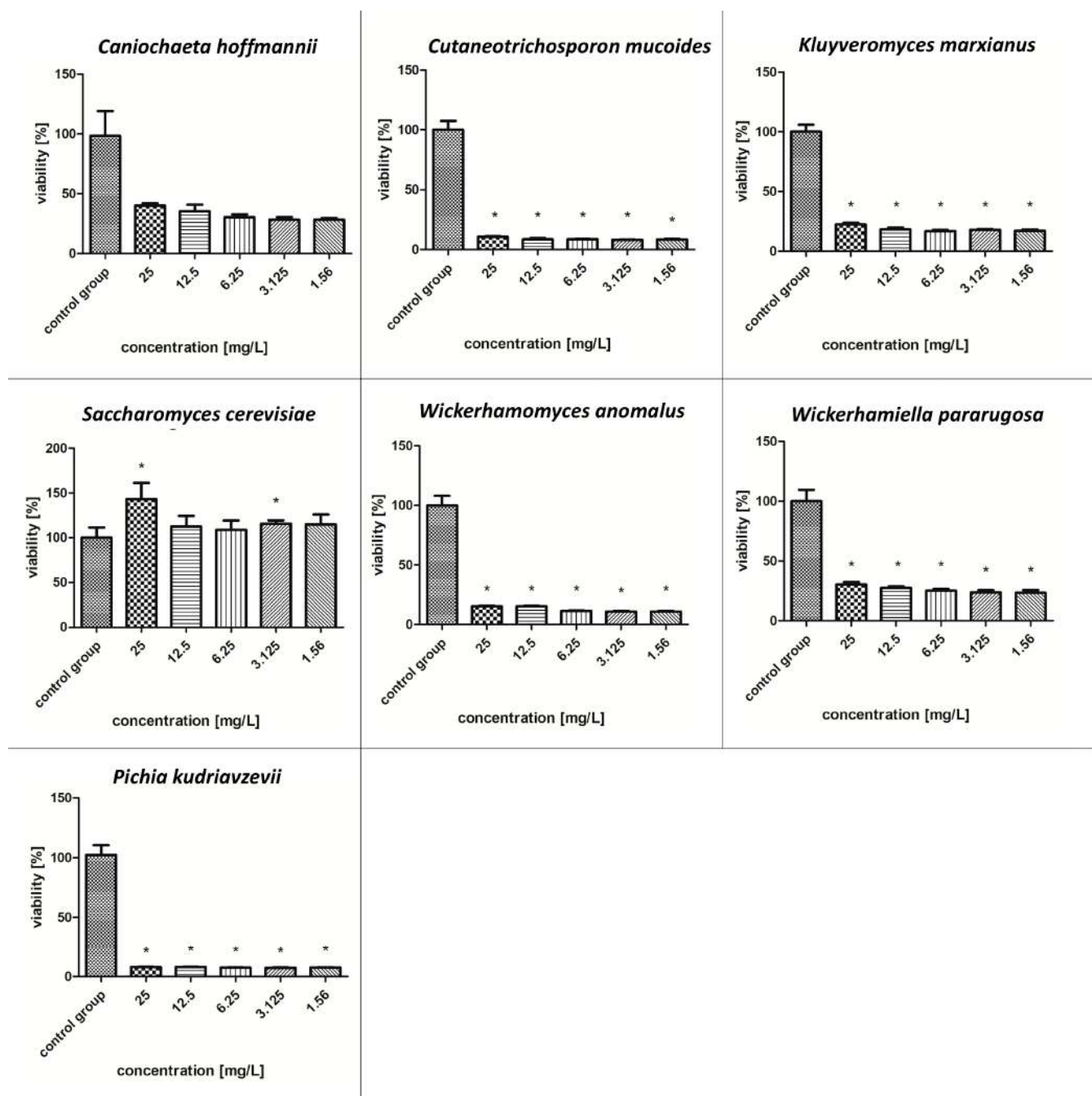


Figure 4. Survival rate of isolated fungal strains after application of silver nanoparticles. Statistically significant differences are marked with an asterisk (p -value ≤ 0.05).

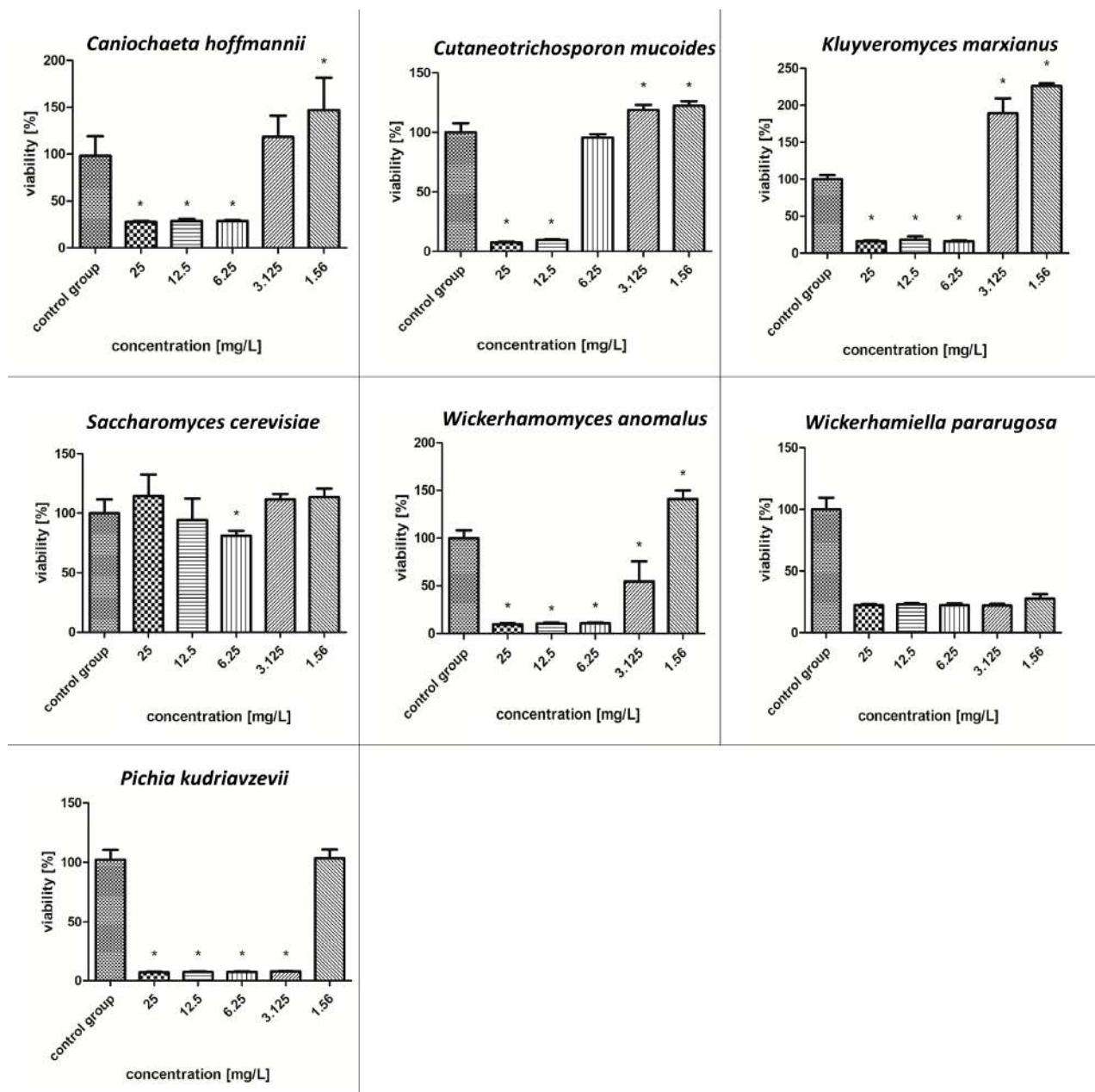


Figure 5. Survival rate of isolated fungal strains after application of AuNPs. Statistically significant differences are marked with an asterisk (p -value ≤ 0.05).

3.6. Survival Rate of Fungal Strains After Application of CuNPs

As presented in Figure 6, *W. pararugosa* was the most susceptible pathogen to CuNPs, with statistically significant reductions in survival at all tested concentrations ($p \leq 0.05$) compared to the control group, where for the highest concentration the survival rate was 5% and 19.5% for the lowest concentration. In the case of *C. mucoides* and *P. kudriavzevii*, high concentrations (12.5 and 25 mg/L) reduced the survival rate to 1–7% compared to the control group, and these reductions were statistically significant ($p \leq 0.05$), while for low concentrations, survival increased; for *C. mucoides* at 3.125 mg/L and for *P. kudriavzevii* at 3.125 mg/L, the differences were not statistically significant ($p > 0.05$). In contrast, the survival rate of *K. marxianus* and *W. anomalus* ranged from 3% to 8% for concentrations of 6.25–25 mg/L, with statistically significant reductions at all tested concentrations ($p \leq 0.05$) compared to the control group. A strain that did not show such low survival rates for high concentrations was *S. cerevisiae*, which showed statistically significant reductions at

all tested concentrations ($p \leq 0.05$); although high concentrations (25–12.5 mg/L) of NPs reduced the survival rate of *P. kudriavzevii* to 2%, the survival rate for low concentrations was 100%.

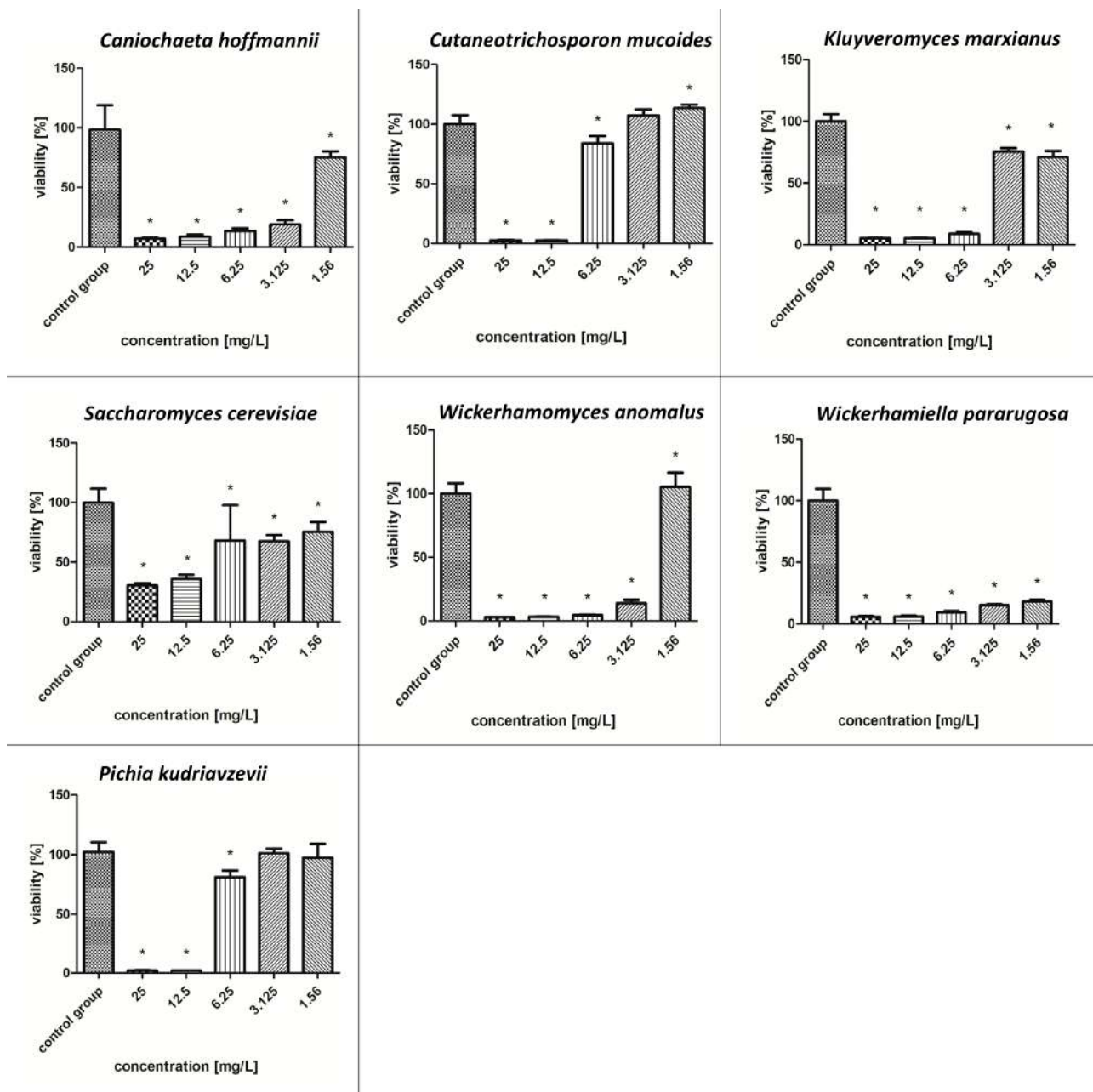


Figure 6. Survival rate of isolated fungal strains after application of CuNPs. Statistically significant differences are marked with an asterisk (p -value ≤ 0.05).

3.7. Survival Rate of Fungal Strains After Application of FeCNPs

The results shown in Figure 7 confirm that only in the case of *P. kudriavzevii* did FeC NPs show notable biocidal activity, with statistically significant reductions in survival at all tested concentrations ($p \leq 0.05$) compared to the control group. *P. kudriavzevii* was susceptible to the highest concentration, with a survival rate of 16%, which then increased with decreasing concentrations, reaching 41% at the lowest concentration. A slightly lower biocidal effect was observed for *W. pararugosa*, with statistically significant reductions at all concentrations ($p \leq 0.05$) compared to the control group; survival at 25 mg/L reached 28%,

while at the lowest concentration, it was 40%. The most resistant pathogens to FeC NPs were *C. hoffmannii*, *C. cerevisiae*, and *C. mucoides*.

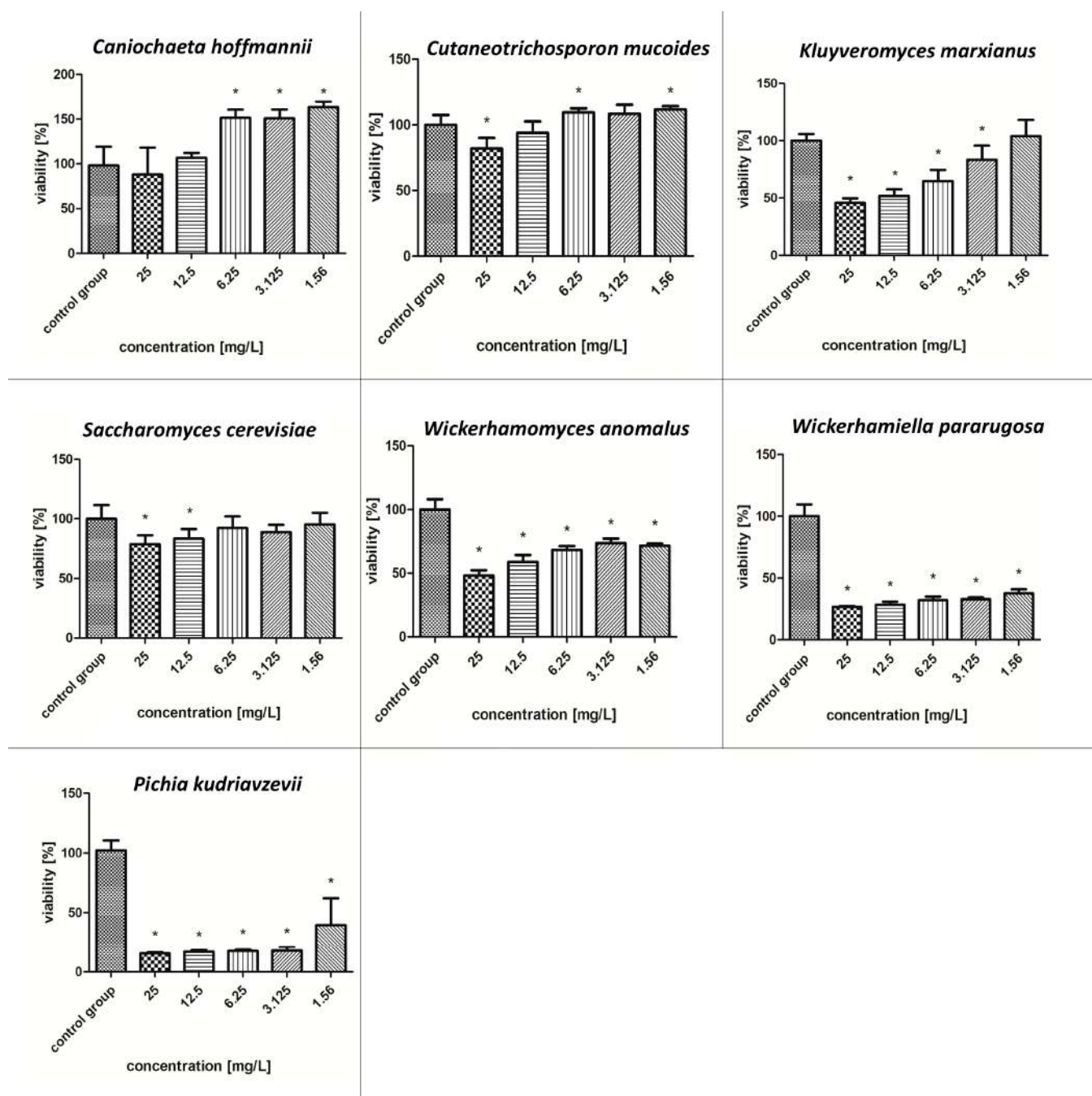


Figure 7. Survival rate of isolated fungal strains after application of FeCNPs. Statistically significant differences are marked with an asterisk (p -value ≤ 0.05).

3.8. Survival Rate of Fungal Strains After Application of PtNPs

As demonstrated in Figure 8, the worst results of all the tested nanoparticles regarding fungicidal activity were observed for PtNPs. Only in the case of *W. pararugosa* was a decrease in survival rate observed, with statistically significant reductions at all tested concentrations ($p \leq 0.05$), up to 49–68% compared to the control group, depending on the concentration of nanoparticles used.

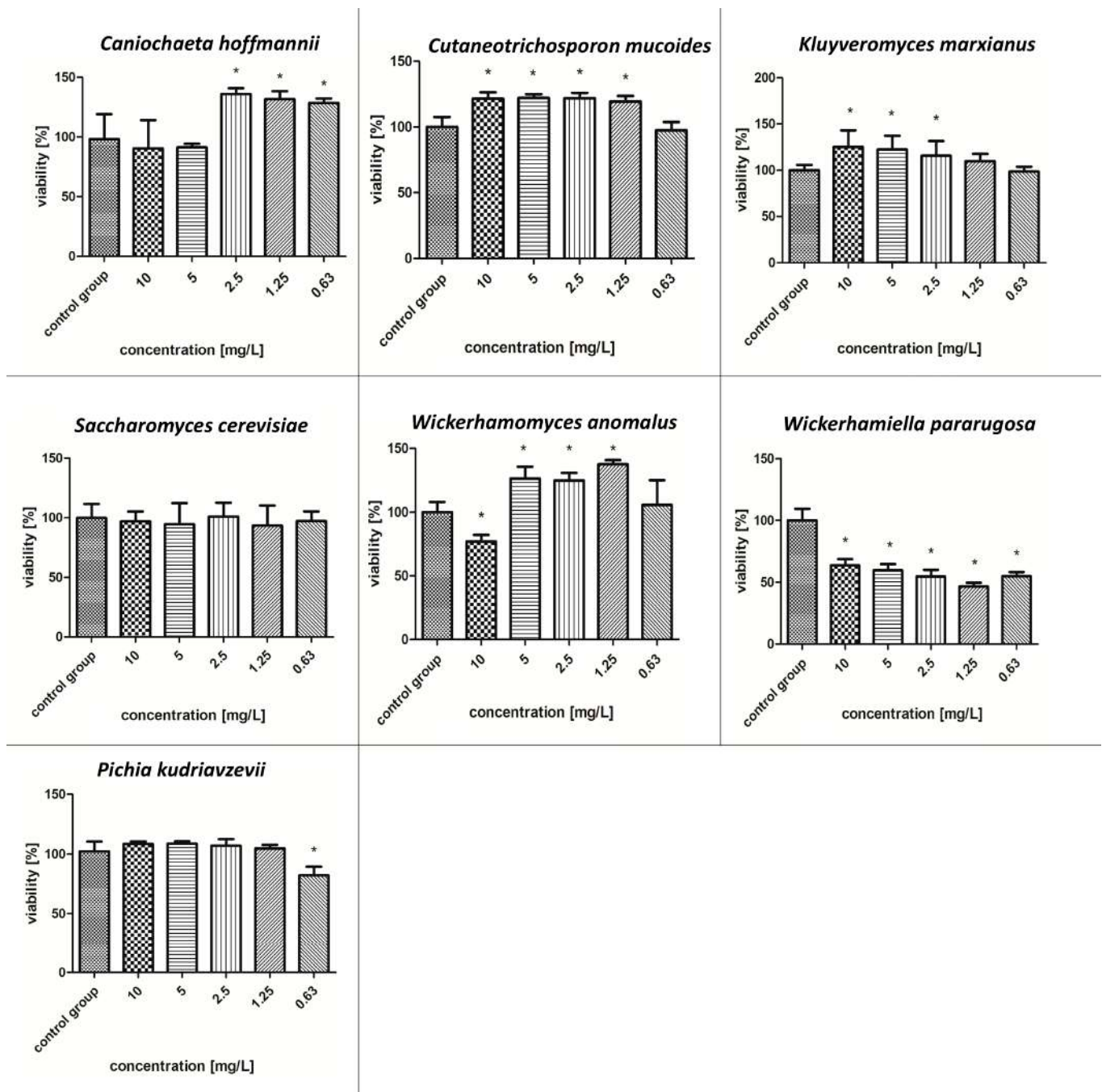


Figure 8. Survival rate of isolated fungal strains after application of PtNPs. Statistically significant differences are marked with an asterisk (p -value ≤ 0.05).

3.9. Survival Rate of Fungal Strains After Application of AgAuNPs

As depicted in Figure 9, *P. kudriavzevii* was the most sensitive to this complex, with statistically significant reductions in survival at all tested concentrations ($p \leq 0.05$), ranging from 5 to 8% compared to the control group. The survival rate of *C. hoffmannii* was 25–35%, depending on the concentration, with statistically significant reductions at all concentrations ($p \leq 0.05$). Slightly lower biocidal activity, but still comparable to *P. kudriavzevii*, was observed for *C. mucoides* and *W. anomalus*, with both showing statistically significant reductions at all concentrations ($p \leq 0.05$) compared to the control group. The most resistant strain to this complex was *S. cerevisiae*, which showed statistically significant

reductions at all concentrations except 1.56 mg/L, where the decrease in survival was not statistically significant ($p > 0.05$).

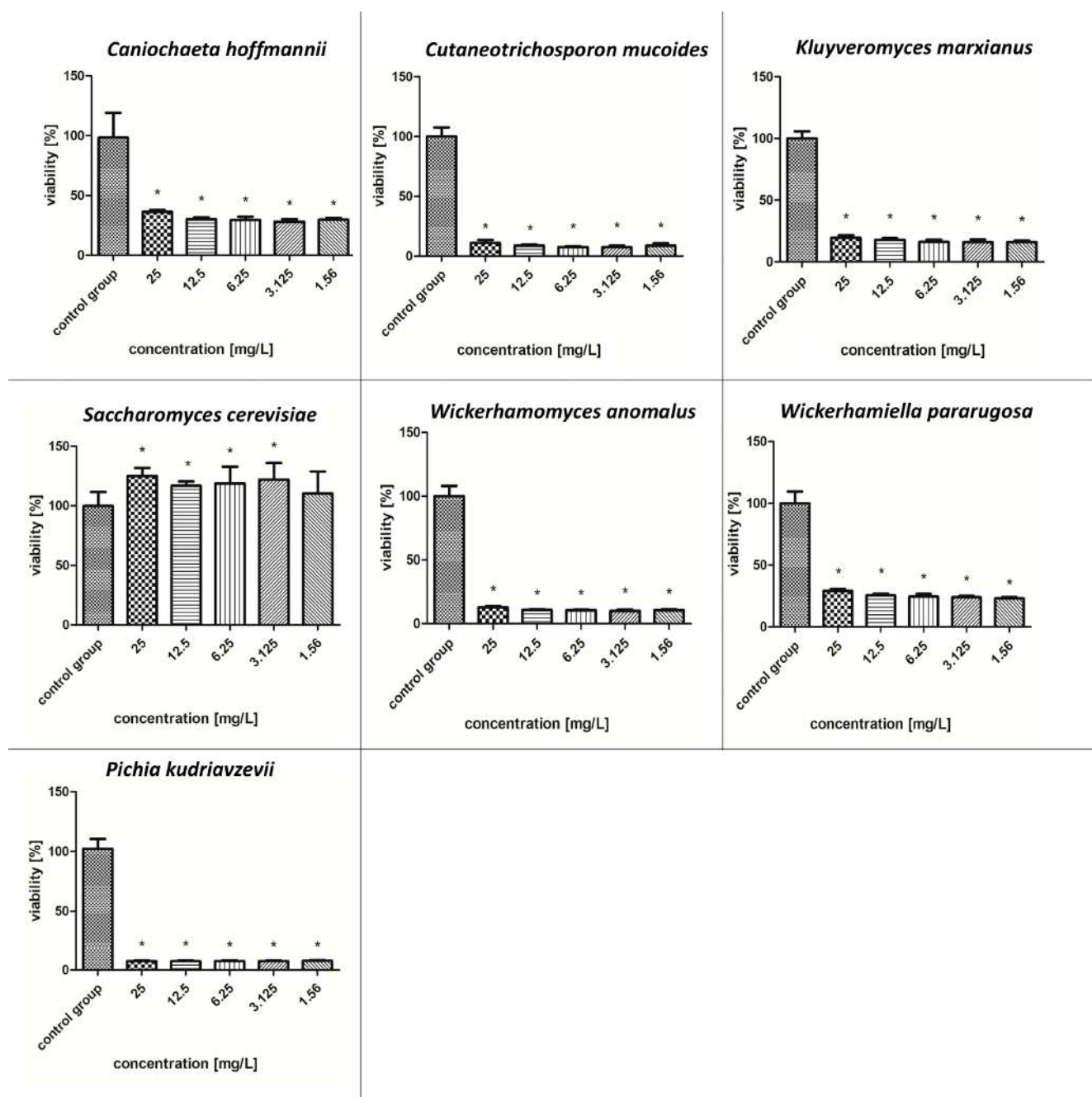


Figure 9. Survival rate of isolated fungal strains after application of AgAuNPs. Statistically significant differences are marked with an asterisk (p -value ≤ 0.05).

3.10. Survival Rate of Fungal Strains After Application of AgCuNPs

As shown in Figure 10, the survival rate of *P. kudriavzevii* at the highest concentration was about 2% compared to the control group, with statistically significant reductions at all tested concentrations ($p \leq 0.05$). As the concentration decreased, the survival rate of the pathogens increased, with statistically significant differences observed at each concentration ($p \leq 0.05$). For the previously mentioned pathogens at the lowest tested concentration, the survival rate was 4–7% ($p \leq 0.05$) compared to the control group. *C. hoffmannii*, *W. pararugosa*, and *K. marxianus* showed survival rates oscillating between 5% and 27%, de-

pending on the concentration, all statistically significant ($p \leq 0.05$) compared to the control group, while the most resistant strain was *S. cerevisiae*, for which the lowest concentration of 1.56 mg/L showed a statistically significant reduction ($p \leq 0.05$), and the highest concentration reduced its survival rate to 44% ($p \leq 0.05$).

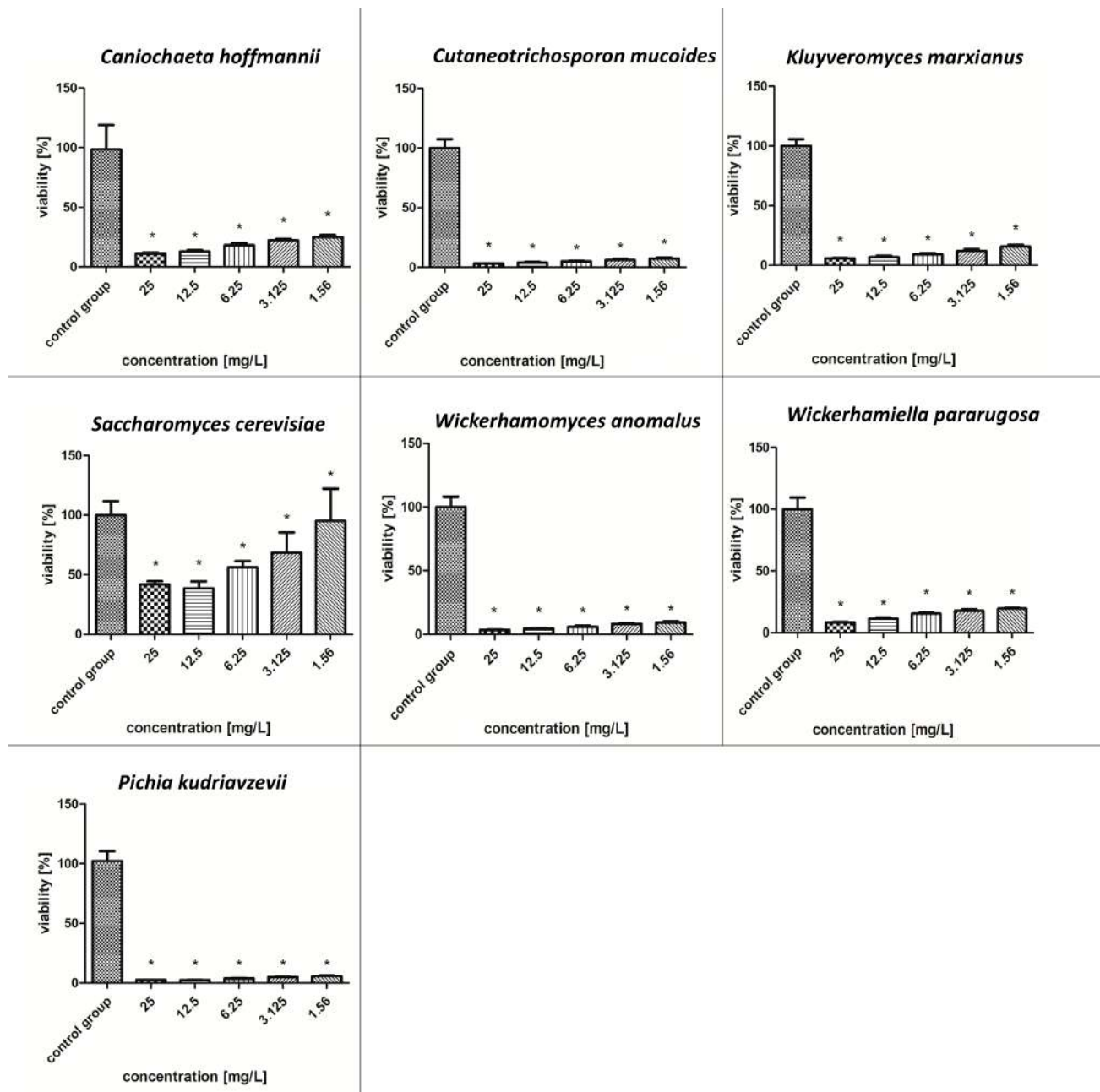


Figure 10. Survival rate of isolated fungal strains after application of AgCuNPs. Statistically significant differences are marked with an asterisk (p -value ≤ 0.05).

3.11. Survival Rate of Fungal Strains After Application of AuCuNPs

Figure 11 illustrates that the most sensitive pathogen to this complex was *W. pararugosa*, with statistically significant reductions in survival at all tested concentrations ($p \leq 0.05$), where the highest concentration reduced the survival rate to 1–6%; however, an increase in survival rate at the lowest concentration was also observed (20–41%, $p \leq 0.05$) compared to the control group. Strong biocidal properties were observed for *K. marxianus* at concentrations of 25–6.25 mg/L, with survival rates of 4–10%, all statistically significant

($p \leq 0.05$) compared to the control group. *P. kudriavzevii* showed strong susceptibility to this complex at all concentrations, with statistically significant reductions ($p \leq 0.05$), except for the lowest concentration, 1.56 mg/L, for which the survival rate was 100% ($p < 0.05$). As in the previous nanocomplex tests, *S. cerevisiae* was the most resistant pathogen to AuCuNPs, with statistically significant reductions at all concentrations ($p \leq 0.05$) compared to the control group.

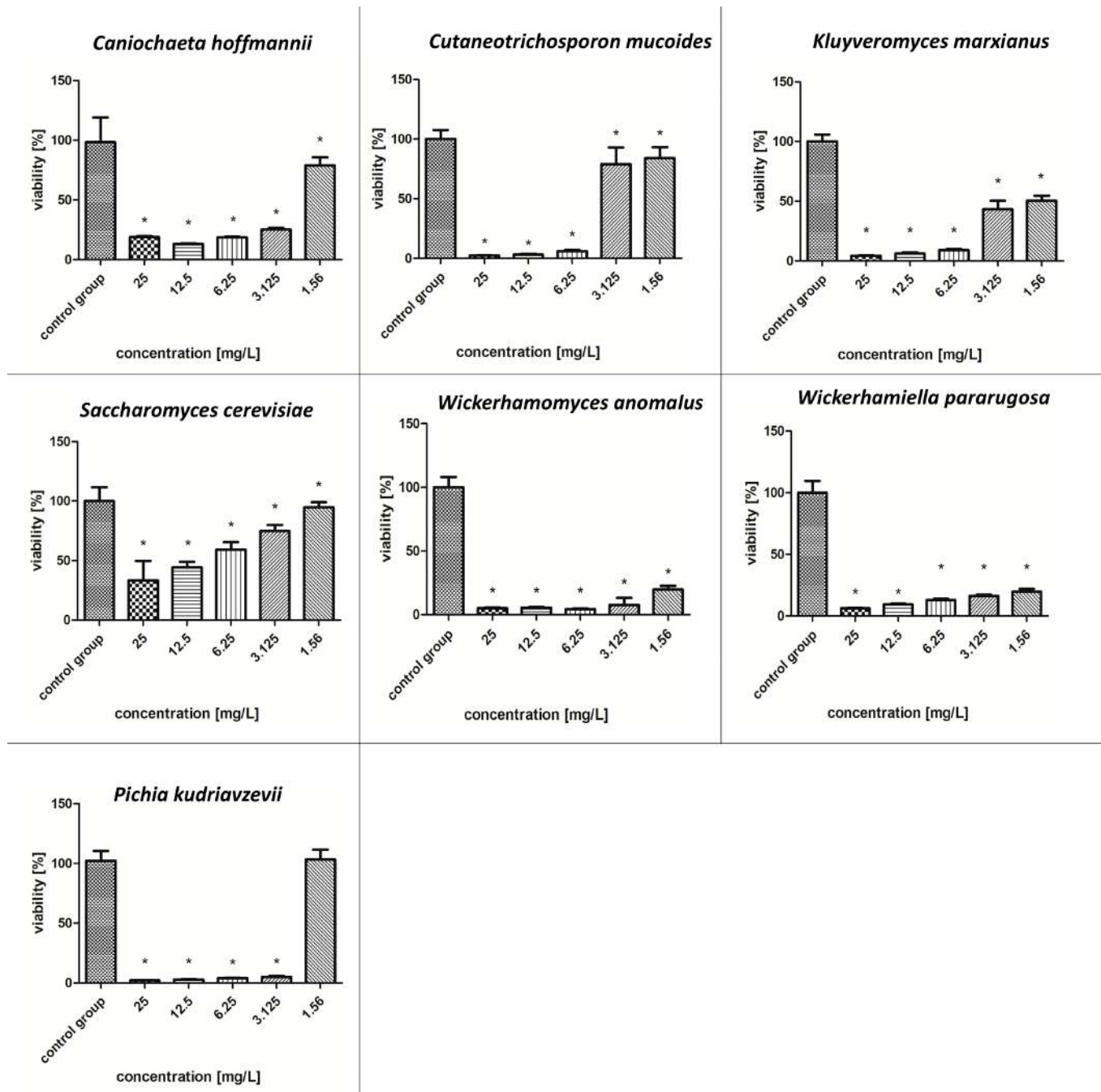


Figure 11. Survival rate of isolated fungal strains after application of AuCuNPs. Statistically significant differences are marked with an asterisk (p -value ≤ 0.05).

3.12. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

Table 1 shows the results indicating the concentrations of individual nanoparticles and their complexes, for which MIC and MFC values were estimated for each isolated strain. If the MIC or MFC for a specific nanoparticle could not be determined, the data for that

nanoparticle were excluded. In cases where one of the measurements was not available for a strain, a “-” is indicated in the table.

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of selected NPs tested on the isolated strains.

Pathogen Species	Type of NP	MIC (mg/L)	MFC
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Ag	6.25	6.25
	AgAu	12.5	12.5
	AgCu	12.5	12.5
<i>Wickerhamiella pararugosa</i>	Ag	3.125	12.5
	Au	25	-
	AgAu	3.125	12.5
	AgCu	-	25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ag	6.25	12.5
	AgAu	12.5	25
	AgCu	12.5	12.5
<i>Cutaneotrichosporon mucoides</i>	Ag	3.125	25
	AgAu	6.25	25
	AgCu	25	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Ag	25	-
	AgAu	6.25	12.5
	AgCu	12.5	25
<i>Coniochaeta hoffmannii</i>	Ag	1.56	6.25
	Au	25	-
	AgAu	6.25	12.5
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Ag	6.25	12.5
	AgAu	12.5	12.5
	AgCu	12.5	12.5

3.13. Antifungal Disk Results

Table S2 shows the numerical values indicating the diameter of the zone of growth inhibition of isolated fungal strains after the application of standard antifungal agents.

The most effective antimicrobials were clotrimazole 10 µg (CTM10) and ketoconazole 10 µg (KCA10), which showed growth-inhibition zone values of 52 mm and 40 mm against *W. pararugosa*, respectively. The *K. marxianus* strain also obtained a zone of 32 mm using CTM10. Similarly, a high inhibition zone value of 30 mm was achieved for the *W. pararugosa* strain when fluconazole 25 µg (FCN25) was applied. The KCA10 formulation also showed high efficacy against the *C. mucoides* strain, reaching a zone of 30 mm. High values were also observed for *W. anomalus* after the application of KCA10, obtaining a zone of 38 mm. These results suggest that the effectiveness of individual antimicrobial preparations varies depending on the fungal strain. The worst-performing agent was fluconazole 10 µg (FCN10) for the strains *P. kudriavzevii* and *W. anomalus*, with values of 0 mm. The smallest growth-inhibition zone, 3 mm, was obtained for *P. kudriavzevii* using amphotericin B 20 µg (AMB20). After AMB20 treatment, *K. marxianus* had a growth-inhibition zone of 4 mm, while *W. pararugosa*, using FCN10, also had a zone of 4 mm. In the case of *P. kudriavzevii*, the application of nystatin 100 µg (NY100) yielded a growth-inhibition zone of 7 mm, while *W.*

anomalus achieved a zone of 6 mm with FCN10. Econazole (ECN10) was slightly effective against *P. kudriavzevii*, reaching an inhibition zone size of 4 mm. The application of this antifungal against the remaining strains resulted in inhibition zones ranging from 14 mm to 22 mm, reaching the highest value (22 mm) for *C. mucoides* and *W. pararugosa*. AMB20 was least effective against the *P. kudriavzevii* strain, achieving a growth-inhibition zone of only 3 mm. A growth-inhibition zone with a radius of 30 mm was obtained for *W. pararugosa* using FCN25, which was one of the largest. The most resistant strain to the antifungal substances was *P. kudriavzevii*, which had the lowest values for its growth-inhibition zones. On the other hand, the least resistant pathogen was *W. pararugosa*, which had the highest number of large inhibition zones, including a value of 40 mm for KCA10. The highest average for the zones of inhibition was observed for KCA10 against various strains, with average values ranging from 14 mm to 40 mm. The worst average for the inhibition zones was observed for FY1, which repeatedly had a value of 0 mm, meaning no growth inhibition. Based on the above results, it can be suggested that some agents, such as KCA10 and CTM10, were particularly effective against many of the strains, while others, such as FY1 and FCN10, showed less potency. The *P. kudriavzevii* strain proved to be one of the most challenging pathogens for antifungals, as evidenced by its multiple low inhibition zones.

4. Discussion

This study is focused on strains that are rarely isolated and, consequently, little known in the scientific literature. The lack of available data on these strains and the small number of analyses that have been carried out indicate a clear gap in existing research, demonstrating the neglect of this area in microbiological research. Although there are many papers in the literature examining similar issues, most of them focus on bacteria [19,20], highlighting how limited the focus has been on less common strains, including those analyzed in this study. This kind of research is a valuable contribution, but it still mostly involves widespread bacteria, leaving a gap in knowledge about rare, infrequently isolated microorganisms. In their paper, Stavrou et al. [21] describe that AMB is an excellent antifungal therapy against most known strains. However, this is not fully consistent with our study results, where no strains were sensitive to this antifungal. In our study, AMB20 resulted in the smallest diameters of growth-inhibition zones for the fungi used in the study, reaching the highest value of 16 mm for *W. pararugosa*. The effectiveness of this antifungal, however, varied depending on the strain. Stavrou et al. proved in their study (as in our study) that *K. marxianus* and *W. anomalus* were relatively resistant to AMB20. In our study, *K. marxianus* was the most resistant pathogen to AMB20, as shown by the 2 mm zone of inhibition, whereas in the study by Stavrou et al., this strain showed low MIC values for AMB20. In the same study, FY showed low MIC values for *K. marxianus* strains, averaging 0.752 mg/L, whereas in our study, the zone of inhibition classified the strain as resistant. Literature data report that *P. kudriavzevii* is resistant to FCN [22], which was also confirmed by our study. Ming et al. [23] conducted a study on the susceptibility of *D. rugosa* to AMB, FY, and FCN. They proved that *D. rugosa* showed resistance to AMB, FY, and FCN. In comparison to our study, the sensitivity of *D. rugosa* was confirmed for FCN25. Kudrinskiy et al. [24] conducted a study on the use of AgNPs and silver ions (Ag⁺) against *S. cerevisiae*. AgNPs effectively reduced the survival rate of *S. cerevisiae* cells; however, this was not consistent with the results obtained in our experiment, where the lowest survival rate obtained for *S. cerevisiae* was as high as 90.77%. Neculai-Valeanu et al. [25], when testing AgNPs and AuNPs, demonstrated that they did have biocidal activity against mastitic pathogens; however, as mentioned above, in our work AgNPs were not effective against *S. cerevisiae* and *C. hoffmannii*. Another study conducted by Motrenko et al. [26] showed that AgNPs obtained by green synthesis showed biocidal properties against *P. kudriavzevii* and *W.*

anomalus for concentrations of 20 and 10 mg/L, consecutively reducing their survival rate to 0%. Lower concentrations also showed biocidal properties but did not fully destroy the cells of these strains. Comparing these data with the obtained results, the potency of AgNPs differed from the cited article. In the case of *P. kudriavzevii*, none of the tested concentrations showed full biocidal activity, which would reduce the survival rate of this strain by 100%. It was, however, a susceptible strain to AgNPs, where the lowest and highest tested concentrations resulted in a similar biocidal effect. In the case of Motrenko's study, *W. anomalus* showed high resistance, while in our study, its survival rate was low, comparable to *P. kudriavzevii*. On the other hand, in the cited article, a concentration of 10 mg/L of *W. pararugosa* resulted in the complete destruction of 100% of the cells of this strain, while in our study, even a concentration of 25 mg/L did not show such strong properties. These differences may be due to the way NPs are synthesized—those used in our study were synthesized by the manufacturer using physical methods. The observed differences in biocidal activity among the nanoparticles may be attributed to the synthesis methods. Factors such as ion release, nanoparticle aggregation, and interactions with microbial cell walls can all influence efficacy. For example, nanoparticles synthesized by physical methods may differ in size, surface charge, and dispersion stability, which can affect the rate of ion release and the extent of interaction with microbial cells. These physicochemical properties likely contribute to the variations in antifungal activity observed in our study [27]. NPs are strongly influenced by their physicochemical properties, especially their surface modification and aggregation tendency. In studies comparing stabilized and unstabilized AgNPs, antifungal efficacy was associated with increased aggregate stability obtained through stabilization with polymers and surfactants [28]. Among the stabilizing agents tested, surfactants—especially sodium dodecyl sulfate (SDS)—showed the most pronounced enhancement of fungistatic and fungicidal activity, which was attributed to the synergistic effect of NPs stabilization and the intrinsic antifungal activity of the surfactant itself [29]. NPs have been identified as key factors influencing interactions with microbial cells. Smaller NPs and specific particle shapes have been found to exhibit increased antibacterial activity, reflecting more effective contact with and disruption of microbial cell envelopes [28]. The aggregation of AgNPs on the cell surface also contributes to cell membrane damage, further confirming the role of the physicochemical properties of nanoparticles in determining antifungal efficacy [30].

The superior antifungal activity of the AgCuNP complex observed in this study may be explained by several potential mechanisms. Ag and Cu NPs are known to exert biocidal effects through ion release, generation of ROS, and disruption of microbial membranes. The combination of Ag and Cu could enhance these effects through synergistic interactions. Although the precise mechanism for the enhanced activity of AgCuNP remains to be understood, previous studies support the idea that dual-metal nanoparticles can display higher antimicrobial efficacy compared to single-metal formulations. A recent synergistic mechanistic study [31] on NPs demonstrated that the presence of Cu in the nanoparticle formulation increases the bioavailability of Ag⁺ ions by both accelerating Ag⁺ release and reducing its sequestration by proteins in the medium. Importantly, the synergistic effect was observed only when nanoparticles were present, indicating that direct interaction between the nanoparticle surfaces and microbial cells contributes to the enhanced activity. These combined effects—ion release, reduced Ag⁺ binding, and nanoparticle-mediated surface interactions—provide a plausible explanation for the superior biocidal efficacy of the AgCuNP formulation.

In the viability tests conducted, it was occasionally observed that the survival rates of microorganisms after exposure to low concentrations of nanoparticles exceeded 100%. This indicates that, in these cases, low nanoparticle concentrations promoted the growth of fungal strains. Such phenomena are not uncommon in tests involving potential biocidal

agents and are referred to as hormesis. Hormesis occurs when a microorganism's growth is stimulated by low (subinhibitory) concentrations of a biocidal substance, while higher concentrations inhibit growth [32]. Exposure to subinhibitory concentrations can lead to evolutionary adaptations that enhance microbial survival and contribute to the development of resistance under adverse environmental conditions [33]. This effect is particularly important to consider in the context of applying nanoparticles in the field. On one hand, low concentrations may be safe for animal cells but could promote the development of microbial resistance. On the other hand, high concentrations effectively prevent resistance by destroying microbial cells; however, it may pose risks to the user.

The aim of the study was to evaluate the potential biocidal properties of selected nanoparticles against specific fungal strains. However, in order to reliably assess the potential for practical application of NPs, it is necessary to also consider aspects related to their safety. A key element in this regard is the analysis of cytotoxicity against animal cells and antifungal properties against pathogen cells. Such studies, using nanoparticles from the same source as those used in the present experiment, have previously been conducted by Wierzbicki et al. [19]. Low concentrations of NPs showed no cytotoxic activity against BME-UV1—human mammary epithelial cells and HMEC—human microvascular endothelial cells. Only CuNPs, along with complexes containing these NPs, showed moderate toxicity against BME-UV1 cells. High concentrations of NPs were correlated not only with biocidal potency against pathogens, but also with cytotoxicity against HMEC cells. Nevertheless, for the higher tested concentrations, cytotoxicity against these cells was observed only at the level of 10–15%. It is worth noting that the cited results on the effects of NPs on cells came from the same source and were synthesized in the same way—using physical methods. Therefore, in order to reliably assess their biocidal potential and safety for cells, it is necessary to take into account possible differences in the effects of nanoparticles obtained and produced by other methods, as well as removing analytical limitations such as the lack of cytotoxicity studies on human and animal cells.

5. Conclusions

The results of this study provide preliminary, in vitro evidence that nanoparticles may exhibit antifungal activity relevant to fungal *mastitis*. These findings are exploratory and do not allow conclusions regarding their in vivo efficacy or clinical application. Nevertheless, they support the need for further research, including in vivo studies, to better assess the potential of nanoparticle-based formulations as antifungal agents. Continued investigation into the effectiveness of various antifungal compounds, particularly against fungi that are infrequently isolated from *mastitis* cases, remains essential for the development of future therapeutic and management strategies. It is crucial to notice that further in vivo studies are required to evaluate dosage, delivery route, tissue persistence, and host safety before any therapeutic application can be proposed.

Understanding differences in efficacy between therapies, including traditional and modern antifungal agents, is essential for improving the treatment of fungal infections. A review of the literature confirms that some strains show resistance to conventional treatments while highlighting the potential of nanoparticles as alternative antifungal agents. The study revealed significant variation in nanoparticle effects and demonstrated their synergistic antifungal activity. Their efficacy depended on both the type of nanoparticles used and their concentration. Additionally, differences in the sensitivity of individual strains to these nanoparticles were observed. Among the isolated strains, nanoparticle activity followed the order (from most to least effective): AgCu, AgAu, CuAu, Ag, Cu, Au, Fe, and Pt. The strain *S. cerevisiae* showed the highest resistance to the nanoparticles, whereas *W. pararugosa* was the most sensitive.

According to the existing literature, several studies have reported that the application of nanoparticles at low concentrations appears to be well tolerated in various human and animal cell lines. However, these observations are based on previously published data and cannot be directly inferred from the results of the present study. While nanoparticles therefore represent a promising subject for further investigation, particularly in the context of in vivo testing, their safety profile requires careful evaluation in appropriately designed studies. Under laboratory conditions, they exhibit potent biocidal properties, indicating their potential as an alternative to traditional antibiotics and antifungals. Research findings in the literature also highlight their efficacy against both bacteria and fungi. However, as nanoparticles are a relatively new field of study, their use should be approached with caution and under strict supervision. The potential long-term effects of their use remain unclear and must be carefully considered.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biology15050412/s1>. Table S1: Fungal identification results; Table S2: Zones of growth inhibition of isolated fungal strains after application of antifungal agents.

Author Contributions: Conceptualization, writing—original draft preparation, review and editing, methodology and investigation, M.K.; investigation, writing—original draft preparation, W.M.J.; investigation, A.L.; review, A.K.; conceptualization, review, M.G. This article is a part of Magdalena Kot's Ph.D. thesis. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

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

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

NPs	nanoparticles
AgNPs	silver nanoparticles
AuNPs	gold nanoparticles
CuNPs	copper nanoparticles
FeCNPs	iron nanoparticles with hydrophilic carbon coating
PtNPs	platinum nanoparticles
AgAuNPs	silver–gold nanocomplex
AgCuNPs	silver–copper nanocomplex
AuCu	gold–copper nanocomplex
SCC	somatic cells count

References

1. Meçaj, R.; Muça, G.; Koleci, X.; Sulçe, M.; Turmalaj, L.; Zalla, P.; Koni, A.; Tafaj, M. Bovine environmental mastitis and their control: An overview. *Int. J. Agric. Sci.* **2023**, *12*, 216–221. [[CrossRef](#)]
2. Bogni, C.; Odierno, L.; Raspanti, C.; Giraudo, J.; Larriestra, A.; Reinoso, E.; Lasagno, M.; Ferrari, M.; Ducrós, E.; Frigerio, C.; et al. War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. In *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 2nd ed.; Méndez-Vilas, A., Ed.; Formatex Research Center: Badajoz, Spain, 2011; pp. 483–494.
3. Cheng, W.N.; Han, S.G. Bovine mastitis: Risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments—A review. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* **2020**, *33*, 1699–1713. [[CrossRef](#)]

4. Quinn, P.J.; Carter, M.E.; Markey, B.K.; Carter, G.R. *Veterinary Microbiology*; Mosby International Limited: London, UK, 2002; pp. 465–475.
5. Kibebew, K. Bovine mastitis: A review of causes and epidemiological point of view. *J. Bio. Agric. Health* **2017**, *7*, 1–14.
6. Dworecka-Kaszak, B.; Krutkiewicz, A.; Szopa, D.; Kleczkowski, M.; Biegańska, M. High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. *Sci. World J.* **2012**, *2012*, 196347. [[CrossRef](#)]
7. Costa, E.O.D.; Gandra, C.R.; Pires, M.F.; Coutinho, S.D.; Castilho, W.; Teixeira, C.M. Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of São Paulo, Brazil. *Mycopathologia* **1993**, *124*, 13–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ksouri, S.; Djebir, S.; Hadeif, Y.; Benakhla, A. Survey of bovine mycotic mastitis in different mammary gland statuses in two north-eastern regions of Algeria. *Mycopathologia* **2015**, *179*, 327–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Williamson, J.H.; Di Menna, M.E. Fungi isolated from bovine udders, and their possible sources. *N. Zeal. Vet. J.* **2007**, *55*, 188–190. [[CrossRef](#)]
10. Bakr, E.M.; El-Tawab, A.E.K.M.A.; Elshemey, T.M.; Abd-Elrhman, A.H. Diagnostic and Therapeutic Studies on Mycotic Mastitis in Cattle. *Alex. J. Vet. Sci.* **2015**, *46*, 138–145. [[CrossRef](#)]
11. Jabłońska, W.; Gołębiewski, M.; Kot, M.; Mardan, H.; Pawliński, B.; Kalińska, A. Perspectives and possibilities for new antimicrobial agents in the treatment and control of Mastitis induced by algae of the genus *Prototheca* spp.: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 8219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Kot, M.; Lange, A.; Jabłońska, W.; Kalińska, A.; Nasiłowska, B.; Skrzeczanowski, W.; Gołębiewski, M. Nanoparticles as New Antifungals in the Prevention of Bovine Mycotic Mastitis Caused by *Candida* spp. and *Diutina* spp.—In Vitro Studies. *Molecules* **2025**, *30*, 2086. [[CrossRef](#)]
13. Wawron, W.; Bochniarz, M.; Piech, T. Yeast mastitis in dairy cows in the middle-eastern part of Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* **2010**, *54*, 201–204.
14. Krukowski, H.; Saba, L. Bovine mycotic mastitis. *Folia Vet* **2003**, *47*, 3–7.
15. Zhou, Y.; Ren, Y.; Fan, C.; Shao, H.; Zhang, Z.; Mao, W.; Wei, C.; Ni, H.; Zhu, Z.; Hou, X.; et al. Survey of mycotic mastitis in dairy cows from Heilongjiang Province, China. *Trop. Anim. Health Prod.* **2013**, *45*, 1709–1714. [[CrossRef](#)]
16. Fogsgaard, K.K.; Røntved, C.M.; Sørensen, P.; Herskin, M.S. Sickness behavior in dairy cows during *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 630–638. [[CrossRef](#)]
17. Sharmin, S.; Rahaman, M.M.; Sarkar, C.; Atolani, O.; Islam, M.T.; Adeyemi, O.S. Nanoparticles as antimicrobial and antiviral agents: A literature-based perspective study. *Heliyon* **2021**, *7*, e06456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Matras, E.; Gorczyca, A.; Przemieniecki, S.W.; Oćwieja, M. Surface properties-dependent antifungal activity of silver nanoparticles. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 18046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Wierzbicki, M.; Kot, M.; Lange, A.; Kalińska, A.; Gołębiewski, M.; Jaworski, S. Evaluation of the antimicrobial, cytotoxic, and physical properties of selected nano-complexes in bovine udder inflammatory pathogen control. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2024**, *17*, 77–94. [[CrossRef](#)]
20. Radzikowski, D.; Kalińska, A.; Kot, M.; Jaworski, S.; Wierzbicki, M.; Gołębiewski, M. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Properties of Nanoparticles as New Agents Used in Teat Sealants for Mastitis Prevention in Dry Cows. *Biomedicines* **2023**, *11*, 2291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Stavrou, A.A.; Pérez-Hansen, A.; Lackner, M.; Lass-Flörl, C.; Boekhout, T. Elevated minimum inhibitory concentrations to antifungal drugs prevail in 14 rare species of candidemia-causing *Saccharomycotina* yeasts. *Med. Mycol.* **2020**, *987*, 987–995. [[CrossRef](#)]
22. Ordaya, E.E.; Clement, J.; Vergidis, P. The role of novel antifungals in the management of candidiasis: A clinical perspective. *Mycopathologia* **2023**, *937*, 937–948. [[CrossRef](#)]
23. Ming, C.; Huang, J.; Wang, Y.; Lv, Q.; Zhou, B.; Liu, T.; Cao, Y.; Gerrits van den Ende, B.; Al-Hatmi, A.; Ahmed, A.; et al. Revision of the medically relevant species of the yeast genus *Diutina*. *Med. Mycol.* **2019**, *226*, 226–233. [[CrossRef](#)]
24. Kudrinskiy, A.A.; Ivanov, A.Y.; Kulakovskaya, E.V.; Klimov, A.I.; Zharebin, P.M.; Khodarev, D.V.; Le, A.; Thi Tam, L.; Lisichkin, G.V.; Krutyakov, Y.A. The mode of action of silver and silver halides nanoparticles against *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J. Nanopart.* **2014**, *1*, 568635. [[CrossRef](#)]
25. Neculai-Valeanu, A.S.; Ariton, A.M.; Mădescu, B.M.; Rîmbu, C.M.; Creangă, Ș. Nanomaterials and essential oils as candidates for developing novel treatment options for bovine mastitis. *Animals* **2021**, *11*, 1625. [[CrossRef](#)]
26. Motrenko, M.; Lange, A.; Kalińska, A.; Gołębiewski, M.; Kunowska-Słószar, M.; Nasiłowska, B.; Czwartos, J.; Skrzeczanowski, W.; Orzeszko-Rywka, A.; Jagielski, T.; et al. Green Nanoparticle Synthesis in the Application of Non-Bacterial Mastitis in Cattle. *Molecules* **2025**, *30*, 1369. [[CrossRef](#)]
27. Wang, L.; Hu, C.; Shao, L. The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 1227–1249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Akter, M.; Sikder, M.T.; Rahman, M.M.; Ullah, A.A.; Hossain, K.F.B.; Banik, S.; Hosokawa, T.; Saito, T.; Kurasaki, M. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *J. Adv. Res.* **2018**, *9*, 1–16. [[CrossRef](#)]
29. Panáček, A.; Kolář, M.; Večeřová, R.; Pucek, R.; Soukupová, J.; Kryštof, V.; Hamal, P.; Zbořil, R.; Kvítek, L. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* **2009**, *30*, 6333–6340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Osonga, F.J.; Akgul, A.; Yazgan, I.; Akgul, A.; Eshun, G.B.; Sakhaee, L.; Sadik, O.A. Size and Shape-Dependent Antimicrobial Activities of Silver and Gold Nanoparticles: A Model Study as Potential Fungicides. *Molecules* **2020**, *25*, 2682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Vasiliev, G.; Kubo, A.L.; Vija, H.; Kahru, A.; Bondar, D.; Karpichev, Y.; Bondarenko, O. Synergistic antibacterial effect of copper and silver nanoparticles and their mechanism of action. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 9202. [[CrossRef](#)]
32. Guo, Y.; Gao, J.; Cui, Y.; Zhao, Y.; Ma, B.; Zeng, L.; Chen, H. Hormesis and synergistic effects of disinfectants chloroxylenol and benzethonium chloride on highly efficient heterotrophic nitrification-aerobic denitrification functional strain: From performance to mechanism. *J. Hazard. Mater.* **2024**, *476*, 135160. [[CrossRef](#)]
33. Agathokleous, E.; Wang, Q.; Iavicoli, I.; Calabrese, E.J. The relevance of hormesis at higher levels of biological organization: Hormesis in microorganisms. *Curr. Opin. Toxicol.* **2022**, *29*, 1–9. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Mgr inż. Magdalena Kot

Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

magdalena_kot@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Weronika Maria Jabłońska, Agata Lange, Aleksandra Kalińska, Marcin Gołębiewski. Nanomaterials in the Management of Fungal Udder Inflammation in Cattle as an Effective Preventive Strategy Based on *In Vitro* Studies. *Biology* 2026, 15, 412

Mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji i metodologii doświadczenia, planowaniu i realizacji badań, pozyskaniu i przygotowaniu materiału badawczego, analizie, interpretacji i walidacji danych, opracowaniu wyników, przygotowaniu wizualizacji, przygotowaniu manuskryptu, jego krytycznej weryfikacji merytorycznej oraz redakcji językowej, a także aktywnym udziale w procesie recenzyjnym, co wynosi 84 % pracy.

Magdalena Kot
podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Mgr inż. Weronika Jabłońska

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytet Śląski w Katowicach

weronika.jablonska@us.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Weronika Maria Jabłońska, Agata Lange, Aleksandra Kalińska, Marcin Gołębiewski. Nanomaterials in the Management of Fungal Udder Inflammation in Cattle as an Effective Preventive Strategy Based on *In Vitro* Studies. *Biology* 2026, 15, 412

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu badań oraz przygotowanie manuskryptu, co wynosi 5 % pracy.

Jabłońska

podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Dr inż. Agata Lange

Katedra Nanobiotechnologii

Instytut Biologii

agata_lange1@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Weronika Maria Jabłońska, Agata Lange, Aleksandra Kalińska, Marcin Gołębiewski. Nanomaterials in the Management of Fungal Udder Inflammation in Cattle as an Effective Preventive Strategy Based on *In Vitro* Studies. *Biology* 2026, 15, 412

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na prowadzeniu badań, co wynosi 3 % pracy.

Agata Lange
podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Dr inż. Aleksandra Kalińska

Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

aleksandra_kalinska@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Weronika Maria Jabłońska, Agata Lange, Aleksandra Kalińska, Marcin Gołębiewski. Nanomaterials in the Management of Fungal Udder Inflammation in Cattle as an Effective Preventive Strategy Based on *In Vitro* Studies. *Biology* 2026, 15, 412

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na prowadzeniu nadzoru merytorycznego, co wynosi 3 % pracy.



podpis

Warszawa, dn. 19.05.2026r.

Prof. dr hab. Marcin Gołębiewski
Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
marcin_golebiewski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Magdalena Kot, Weronika Maria Jabłońska, Agata Lange, Aleksandra Kalińska, Marcin Gołębiewski. Nanomaterials in the Management of Fungal Udder Inflammation in Cattle as an Effective Preventive Strategy Based on *In Vitro* Studies. *Biology* 2026, 15, 412

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz pozyskanie funduszy, co stanowi 5 % pracy.



podpis