

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Biologii

Mgr inż. Agata Maria Lange

# Materiały grafenowe jako nośniki nanocząstek metali o właściwościach antybakteryjnych

Graphene materials as carriers for metal nanoparticles with antibacterial properties

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem

Dr. hab. Sławomira Jaworskiego, prof. SGGW

Katedra Nanobiotechnologii, Instytut Biologii

Warszawa, rok 2025

#### Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 03.03.2025 Czytelny podpis promotora. Jou OUL

#### Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawa 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 03.03.2025

Czytelny podpis autora rozprawy ... torge

Serdecznie dziękuję

Dr. hab. Sławomirowi Jaworskiemu, prof. SGGW za zaangażowanie, pomoc merytoryczną i ogrom cierpliwości każdego dnia. Dziękuję za nieocenione wsparcie, zwłaszcza w momentach kiedy było najtrudniej,

Pracownikom Katedry Nanobiotechnologii oraz Współautorom,

Moim bliskim

## Spis treści

1.	. Streszczenie
2.	. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską13
3.	. Wykaz skrótów
4.	. Wstęp 16
5.	. Hipoteza badawcza, cel i zakres pracy
6.	. Materiały stosowane w badaniach
	6.1. Nanostruktury
	6.2. Materiał biologiczny
7.	. Metodyka badań
	7.1. Układ doświadczeń
	7.1.1. Doświadczenie I (Publikacja 1: Lange i wsp., 2022)
	7.1.2. Doświadczenie II (Publikacja 2: Lange i wsp., 2022)
	7.1.3. Doświadczenie III (Publikacja 3: Lange i wsp., 2024)
8.	. Omówienie głównych wyników przeprowadzonych doświadczeń
	8.1. Doświadczenie I: Określenie wpływu i działania nanokompozytu GOAg oraz jego
	składowych na dwa gatunki bakterii: S. aureus i P. aeruginosa (Publikacja 1: Lange
	i wsp., 2022)
	8.2. Doświadczenie II: Określenie właściwości antybakteryjnych trójkomponentowych
	ich składowych, w stosunku do czterech gatunków bakterii: <i>S. aureus, S. enterica</i> .
	<i>L. monocytogenes</i> i <i>E. cloacae</i> (Publikacja 2: Lange i wsp., 2022)
	8.3. Doświadczenie III: Określenie wpływu nanokompozytów składających się z GO,
	AgNPs, CuNPs lub ZnONPs i utworzonych z nich nanofilmów na formowanie
	biofilmu trzech gatunków bakterii: S. aureus, S. enterica oraz P. aeruginosa
c	(Publikacja 3: Lange i wsp., 2024)
9.	. Podsumowanie

10. Wnioski	51
11. Bibliografia	
12. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej wraz	z oświadczeniami
współautorów	

### 1. Streszczenie

Od wielu lat obserwowany jest lawinowy wzrost zakażeń powodowanych przez bakterie o skrajnej oporności na antybiotyki. Z tego względu istnieje pilna potrzeba wynalezienia nowych substancji o potencjale antybakteryjnym, które umożliwią przeciwdziałanie patogennym bakteriom. Jednym z proponowanych rozwiązań są nanocząstki i nanomateriały, ze względu na swoje unikalne właściwości fizykochemiczne jakie wykazują. Celem pracy było określenie potencjalnych właściwości antybakteryjnych nanokompozytów składających się z materiałów grafenowych (GN, GO) dekorowanych nanocząstkami metali (AgNPs, CuNPs, ZnONPs) na komórki bakterii gatunków takich jak: Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica, Listeria monocytogenes i Enterobacter cloacae oraz określenie mechanizmu działania nanokompozytów. W niniejszych badaniach przeprowadzona została analiza fizykochemiczna nanostruktur oraz nanokompozytów, która obejmowała pomiar potencjału zeta (Zp) i średnicy hydrodynamicznej, wizualizację za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) oraz dodatkowe analizy przeprowadzone na wybranych nanokompozytach i ich składowych takie jak: spektroskopia w podczerwieni z transformacja Fouriera (FT-IR), analiza dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDX), skaningowa transmisyjna mikroskopia elektronowa (STEM), analiza powierzchni za pomoca mikroskopii sił atomowych (AFM). Przeprowadzone zostały analizy biologiczne obejmujące podstawowe testy toksyczności: metoda dyfuzyjno-studzienkowa, XTT, PrestoBlue oraz określenie liczby jednostek tworzących kolonie. Przeanalizowane zostały również inne potencjalne punkty oddziaływań nanostruktur z komórkami bakterii, określające generowanie reaktywnych form tlenu (ROS), przerwanie ciągłości ściany i błony komórkowej poprzez określenie wypływu dehydrogenazy mleczanowej (LDH), określenie zawartości adenozyno-5'-trifosforanu (ATP), określenie peroksydacji lipidów poprzez analizę dialdehydu malonowego (MDA) oraz zdolność antyoksydacyjna (TEAC). Komórki bakterii zostały zwizualizowane za pomocą TEM. Przeprowadzona została również analiza biofilmu uformowanego na powierzchni nanofilmów przygotowanych z hydrokoloidów nanokompozytów, obejmująca ilościowe i jakościowe określenie uformowanego biofilmu poprzez określenie jego grubości i struktury za pomocą mikroskopii konfokalnej oraz skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Przeprowadzone analizy wykazały, że GO jest odpowiednim nośnikiem dla AgNPs, CuNPs i ZnONPs, zapewniając im większą stabilność koloidalną niż w przypadku oddzielnego stosowania. Nanokompozyty wykazywały znaczną toksyczność w stosunku do testowanych gatunków bakterii, powodując ograniczenia żywotności oraz zmiany metaboliczne w komórkach bakterii (indukcja ROS, peroksydacja lipidów, zmniejszenie zawartości ATP, wypływ LDH). Powierzchnia nanofilmów nie była sprzyjająca do formowania biofilmu, którego grubość była znacznie ograniczona, a struktura zmieniona. Co więcej, wykazane zostało, że nanokompozyty GOAg zachowują właściwości antybakteryjne nawet w przypadku zastosowania powlekanych materiałów włókienniczych, jak również nie generują toksyczności względem błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury (CAM). Z kolei nanokompozyt na bazie GN – GNZnOCu powodował niewielką toksyczność w stosunku do linii komórkowej HFFF2 powodując wzrost cytokin prozapalnych TNF-β i TARC.

**Słowa kluczowe**: nanocząstki metali, materiały grafenowe, właściwości antybakteryjne, toksyczność, biofilm

#### Summary

For many years there has been observed an exponential increase in infections caused by bacteria with extreme antibiotic resistance. Therefore, there is an urgent need to invent new substances with antibacterial potential, which will make it possible to counteract pathogenic bacteria. One of the proposed solutions are nanoparticles and nanomaterials due to their unique physicochemical properties they exhibit. This study aimed to determine the potential antibacterial properties of nanocomposites consisting of graphene materials (GN, GO) decorated with metal nanoparticles (AgNPs, CuNPs, ZnONPs) on bacterial cells of species such as Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica, Listeria monocytogenes and Enterobacter cloacae, and to determine the mechanism of action of the nanocomposites. In the present study, physicochemical analysis of nanostructures and nanocomposites was carried out, which included measurement of zeta potential (Zp) and hydrodynamic diameter, visualization by transmission electron microscopy (TEM), and additional analyses performed on selected nanocomposites and their components such as Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), energy dispersive X-ray analysis (EDX), scanning transmission electron microscopy (STEM), surface analysis by atomic force microscopy (AFM). Biological analyses were carried out, including basic toxicity tests: diffusion-well method, XTT, PrestoBlue, and determination of the number of colony-forming units. Other potential points of interaction of nanostructures with bacterial cells were also analyzed, determining the generation of reactive oxygen species (ROS), disruption of the cell wall and membrane by determining the efflux of lactate dehydrogenase (LDH), determination of adenosine 5'-triphosphate (ATP), determination of lipid peroxidation by malondialdehyde (MDA) analysis, and antioxidant capacity (TEAC). Bacterial cells were visualized using TEM. Analysis of the biofilm formed on the surface of nanofilms prepared from nanocomposite hydrocolloids was also carried out, including quantitative and qualitative determination of the formed biofilm by determining its thickness and structure by confocal microscopy and scanning electron microscopy (SEM). The analyses conducted showed that GO was a suitable carrier for AgNPs, CuNPs and ZnONPs, providing them with greater colloidal stability than when used separately. The nanocomposites showed significant toxicity to the tested bacterial species, causing viability limitations and metabolic changes in bacterial cells (ROS induction, lipid peroxidation, decreases in ATP content, LDH release). The surface of the nanofilms was not favorable to biofilm formation, the thickness of which was significantly reduced and the structure significantly altered. Moreover, it was shown that GOAg nanocomposites retained antibacterial properties even when coated textiles were used, as well as did not generate toxicity against the chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM). In turn, GN-based GNZnOCu nanocomposite caused low toxicity to the HFFF2 cell line by causing an increase in the pro-inflammatory cytokines TNF- $\beta$  and TARC.

Key words: metal nanoparticles, graphene materials, antibacterial properties, toxicity, biofilm

## 2. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

"Materiały grafenowe jako nośniki nanocząstek metali o właściwościach antybakteryjnych"

1. Lange, A., Sawosz Chwalibóg, E., Wierzbicki, M., Kutwin, M., Daniluk, K., Strojny-Cieślak, B., Ostrowska, A., Wójcik, B., Łojkowski, M., Gołębiewski, M., Chwalibog, A., Jaworski, S. (2022). Nanocomposites of Graphene Oxide—Silver Nanoparticles for Enhanced Antibacterial Activity: Mechanism of Action and Medical Textiles Coating. *Materials*, *15*, 1–17. doi:10.3390/ma15093122 (IF<sub>2022</sub>=3,4; 140 pkt)

2. Lange, A., Sawosz Chwalibóg, E., Daniluk, K., Wierzbicki, M., Małolepszy, A., Gołębiewski, M., Jaworski, S. (2022). Bacterial Surface Disturbances Affecting Cell Function during Exposure to Three-Compound Nanocomposites Based on Graphene Materials. *Nanomaterials*, *12*, 1–25. doi:10.3390/nano12173058 (IF<sub>2022</sub>=5,3; 100 pkt)

3. Lange, A., Kutwin, M., Zawadzka, K., Ostrowska, A., Strojny-Cieślak, B., Nasiłowska, B., Bombalska, A., Jaworski, S. (2024). Impaired Biofilm Development on Graphene Oxide-Metal Nanoparticle Composites. *Nanotechnology, Science and Applications*, *17*, 303-320. doi:10.2147/nsa.s485841 (IF<sub>2024</sub>=4,9; 200 pkt)

Łączny IF publikacji stanowiących rozprawę doktorską wynosi 13,6, łączna liczba punktów ministerialnych: 440.

Punktacja została podana na podstawie wykazu czasopism naukowych, Impact Factor (IF) według Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania.

## 3. Wykaz skrótów

- AFM mikroskopia sił atomowych
- AgNPs nanocząstki srebra
- ATCC American Type Culture Collection
- ATP adenozyno-5'-trifosforan
- AuNPs nanocząstki złota
- BHA brain heart agar
- CAM błona kosmówkowo-omoczniowa zarodka kury
- CuNPs nanocząstki miedzi
- DLS dynamiczne rozpraszanie światła
- DMEM Dulbecco's modified Eagle's culture medium
- eDNA zewnątrzkomórkowe DNA
- EDX analiza rentgenowska z dyspersją energii
- ELS elektroforetyczne rozpraszanie światła
- EPS zewnątrzkomórkowa matryca polimerowa
- FBS płodowa surowica bydlęca
- FeNPs nanocząstki żelaza
- FT-IR spektroskopia fourierowska w podczerwieni
- GN-grafen
- GO-tlenek grafenu
- Jtk jednostki tworzące kolonie
- LDH dehydrogenaza mleczanowa
- $MDA-dialdehyd\ malonowy$
- NAG N-acetyloglukozamina

- NAM kwas N-acetylomuraminowy
- NIH Narodowe Instytuty Zdrowia
- ROS reaktywne formy tleny
- SEM skaningowa mikroskopia elektronowa
- STEM skaningowa transmisyjna mikroskopia elektronowa
- TEAC zdolność antyoksydacyjna
- TEM transmisyjna mikroskopia elektronowa
- TSA tryptic soy agar
- ZnNPs nanocząstki cynku
- ZnONPs nanocząstki tlenku cynku
- Zp potencjał zeta
- WHO światowa organizacja zdrowia
- XTT 2,3-Bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo)-2H-tetrazolo-5-karboksyanilid sodu

## 4. Wstęp

Nanomateriały węglowe i oparte na węglu zyskały dużą popularność w rozwoju badawczym, ze względu na wyjątkowe właściwości jakie wykazują: dobra biokompatybilność, wysoka wytrzymałość mechaniczna oraz względna łatwość funkcjonalizacji. Spośród innych nanomateriałów węglowych, grafen (GN) stał się jednym z najczęściej wykorzystywanych ze względu na swoje wyjątkowe właściwości fizyczne, chemiczne oraz mechaniczne. GN jest dwuwymiarową pojedynczą warstwą atomów węgla o hybrydyzacji sp<sup>2</sup> ułożoną w sześciokątny plaster sieci krystalicznej poprzez wiązania  $\sigma$  i  $\pi$ . Podobną powierzchnię wykazuje tlenek grafenu (GO), który dodatkowo posiada wiele grup zawierających tlen (epoksydowe, karbonylowe, karboksylowe, hydroksylowe itp.). Materiały grafenowe takie jak GO lub GN charakteryzują się formą płatków o dużej powierzchni aktywnej (Kumar i Kumar, 2020).

Nanoczastki mają unikalne właściwości fizykochemiczne, w stosunku do swoich odpowiedników w skali makrometrycznej. Właściwości fizykochemiczne nanocząstek metali tj. rozmiar, powierzchnia i jej skład chemiczny oraz stabilność koloidalna, odgrywają kluczowa rolę w potencjalnej toksyczności (Gatoo i wsp., 2014). Nanocząstki często charakteryzują się tendencją do aglomeracji, która wpływa na ich wnikanie do komórek, niekiedy zmieniając pierwotne właściwości jakie miały wykazywać (Zhang i wsp., 2022). Wzrost proporcji atomów i cząstek na powierzchni nanomateriału powoduje, że właściwości powierzchni określają ich zachowanie (Baer, 2011). Uznaje się, że małe rozmiary nanocząstek przyczyniają się do wzrostu ich toksyczności ze względu na większy stosunek powierzchni do objętości, co zwiększa reaktywność i zarazem zapewnia większą powierzchnię do interakcji zarówno z komórkami jak i ich składnikami. Poza rozmiarem, również kształt nanocząstek może znacząco wpływać na ich toksyczność (Zhang i wsp., 2022). Jednakże dotychczasowe doniesienia naukowe nie pozwalają jednoznacznie stwierdzić w jaki sposób kształt nanocząstek wpływa na toksyczność; jedne doniesienia przedstawiają nanocząstki sferyczne jako bardziej toksyczne z większą możliwością wnikania do komórek, inne zaś przedstawiają nanocząstki cylindryczne czy też trójkątne jako te o większej toksyczności (Sayed i wsp., 2022).

Struktura GN oraz GO sprawia, że są one odpowiednie do dekorowania innymi nanocząstkami takimi jak nanocząstki metali (Kumar i Kumar, 2020). Co więcej,

dołączanie innych nanocząstek do materiałów grafenowych poprawia właściwości obu komponentów (Parnianchi i wsp., 2018). Materiały grafenowe, podobnie jak nanocząstki metali, wykazują tendencję do aglomeracji ze względu na oddziaływania wewnątrzpłaszczyznowe, aczkolwiek funkcjonalizacja powierzchni poprzez dodanie nanocząstek metali, tlenków metali czy polimerów zapobiega temu procesowi (Kumar i wsp., 2019). Z drugiej strony, dyspersja nanocząstek na arkuszu grafenowym (np. nanocząstek tlenku cynku (ZnONPs)) zapobiega ich aglomeracji i zapewnia im bliższy kontakt z komórkami bakterii (Szunerits i Boukherroub, 2016). GO może stanowić funkcjonalną platformę dla nanocząstek metali, ponieważ zapewnia długotrwałe uwalnianie nanocząstek opartych na metalach, nawet jeśli tworzone są nanokompozyty z więcej niż dwóch rodzajów nanocząstek (Li i wsp., 2021). Jednak mechanizmy wieloskładnikowych nanokompozytów mają znacznie więcej punktów interakcji z komórkami bakterii, biorąc pod uwagę mnogość efektów, jakie mogą wykazywać pojedyncze nanocząstek (Díez-Pascual, 2020).

Wprowadzenie antybiotyków jako środków leczniczych było przełomem XX wieku. Przyczyniło się to nie tylko do leczenia infekcji bakteryjnych, ale również umożliwiło przeprowadzanie procedur klinicznych w obrębie transplantologii czy operacji na otwartym sercu (Hutchings i wsp., 2019). Rewolucja antybiotykoterapii sprawiła, że obecnie antybiotyki są stosowane jako środki do zwalczania infekcji, ale także jako stymulatory wzrostu i zdrowia zwierząt gospodarskich (Bartlett i wsp., 2013). Choć przełomowe odkrycie i wprowadzenie antybiotyków do powszechnego użytku leczniczego wydawało się niezwykle obiecującym wydarzeniem rewolucjonizującym zwalczanie infekcji bakteryjnych, z czasem okazało się, że jest to równie duże zagrożenie. Szybka eskalacja antybiotykooporności oraz coraz wolniejsze tempo odkrywania i opracowywania nowych antybiotyków przyczyniły się do poważnych problemów zdrowotnych, ekonomicznych i finansowych. Wzrost liczby lekoopornych szczepów obserwuje się głównie przez nieuzasadnione stosowanie i nadużywanie antybiotyków (Shallcross i Davies, 2014). Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) już w latach 90. poprzedniego wieku uznała, że problem antybiotykooporności stał się zagrożeniem globalnym, a znalezienie nowych metod terapeutycznych stało się pilną potrzebą w odpowiedzi na erę postantybiotykową (Zhang i wsp., 2022). Obecnie, gdy tradycyjne antybiotyki są nadużywane, odkrycie nowych terapii przeciwbakteryjnych wydaje się niezbędne do dalszego leczenia infekcji. Aktualnie, dzięki intensywnemu rozwojowi nanobiotechnologii, uważa się, że nanocząstki mogą stanowić środki terapeutyczne przeciwko erze oporności na antybiotyki (Fatima i wsp., 2021). Nanostruktury są środki przeciwdrobnoustrojowe, ponieważ stosowane jako wykazują wiele mechanizmów działania, w przeciwieństwie do tradycyjnych antybiotyków, których działanie opiera się zazwyczaj na interakcji z jednym celem molekularnym (Garg i wsp., 2022; L. Wang i wsp., 2017; Yougbare i wsp., 2019). Jak zostało wspomniane wcześniej, nanostruktury wykazują toksyczność w stosunku do komórek bakterii na co wpływa wiele aspektów takich jak: stężenie, rozmiar, chemia powierzchni czy stabilność koloidalna (Gatoo i wsp., 2014). Aktywność antybakteryjna nanocząstek odnosi się głównie do nanocząstek metali, między innymi: nanocząstek srebra (AgNPs), złota (AuNPs), cynku (ZnNPs), miedzi (CuNPs) i żelaza (FeNPs) (Dadi i wsp., 2019; Gabrielyan i wsp., 2019; Tiwari i wsp., 2018; Yin i wsp., 2020; Y. Zhang i wsp., 2015). Toksyczność nanocząstek opiera się m.in. na mechanicznym uszkodzeniu ściany i błony komórkowej, wydzielaniu jonów i aktywacji stresu oksydacyjnego (Huh i Kwon, 2011).

Zewnętrzna powierzchnia bakterii ma kluczowe znaczenie w interakcji między komórką a otaczającym ją środowiskiem, w tym z nanocząstkami (Wilson i wsp., 2001). Peptydoglikan jest jednym z podstawowych składników struktury ściany komórkowej. Ściana komórkowa obu rodzajów bakterii posiada ujemnie naładowaną powierzchnię. Bakterie Gram-dodanie posiadają w ścianie komórkowej siatkę składającą się z liniowych łańcuchów reszt N-acetyloglukozaminy (NAG) i kwasu N-acetylomuraminowego (NAM) połączonych pomiędzy sobą sekwencją kilku aminokwasów, a dodatkowo obecne są kwasy tejchojowe z licznymi grupami fosforanowymi. Pomimo znacznie cieńszej ściany komórkowej, którą charakteryzują się bakterie Gram-ujemne, ma ona skomplikowaną budowę ze względu na obecność fosfolipidów błony zewnętrznej. Zawiera ona częściowo fosforylowane lipopolisacharydy, które dodatkowo zwiększają powierzchniowy ładunek ujemny (Sánchez-López i wsp., 2020). Ściana komórkowa pełni ważną rolę w funkcjonowaniu komórki bakteryjnej, zabezpiecza błonę komórkową oraz chroni wnętrze komórki przed niesprzyjającymi warunkami. Ze względu na ujemny ładunek ściany komórkowej bakterii, łatwiej wytwarzane są oddziaływania elektrostatyczne z dodatnio naładowanymi nanoczastkami. Kontakt nanoczastek ze ścianą komórkową skutkuje jej depolaryzacją, modyfikując pierwotnie ujemny ładunek i sprawia, że staje się ona bardziej przepuszczalna (Franco i wsp., 2022).

Reakcje biochemiczne metabolizmu bakterii dostarczają składników strukturalnych i funkcjonalnych, a także energii niezbędnej do procesów życiowych (Prakasham i Kumar, 2019). Zmiany w metabolizmie energetycznym są z kolei związane z innymi procesami komórkowymi, takimi jak pobieranie składników odżywczych lub wydalanie toksycznych związków (Ward, 2015). Zależności energetyczne wyjaśnia powszechnie znana teoria Mitchella, zgodnie z którą "nienaruszona" błona służy jako pompa protonowa, w której podczas transportu elektronów zachodzi reakcja wytłaczania protonów i generowana jest energia. Energia ta jest ściśle związana z syntezą adenozyno-5'-trifosforanu (ATP) (Jurtshuk, 1996).

Jak zostało wspomniane wcześniej, nanocząstki oddziałują z komórkami bakterii na wiele różnych sposobów. Uznaje się jednak, że generowanie stresu oksydacyjnego oraz uwalnianie jonów, które następnie są przenoszone do wnętrza komórek, powoduje oddziaływanie z jej strukturami np. poprzez reagowanie z grupami funkcyjnymi białek i kwasów nukleinowych. Generowanie stresu oksydacyjnego wywołanego reaktywnymi formami tlenu (ROS) może być równoważone przez antyoksydacyjne mechanizmy komórkowe. Jednak przy pewnym stężeniu, nadmiar ROS może prowadzić do uszkodzeń komórkowych (Wahab i wsp., 2023). W związku z tym, mechanizm generowania ROS powiązany jest także z innymi mechanizmami; uszkodzeniami ściany i błony komórkowej, co ułatwia nanocząstkom niszczenie różnych elementów składowych komórki, skutecznie ją zabijając (Slavin i wsp., 2017). Również płatkowe nanostruktury węglowe takie jak GN czy GO mogą generować stres oksydacyjny, a uszkodzenia jakie powstają pod wpływem ROS (tj. dezaktywacja białek i lipidów) sprawiają, że komórki bakterii nie mogą się dalej rozmnażać. Co więcej, ze względu na swoją budowę, materiały grafenowe mogą działać jako akceptory elektronów i pobierać elektrony z błony bakteryjnej, zagrażając jej integralności. Oprócz tego, wspomniane nanomateriały są w stanie uszkadzać komórkę już przy pierwszym zetknięciu – poprzez mechaniczne uszkodzenie ostrymi krawędziami (Kumar i wsp., 2019).

Model bakterii planktonicznych był pierwszym, który pozwolił naukowcom rozpocząć prace nad środkami przeciwdrobnoustrojowymi. Umożliwiło to produkcję biocydów, które mogą zwalczać bakterie (Rabin i wsp., 2015). Jednakże, w warunkach naturalnych większość gatunków bakterii występuje w złożonej wielokomórkowej społeczności nazywanej biofilmem (Berlanga i Guerrero, 2016). Narodowe Instytuty Zdrowia (NIH) ogłosiły, że ponad 80% chorób bakteryjnych jest wywoływanych przez

biofilmy. Większość bakterii może tworzyć strukture biofilmu zarówno na powierzchniach biotycznych, jak i abiotycznych, w tym na urządzeniach medycznych lub wszczepianych, ale także w drogach moczowych i oddechowych oraz na skórze. W tym stanie komórki bakteryjne nie są zwalczane przez komórki układu odpornościowego (Mirzaei i wsp., 2020). Choć większość bakterii występuje w formie biofilmu, który jest bardziej skomplikowany i znacznie różni się od struktury komórek planktonicznych (Saleh i wsp., 2015), tworzenie biofilmu rozpoczyna się jednak od przylegania swobodnie pływających komórek bakterii planktonicznych do powierzchni (Han i wsp., 2017). Bakterie w formie planktonicznej są od 10 do 1000 razy mniej oporne niż bakterie w formie biofilmu. Istnieją jednak pewne strategie, które pomagają niszczyć strukturę biofilmu, a także znajdujące się w nim komórki bakteryjne. Należą do nich między terapie fotodynamiczne i innymi fototermiczne, peptydy przeciwdrobnoustrojowe, jak również nanocząstki (Lin i wsp., 2021).

Komórki formujące biofilm są zagnieżdżone w zewnątrzkomórkowej polimerowej matrycy (EPS), która składa się głównie z wysoce uwodnionych biopolimerów, co zapewnia zatrzymanie wody w przestrzennej strukturze matrycy. Nie jest to jedyny składnik EPS - obecne są także polisacharydy, lipidy, białka oraz zewnątrzkomórkowe DNA (eDNA) (Flemming i wsp., 2007). Umiejscowienie komórek w biofilmie skutkuje ich nierównomiernym ułożeniem wielowarstwowym, a komórki znajdujące się na spodzie biofilmu wykazują mniejszą aktywność metaboliczną, co dodatkowo sprawia, że są bardziej tolerancyjne na niesprzyjające warunki środowiska (Pinto i wsp., 2020). Środki antybakteryjne mogą być transportowane w obrębie biofilmu dzięki kanałom wodnym, które umożliwiają dotarcie substancji do dolnych warstw biofilmu. Niemniej jednak, struktura biofilmu pozostaje w ciągłej rearanżacji, tworząc wypełnione wodą pory, w których środki antybakteryjne mogą być z kolei rozcieńczane wykazując słabsze działanie (Quan i wsp., 2022). Biorąc pod uwagę złożoność struktury biofilmu, obecnie proponowane są dwa typy strategii antybiofilmowych – aktywna, w której stosowane są środki antybakteryjne bezpośrednio w celu zniszczenia EPS i komórek bakterii w strukturze biofilmu, oraz pasywna – w której środki antybakteryjne są umieszczane na danej powierzchni uniemożliwiając osiadanie komórek i dalej uformowanie biofilmu (Balaure i Grumezescu, 2020). Nanocząstki łączą obie strategie – z jednej strony są w stanie zapobiegać formowaniu biofilmu, z drugiej niszczą jego komórki, a tym samym całą strukturę, nawet gdy jest ona dojrzała (Hosnedlova i wsp., 2022).

Zastosowanie nanocząstek w testach *in vitro* jest szczególne ważne i przydatne w celu ustalenia działania nanocząstek, choć uzyskane wyniki mogą sugerować inny efekt niż te same substancje w testach *in vivo* (Medici i wsp., 2021). Z tego względu, użycie substancji w formie nanometrycznej niesie za sobą pewne ograniczenia. Największym z nich jest toksyczność w stosunku do komórek i tkanek ssaków, co może objawiać się reakcjami alergicznymi i stanami zapalnymi w obrębie organizmu, zwłaszcza, że nanocząstki niewielkich rozmiarów są w stanie przenikać przez barierę krew-mózg oraz akumulują się w organach (Girma, 2023).

## 5. Hipoteza badawcza, cel i zakres pracy

## Hipoteza badawcza

Materiały grafenowe będące strukturą płaską o dużej powierzchni aktywnej stanowią platformę dla nanocząstek metali zabezpieczając je przed agregacją i zwiększając kontakt z powierzchnią komórki bakteryjnej. Materiały grafenowe dodatkowo prowadzą do immobilizacji komórek bakteryjnych. Nanokompozyty składające się z materiałów grafenowych dekorowanych nanocząstkami metali prowadzą do mechanicznych uszkodzeń ściany i błony komórkowej, zablokowania oddychania i transferu elektronów, zaburzając prawidłowy metabolizm bakterii i powodując zniszczenie komórek. Ze względu na uszkodzenia w komórkach bakterii, nanokompozyty powodują zaburzenia formowania biofilmu.

#### Podstawowy cel naukowy

Celem pracy było określenie potencjalnych właściwości antybakteryjnych nanokompozytów składających się z materiałów grafenowych (GN, GO) dekorowanych nanocząstkami metali (AgNPs, CuNPs, ZnONPs) w stosunku do komórek bakterii gatunków takich jak: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *L. monocytogenes* i *E. cloacae* oraz określenie mechanizmu ich działania. Ponadto, badania miały na celu określenie właściwości fizykochemicznych wytworzonych nanokompozytów, które mogą mieć wpływ na wywoływaną toksyczność.

#### Szczegółowe cele naukowe

- Celem doświadczenia I było określenie właściwości antybakteryjnych nanokompozytu składającego się z GO z dodatkiem AgNPs w stosunku do dwóch gatunków bakterii: *S. aureus* oraz *P. aeruginosa*. Dodatkowym celem był wybór stężenia poszczególnych nanostruktur do doświadczenia III.
- 2. Celem doświadczenia II było określenie właściwości antybakteryjnych trójkomponentowych nanokompozytów składających się z GO lub GN z dodatkiem CuNPs i ZnONPs w stosunku do czterech gatunków bakterii: *S. aureus, S. enterica, L. monocytogenes* i *E. cloacae.* Dodatkowym celem był wybór materiału grafenowego do doświadczenia III.
- 3. Ze względu na wykazanie właściwości antybakteryjnych nanocząstek

w doświadczeniach I i II, celem doświadczenia III było określenie wpływu wytworzonych nanokompozytów GOAg, GOCu, GOZnO na formowanie biofilmu trzech gatunków bakterii: *S. aureus, S. enterica* oraz *P. aeruginosa*, jak również określenie właściwości wytworzonych nanokompozytów.

#### Zakres pracy

- Charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek metalicznych (AgNPs, CuNPs, ZnONPs) oraz nanomateriałów węglowych (GN, GO) i wytworzonych z nich nanokompozytów za pomocą analizy potencjału zeta, średnicy hydrodynamicznej, FT-IR, EDX oraz wizualizacji przy użyciu TEM.
- 2. Charakterystyka powierzchni wybranych nanofilmów otrzymanych z wytworzonych nanokompozytów w formie hydrokoloidów przy użyciu AFM oraz STEM.
- Analiza toksyczności nanostruktur za pomocą określenia liczby jednostek tworzących kolonie, metody dyfuzyjno-studzienkowej, analizy żywotności i aktywności metabolicznej z użyciem testów: XTT, PrestoBlue.
- 4. Określenie zmian morfologicznych komórek bakterii przy użyciu TEM oraz SEM.
- Określenie wpływu nanostruktur na zmiany w obrębie komórek bakterii poprzez analizę poziomu ROS, TEAC oraz ATP, jak również analizę integralności błony komórkowej za pomocą testów LDH i MDA.
- 6. Określenie właściwości antybakteryjnych czterech rodzajów materiałów włókienniczych (bawełna, jedwab, polipropylen, flizelina) funkcjonalizowanych nanokompozytami GOAg w stosunku do dwóch gatunków bakterii *S. aureus* i *P. aeruginosa*.
- 7. Analiza angiogenezy na materiałach włókienniczych funkcjonalizowanych nanokompozytem GOAg z wykorzystaniem modelu CAM.
- Określenie zmian w ekspresji cytokin prozapalnych w linii komórkowej HFFF2 poddanych ekspozycji nanostruktur (GN, GO, CuNPs, ZnONPs, GNCuZnO, GOCuZnO), z użyciem membran antygenowych.
- 9. Analiza formowania i zmian w strukturze biofilmu wytworzonego przez trzy gatunki bakterii: *S. aureus, S. enterica* i *P. aeruginosa* na nanofilmach, za pomocą barwienia fioletem krystalicznym, analizy przy użyciu SEM i mikroskopii konfokalnej.

## 6. Materiały stosowane w badaniach

## 6.1. Nanostruktury

W przeprowadzonych badaniach zostały wykorzystane materiały grafenowe oraz nanocząstki metaliczne:

## Doświadczenie I:

- Hydrokoloid GO pozyskany z Advanced Graphene Products (Zielona Góra, Polska), w wyjściowym stężeniu 4 mg/ml; stosowane stężenie końcowe 5 μg/ml,
- Hydrokoloid AgNPs pozyskane z Nano-Tech (Warszawa, Polska), w wyjściowym stężeniu 100 μg/ml; stosowane stężenie końcowe 25 μg/ml.

## Doświadczenie II:

- CuNPs, ZnONPs, GN w formie proszku zostały pozyskane z SkySpring Nanometerials (Houston, TX, USA); stosowane stężenia końcowe: CuNPs 25 μg/ml, ZnONPs 100 μg/ml, GN 10 μg/ml,
- Hydrokoloid GO pozyskany z Advanced Graphene Products (Zielona Góra, Polska), w wyjściowym stężeniu 4 mg/ml; stosowane stężenie końcowe 10 μg/ml.

## Doświadczenie III:

- Hydrokoloidy AgNPs, CuNPs zostały pozyskane z Nano-Tech (Warszawa, Polska), w wyjściowym stężeniu AgNPs 100 μg/ml, CuNPs 50 μg/ml; stosowane stężenia końcowe: AgNPs 25 μg/ml, CuNPs 12,5 μg/ml,
- ZnONPs w formie proszku z SkySpring Nanomaterials (Houston, TX, USA), stosowane stężenie końcowe 50 μg/ml,
- Hydrokoloid GO z Advanced Graphene Products (Zielona Góra, Polska), w wyjściowym stężeniu 4 mg/ml; stosowane stężenie końcowe 10 μg/ml.

## 6.2. Materiał biologiczny

W prowadzonych badaniach użyty został materiał biologiczny in vitro:

## Doświadczenie I:

- Szczepy bakteryjne *P. aeruginosa* (American Type Culture Collection (ATCC) 27853) i *S. aureus* (ATCC 25923) pozyskane z LGC Standards (Łomianki, Polska), które do doświadczeń hodowane były na podłożu Mueller-Hinton broth (Biomaxima, Lublin, Polska) w temperaturze 37°C.
- Model CAM zapłodnione jaja kurze (linia Ross 308) pozyskane zostały z wylęgarni (Marylka, województwo Mazowieckie, Polska).

## Doświadczenie II:

- E. cloacae (ATCC BAA-2341), L. monocytogenes (ATCC 19111), S. enterica (ATCC 13076) i S. aureus (ATCC 25923) pozyskane z LGC Standards (Łomianki, Polska), które do doświadczeń hodowane były na podłożu tryptic soy agar (TSA) (S. aureus i S. enterica), oraz brain heart agar (BHA) (L. monocytogenes i E. cloacae) w temperaturze 37°C.
- Linia komórkowa HFFF2 (ATCC, Manassas, VA, USA) hodowana była na podłożu Dulbecco's modified Eagle's culture medium (DMEM, Gibco), zawierającym 10% dodatku płodowej surowicy bydlęcej (*ang.* fetal bovine serum, FBS, Life Technologies, Houston, TX, USA), oraz 1% mieszaninę antybiotyku penicylina (100 U/ml) i streptomycyna (100 µg/ml) (Life Technologies). Hodowla prowadzona była w 37°C w obecności 5% CO<sub>2</sub> oraz wilgotności 95%.

Doświadczenie III:

S. aureus (ATCC 25923), S. enterica (ATCC 13076), P. aeruginosa (ATCC 27853) pozyskane z LGC Standards (Teddington, GB) hodowane na podłożach: TSA (Biomaxima, Lublin, Poland) dla S. aureus i P. aeruginosa oraz BHA (Biomaxima, Lublin, Poland) dla S. enterica. Hodowla prowadzona była w warunkach standardowych w temperaturze 37°C.

#### 7. Metodyka badań

#### Przygotowanie nanokompozytów i nanofilmów

W doświadczeniu I wykorzystane zostały nanostruktury takie jak GO i AgNPs. Przygotowane zostały hydrokoloidy o stężeniach GO 5 μg/ml i AgNPs 25 μg/ml w ultraczystej wodzie w sterylnych warunkach. Nanocząstki zostały poddane sonikacji przez 30 min przy użyciu płuczki ultradźwiękowej (Ultron, Dywity, Polska). Nanokompozyty zostały utworzone poprzez zmieszanie dwóch składników i pozostawienie ich (wymuszona samoorganizacja) na 15 minut w temperaturze 25°C. Końcowe stężenia nanokompozytów wynosiły odpowiednio GO 5 μg/ml + AgNPs 25 μg/ml.

W doświadczeniu II wykorzystane zostały nanostruktury: GN, GO, CuNPs, ZnONPs. Przygotowane zostały roztwory o stężeniach GN i GO 10 µg/ml, CuNPs 25 µg/ml i ZnONPs 100 µg/ml w ultraczystej wodzie w sterylnych warunkach. Nanocząstki były sonikowane przy zastosowaniu następujących parametrów 500 W, 20 kHz, 2 min przy użyciu płuczki ultradźwiękowej VC 505 Vibra-Cell<sup>TM</sup> Ultrasonic Liquid Processor (Sonics i Materials, Newton, CT, USA). Nanokompozyty zostały utworzone poprzez zmieszanie trzech składników, których końcowe stężenia wynosiły odpowiednio GN 10 µg/ml + CuNPs 25 µg/ml + ZnONPs 100 µg/ml oraz GO 10 µg/ml + CuNPs 25 µg/ml + ZnONPs 100 µg/ml. W przypadku nanokompozytów, uprzednio sonikowane składniki były pozostawione na 15 minut w temperaturze 25°C w celu połączenia poprzez samoorganizację.

W doświadczeniu III wykorzystane zostały nanostruktury: GO, AgNPs, CuNPs, ZnONPs. Przygotowane zostały roztwory o stężeniach GO 5 µg/ml, AgNPs 25 µg/ml, CuNPs 12,5 µg/ml i ZnONPs 50 µg/ml w ultraczystej wodzie w sterylnych warunkach. Nanocząstki zostały poddane sonikacji przy zastosowaniu następujących parametrów: 500 W, 20 kHz, 2 min przy użyciu płuczki ultradźwiękowej VC 505 Vibra-Cell<sup>™</sup> Ultrasonic Liquid Processor (Sonics i Materials, Newton, CT, USA). Nanokompozyty zostały utworzone poprzez zmieszanie GO z poszczególnymi nanocząstkami metali umożliwiając otrzymanie nanokompozytów dwuskładnikowych, których końcowe stężenia wynosiły odpowiednio GO 5 µg/ml + AgNPs 25 µg/ml, GO 5 µg/ml + CuNPs 12,5 µg/ml i GO 5 µg/ml + ZnONPs 50 µg/ml. W przypadku nanokompozytów, uprzednio sonikowane składniki były pozostawione na 15 minut w temperaturze 25°C w celu połączenia poprzez samoorganizację. Następnie w celu usunięcia niezwiązanych nanocząstek, nanokompozyty odwirowano (12 000 rpm, 10 min), supernatant odrzucono, a uzyskany pellet zawieszono w sterylnej, ultraczystej wodzie. Nanofilmy zostały utworzone poprzez jednorazowe pokrycie dna dołków płytek hodowlanych nanokompozytami i ich składowymi, a następnie pozostawienie do całkowitego wysuszenia w warunkach sterylnych w temperaturze pokojowej.

#### Charakterystyka nanostruktur

W doświadczeniu I i II wykonano analizę ultrastruktury wybranych nanostruktur za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEM-1220 (TEM, Joel, Tokio, Japonia). Dodatkowo przeprowadzona została analiza potencjału zeta oraz średnicy hydrodynamicznej za pomocą ZetaSeizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK). Analizowane nanostruktury zawieszono w wodzie ultraczystej doprowadzając do stężeń: GO 5 µg/ml, AgNPs 25 µg/ml oraz nanokompozyt GO 5 µg/ml + AgNPs 25 µg/ml (doświadczenie I), oraz GN 10 µg/ml, GO 10 µg/ml, CuNPs 25 µg/ml, ZnONPs 100 µg/ml i nanokompozyty GN 10 µg/ml + CuNPs 25 µg/ml + ZnONPs 100 µg/ml i GO 10 µg/ml + CuNPs 25 µg/ml + ZnONPs 100 µg/ml (doświadczenie II). Pomiar potencjału zeta został wykonany przy użyciu metody elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS, ang. electrophoretic light scattering), a pomiar średnicy hydrodynamicznej metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS, ang. dynamic light scattering). Wszystkie pomiary wykonywane były w temperaturze 25°C. Dodatkowo nanostruktury zostały przeanalizowane za pomocą spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni (FT-IR) używając spektrometru Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

W doświadczeniu III wykonana została analiza ultrastruktury nanostruktur za pomocą STEM (FEI, Hillsboro, OR, USA). Ponadto przeprowadzona została analiza potencjału zeta oraz średnicy hydrodynamicznej za pomocą ZetaSeizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK). Analizowane nanostruktury były zawieszone w wodzie ultraczystej doprowadzając do stężeń: GO 5 µg/ml, AgNPs 25 µg/ml, CuNPs 12,5 µg/ml, ZnONPs 50 µg/ml, a także nanokompozyty GO 5 µg/ml + AgNPs 25 µg/ml, GO 5 µg/ml + CuNPs 12,5 µg/ml i GO 5 µg/ml + ZnONPs 50 µg/ml. Pomiar potencjału zeta został wykonany przy użyciu metody ELS, a pomiar średnicy hydrodynamicznej metodą DLS. Pomiar potencjału zeta został wykonany bezpośrednio po przygotowaniu nanokompozytów (w czasie 0 h), oraz po 8, 12, 24 i 48 h. Wszystkie pomiary wykonywane były w temperaturze pokojowej. Dodatkowo we współpracy z Wojskową Akademią Techniczną, przeprowadzona została analiza EDX (*ang.* Energy Dispersive Analysis of X-Ray) za pomocą SEM (Quanta 250 FEG SEM, FEI, Hillsboro, OR, USA). Wspomniana analiza została przeprowadzona także w celu określenia związania nanocząstek z GO, a pomiar wykonano zarówno dla supernatantu (niezwiązane nanocząstki) jak i pelletu (wytworzone nanokompozyty). Powierzchnie wytworzonych nanofilmów zostały scharakteryzowane poprzez AFM (*ang.* atomic force microscopy; NT-MDT Spectrum Instruments, Moskwa, Rosja).

#### Przygotowanie szczepów bakteryjnych do badań

Badane szczepy przechowywano w temperaturze –20°C w bulionie odżywczym z dodatkiem 20% (*v*/*v*) glicerolu. Przed użyciem szczepów w trakcie prowadzenia eksperymentów, zostały one rozmrożone i przepłukane trzykrotnie sterylną wodą destylowaną w celu usunięcia resztek glicerolu. Następnie szczepy były wysiewane na podłoża wskazane w powyższym rozdziale. Hodowle prowadzone były w temperaturze 37°C przez 24 h. Przed użyciem w poszczególnych doświadczeniach, zawiesina bakterii była przygotowywana w sterylnej soli fizjologicznej dostosowując gęstość optyczną do wymaganej wartości w skali McFarlanda.

#### 7.1. Układ doświadczeń

Podczas realizacji pracy doktorskiej, przeprowadzone zostały trzy doświadczenia (Rycina 1). Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na ocenę właściwości fizykochemicznych nanostruktur oraz wytworzonych z nich nanokompozytów, a następnie na ocenę potencjalnej toksyczności w stosunku do szczepów bakteryjnych takich jak: *S. aureus, P. aeruginosa, S. enterica, L. monocytogenes, E. cloacae* w formie planktonicznej, oraz dla wybranych gatunków na uformowanym biofilmie. Dodatkowo przeprowadzone zostały badania z zakresu toksyczności na modelu CAM i na linii komórkowej HFFF2.





#### 7.1.1. Doświadczenie I (Publikacja 1: Lange i wsp., 2022)

Celem doświadczenia I było określenie wpływu i działania nanokompozytu GOAg oraz jego składowych na dwa gatunki bakterii: *S. aureus* i *P. aeruginosa*. Schemat przeprowadzonego doświadczenia został przedstawiony na rycinie 2.





W celu wyboru stężeń GO, AgNPs oraz GOAg do dalszych badań, przeprowadzony został pomiar strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów przy użyciu metody dyfuzyjno-studzienkowej, w której dwa gatunki bakterii *S. aureus* i *P. aeruginosa* poddane były ekspozycji GO w stężeniach 10 i 5 µg/ml, AgNPs 50, 25, 10, 5, 2,5 µg/ml oraz GOAg, w dwóch wariantach GO 5 µg/ml + AgNPs 25 µg/ml oraz

GO 10 µg/ml + AgNPs 25 µg/ml. Aby potwierdzić wybór stężeń, dodatkowo przeprowadzana została analiza aktywności metabolicznej (XTT; Cell Proliferation Kit II, Merck, Darmstadt, Niemcy). W celu określenia zmian, które mogą zachodzić w komórkach bakterii przeprowadzona została analiza generowania reaktywnych form tlenu (ROS; Fluorometric Intracellular Ros Kit, Sigma, St Louis, MO, USA), analiza peroksydacji lipidów (MDA; MDA assay kit, Sigma, St Louis, MO, USA) oraz wizualizacja ultrastruktury komórek za pomocą TEM. W wymienionych testach komórki bakterii były poddane ekspozycji GO 5 µg/ml, AgNPs 25 µg/ml oraz GOAg (GO 5 µg/ml + AgNPs 25 µg/ml). Wyniki testów XTT, ROS oraz MDA zostały zmierzone spektrofotometrycznie.

W celu określenia potencjalnego komercyjnego zastosowania nanokompozytów, przeprowadzona została analiza czterech rodzajów materiałów włókienniczych (bawełna, jedwab, polipropylen, flizelina), które funkcjonalizowane były nanokompozytem GOAg poprzez sonikację (Ultron, Dywity, Polska) przez 30 minut. Analiza została przeprowadzona zgodnie z Polską Normą ISO 20645:2004 pt." Płaskie wyroby włókiennicze. Wyznaczanie aktywności antybakteryjnej. Metoda dyfuzji na płytce z agarem.". Badanie zostało przeprowadzone w stosunku do dwóch gatunków bakterii (S. aureus i P. aeruginosa), co pozwoliło określić działanie antybakteryjne powlekanych materiałów włókienniczych. W celu określenia wpływu powlekanych materiałów włókienniczych, wytworzonym wcześniej nanokompozytem, na angiogenezę, podobnie powlekane inserty materiałowe zostały umieszczone na błonie kosmówkowoomoczniowej zarodka kury w szóstym dniu rozwoju zarodka. Do tego czasu zapłodnione jaja były utrzymywane w warunkach standardowych tj. w temperaturze 37°C z wilgotnością 60%, obracane raz na godzinę. W siódmym dniu inserty zostały wycięte i przeprowadzona została analiza mikroskopowa (SZX10, Olympus Corporation, CellD software version 3.1, Tokyo, Japonia). Angiogeneze mierzono na podstawie gestości i długości naczyń krwionośnych, które utworzyły się na powierzchni implantu przy użyciu oprogramowania ImageJ (National Institutes of Health, USA) w wersji 1.50e z wtyczką Vessel analyzer.

Wszystkie uzyskane dane liczbowe zostały opracowane statystycznie za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc HSD Tukey'a z założeniem różnic istotnych statystycznie na poziomie  $p \le 0,05$  używając programu GraphPad Prism 9 (wersja 9.2.0, San Diego, CA, USA).

#### 7.1.2. Doświadczenie II (Publikacja 2: Lange i wsp., 2022)

Celem doświadczenia II było określenie wpływu i działania nanokompozytów trójskładnikowych GNZnOCu oraz GOZnOCu oraz ich składowych na cztery gatunki bakterii: *E. cloacae, L. monocytogenes, S. enterica* i *S. aureus*. Schemat przeprowadzonego doświadczenia został przedstawiony na rycinie 3.



Ryc. 3. Schemat doświadczenia II wykonanego podczas realizacji pracy doktorskiej.

Po wcześniejszym wyborze stężeń stosowanych nanostruktur, do dalszych badań zostały wytypowane następujące stężenia: GN 10 µg/ml, GO 10 µg/ml, CuNPs 25 µg/ml, ZnONPs 100 µg/ml i nanokompozyty GN 10 µg/ml + CuNPs 25 µg/ml + ZnONPs 100 μg/ml i GO 10 μg/ml + CuNPs 25 μg/ml + ZnONPs 100 μg/ml. W celu potwierdzenia toksyczności wybranych stężeń w stosunku do czterech badanych gatunków bakterii (E. cloacae, L. monocytogenes, S. enterica i S. aureus) przeprowadzona została analiza żywotności za pomocą testu PrestoBlue (Invitrogen, Waltham, MA, USA) oraz szereg rozcieńczeń prowadzący do określenia liczby jednostek tworzących kolonie. Następnie przeprowadzono analizę integralności błony komórkowej (LDH, Sigma Aldrich, Hamburg, Niemcy) i analize zawartości ATP (Sigma Aldrich, Hamburg, Niemcy) w komórkach. Podczas przeprowadzania kolejnych testów, komórki bakterii były poddane ekspozycji zarówno na nanokompozyty jak i ich pojedyncze składowe. Wyniki PrestoBlue, LDH i ATP przeprowadzonych testów zmierzone Z zostały spektrofotometrycznie.

W celu zbadania cytotoksyczności jaką mogłyby wywoływać nanokompozyty względem ludzkich komórek, przeprowadzona została analiza ekspresji 42 cytokin

prozapalnych (Abcam, Cambridge, UK) w linii komórkowej o prawidłowej morfologii HFFF2. Wyniki zostały przeanalizowane za pomocą oprogramowania ImageJ (version 1.50e, National Institutes of Health, USA) z wtyczką Protein-Array Analyzer.

Wszystkie uzyskane dane liczbowe zostały opracowane statystycznie za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc HSD Tukey'a z założeniem różnic istotnych statystycznie na poziomie  $p \le 0,05$  używając programu GraphPad Prism 9 (wersja 9.2.0, San Diego, CA, USA).

#### 7.1.3. Doświadczenie III (Publikacja 3: Lange i wsp., 2024)

Celem doświadczenia III było określenie wpływu nanokompozytów składających się z GO z dodatkiem AgNPs, CuNPs lub ZnONPs i utworzonych nanofilmów na formowanie biofilmu trzech gatunków bakterii: *S. aureus, S. enterica* oraz *P. aeruginosa*. Schemat przeprowadzonego doświadczenia został przedstawiony na rycinie 4.



Ryc. 4. Schemat doświadczenia III wykonanego podczas realizacji pracy doktorskiej.

W celu wyboru stężeń stosowanych nanostruktur do dalszych badań, przeprowadzone zostało barwienie biofilmu za pomocą fioletu krystalicznego. Płytki hodowlane zostały pokryte nanocząstkami metali (AgNPs, CuNPs, ZnONPs) oraz GO w następujących stężeniach: 0,25; 0,5; 1, 2,5; 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml i pozostawione do całkowitego wyschnięcia w warunkach sterylnych. Dołki kontrolne pokryte zostały ultraczystą wodą. Następnie dołki zostały uzupełnione pożywką hodowlaną, do której dodana została zawiesina bakterii i przygotowane w ten sposób płytki inkubowano przez 48 h w temperaturze 37°C w celu utworzenia biofilmu. Następnie usunięto formy planktoniczne, a wytworzony biofilm utrwalano metanolem i wybarwiono za pomocą fioletu krystalicznego, a całość zmierzono spektrofotometrycznie. W kolejnych etapach

przeprowadzona została dalsza analiza biofilmu za pomocą mikroskopii konfokalnej (FV-1000, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) z podwójnym barwieniem fluorescencyjnym bioflmu: DAPI (10 µl/ml, Sigma Aldrich, Hamburg, Germany) oraz Syto9 (1 µl/ml, ThermoFisher Scientific), w celu uniknięcia niespecyficznego barwienia. Biofilm bakteryjny został wytworzony na nanofilmach składających sie z nanokompozytów: GO 5 µg/ml + AgNPs 25 µg/ml, GO 5 µg/ml + CuNPs 12,5 µg/ml oraz GO 5 µg/ml + ZnONPs 50 µg/ml. Zdjęcia zostały zobrazowane jako pionowy przekrój próbek. Wykonane zdjęcia zostały przeanalizowane z użyciem oprogramowania Gimp 2.10.18, dzięki czemu określona została grubość (dane liczbowe obliczone z 5 miejsc z minimum 3 zdjęć w grupie) utworzonego biofilmu na podłożu z nanofilmów. Następnie przeprowadzona została analiza struktury utworzonego biofilmu na podłożu z nanokompozytów za pomocą SEM (SEM type FEI, Quanta 200, Jeol, Tokyo, Japan).

Ze względu na liczne zmiany zaobserwowane w strukturze biofilmu, przeprowadzona została analiza także analiza zawartości ROS (DCFDA Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit, Abcam, Cambridge, UK) oraz całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (*ang*. Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC, OxiSelect<sup>™</sup> Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay Kit (ABTS), Cell Biolabs Inc, San Diego, California, USA). Wyniki zostały zmierzone spektrofotometrycznie.

Wszystkie uzyskane dane liczbowe zostały opracowane statystycznie za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc HSD Tukey'a z założeniem różnic istotnych statystycznie na poziomie  $p \le 0,05$  używając programu GraphPad Prism 9 (wersja 9.2.0, San Diego, CA, USA).

## 8. Omówienie głównych wyników przeprowadzonych doświadczeń

8.1. Doświadczenie I: Określenie wpływu i działania nanokompozytu GOAg oraz jego składowych na dwa gatunki bakterii: *S. aureus* i *P. aeruginosa* (Publikacja 1: Lange i wsp., 2022).

Doświadczenie I rozpoczęto od analizy fizykochemicznej stosowanych nanostruktur. Analiza ultrastruktury wykazała, że GO występował w formie płatków o dużej powierzchni, natomiast AgNPs charakteryzowały się kształtem kulistym oraz dużymi utworzonymi aglomeratami. Połączenie dwóch składników – GO i AgNPs skutkowało rozłożeniem AgNPs na powierzchni GO. Analiza potencjału zeta, który świadczy o stabilności koloidalnej, wykazała, że połącznie dwóch komponentów skutkowało stabilizacją - wartość potencjału zeta była wyższa dla nanokompozytu niż dla pojedynczych składowych (GO -20.8  $\pm$  9.06; AgNPs -18.7  $\pm$  5.33; GOAg -23.6  $\pm$  8.78 (mV)). Synteza nanokompozytów zapewniających lepszą stabilizację została potwierdzona we wcześniejszych badaniach (Chen i wsp., 2015). Średnica hydrodynamiczna badanych nanomateriałów przekraczała 100 nm we wszystkich analizowanych nanostrukturach. Jednakże AgNPs znane są ze swojej tendencji do tworzenia aglomeratów (Bruna i wsp., 2021), co w przeprowadzonych badaniach potwierdził potencjał zeta (Zp) wykazując wartość najbardziej zbliżoną do 0. Choć uznaje się, że mniejsze nanocząstki są bardziej toksyczne (Sukhanova i wsp., 2018), sytuacja może być inna w przypadku nanokompozytów, w skład których wchodzą dwa (lub więcej) składniki. Wyniki uzyskane przez Truong i wsp. 2020 wykazały, że mniejsze nanokompozyty GOAg nie miały lepszego działania antybakteryjnego, ponieważ tylko zakłócały funkcjonowanie komórek bakterii, podczas gdy większe fizycznie oddzielały komórki od pożywki i pozwalały jonom srebra wnikać w strukturę komórek, zapewniając lepsze właściwości antybakteryjne (Truong i wsp., 2020). Mimo to, w eksperymentach prowadzonych przez innych badaczy, wykazane zostało, że GO jest odpowiednim nośnikiem dla nanocząstek o właściwościach antybakteryjnych takich jak AgNPs (Jaworski i wsp., 2018; Wang i wsp., 2020). Dodatkowym potwierdzeniem dla połączenia GO z AgNPs była przeprowadzona analiza FT-IR, podczas której wykazano, że widma nanokompozytów GOAg wyrażają złożone cechy dwóch pojedynczych widm. We wszystkich widmach zaobserwowane zostały widma odpowiadające grupom: -OH, -CH, a dodatkowo wynikające z obecności GO wiązania: C=O, C-O i C-OH.

W celu określenia właściwości antybakteryjnych stosowanych nanostruktur oraz wyboru stężeń do kolejnych badań, przeprowadzona została analiza dyfuzyjnostudzienkowa. Największe strefy zahamowania wzrostu zostały zaobserwowane w studzienkach wypełnionych AgNPs oraz nanokompozytem GOAg, a strefa zahamowania wzrostu była dawkozależna. GO nie wykazał dużej aktywności antybakteryjnej, a strefa zahamowania wzrostu w obu gatunkach bakterii (*S. aureus* i *P. aeruginosa*) wynosiła tylko 1 mm więcej niż sama studzienka. Dyfuzja nanocząstek w agarze jest utrudniona ze względu na jego konsystencję. Jednak wyniki uzyskane metodą dyfuzyjno-studzienkową, wskazujące na dużą toksyczność AgNPs, sugerują, że uwalnianie jonów srebra z AgNPs może być głównym czynnikiem odpowiedzialnym za ich działanie przeciwbakteryjne (Kourmouli i wsp., 2018). Ze względu na ograniczoną dyfuzję nanocząstek w agarze oraz duży rozmiar i płaski kształt GO, mógł on nie wykazywać efektu antybakteryjnego. Podobne wyniki zostały uzyskane w badaniach prowadzonych przez Prasada i wsp. 2017, w których zredukowany tlenek grafenu (rGO) powodował dwa razy mniejszą strefę zahamowania wzrostu niż AgNPs (Prasad i wsp., 2017). Z tego względu, do dalszych badań wybrane zostały stężenia 5 µg/ml GO oraz 25 µg/ml AgNPs, ponieważ nanokompozyty składające się z 5 µg/ml GO i 25 µg/ml AgNPs oraz 10 µg/ml GO i 25 µg/ml AgNPs wykazywały podobne działanie antybakteryjne.

Wizualizacja interakcji pomiędzy nanomateriałami i komórkami bakterii została przeanalizowana za pomocą TEM. Głównym widocznym punktem oddziaływania nanostruktur była akumulacja wokół komórek bakterii, a także na ich powierzchni, szczególnie po ekspozycji na GOAg, w przypadku którego duże płatki GO z mniejszymi kulistymi AgNPs pokrywały powierzchnię bakterii. Akumulację nanokompozytu wokół komórek bakterii potwierdzili również inni badacze (Moraes i wsp., 2015). Uzyskane wyniki wyraźnie pokazały, że nanomateriały oddziałują ze ścianą i błoną komórkową. Jednak ze względu na przygotowanie próbek, w których komórki bakterii nie były przedstawione jako przekrój, możliwe jest, że istnieje więcej punktów interakcji między nanocząstkami a bakteriami niż tylko adhezja do powierzchni warstw zewnętrznych. Jak wspomniano wcześniej, oddziaływanie nanocząstek z komórkami bakterii wiąże się z działaniem na wielu różnych poziomach, w tym z rozerwaniem ściany komórkowej i błony, generowaniem ROS i hamowaniem wzrostu (Jaworski i wsp., 2018; Singh i wsp., 2019). W celu dalszej analizy oddziaływania nanokompozytów z komórkami bakterii oraz potwierdzenia wyboru stężeń, przeprowadzono test aktywności metabolicznej XTT. Uzyskane wyniki były zgodne z uzyskanymi w metodzie dyfuzyjno-studzienkowej, sugerując, że metabolizm komórek był zahamowany po ekspozycji na zastosowane nanomateriały w sposób zależny od dawki. Bakterie poddane ekspozycji GO wykazywały nieznacznie obniżoną żywotność (97,3% u S. aureus, 98,7% u P. aeruginosa). Większe obniżenie żywotności zostało zaobserwowane w komórkach P. aeruginosa (po ekspozycji na 25 µg/ml AgNPs 31,4%, oraz po ekspozycji na GOAg 27,2%) niż S. aureus (po ekspozycji na 25 µg/ml AgNPs 33,8%, oraz po ekspozycji na GOAg 40,8%), choć wyniki te nie są tożsame, analizując wrażliwość bakterii, z wynikami z analizy dyfuzyjnostudzienkowej, w której to S. aureus charakteryzował się bardziej ograniczonym wzrostem (strefa zahamowania wzrostu dla 25 µg/ml AgNPs wynosiła 27 ± 3.8 mm, dla GOAg 28 ± 0.4 mm) niż P. aeruginosa (strefa zahamowania wzrostu dla 25 µg/ml AgNPs wynosiła 21 ± 0.7 mm, dla GOAg 23 ± 1.6 mm). Z jednej strony, cienka ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych nie zapewnia ochrony przed jonami srebra, które mogą przenikać przez ścianę niezależnie od obecności błony zewnętrznej (Pazos-Ortiz i wsp., 2017). Z drugiej strony, bakterie Gram-ujemne ze względu na błonę zewnętrzną charakteryzują się wysoko ujemnym ładunkiem i mogą odpychać ujemnie naładowane płatki GO, wskazując tym samym na wyższą żywotność niż ta, którą wykazują bakterie Gram-dodatnie. Pomimo ujemnego potencjału zeta GO, mógł on oddziaływać z komórkami bakterii Gram-dodatnich, które również charakteryzują się ujemnym ładunkiem powierzchniowym. Interakcja może zachodzić z powodu silniejszych wiązań kowalencyjnych między grupami karboksylowymi GO i aminowymi peptydoglikanu i aminokwasów (Di Giulio i wsp., 2018). Ze względu na obecność grup C-O i C-OH w GO (a tym samym w nanokompozycie na bazie GO), interakcja nanokompozytu ze ścianą komórkową wydaje się prawdopodobna.

Jak zostało wspomniane wcześniej, nanocząstki mogą generować stres oksydacyjny, podczas którego produkowane są ROS. Przekroczenie optymalnego poziomu ROS skutkuje brakiem wychwytywania przez przeciwutleniacze, które są w stanie zneutralizować ROS. W konsekwencji indukowany stres oksydacyjny jest wystarczająco wysoki, aby zacząć niszczyć komórki poprzez bezpośrednie działanie na lipidy błonowe (Quinteros i wsp., 2016). W przeprowadzonych badaniach najwyższy poziom ROS występował w grupach traktowanych nanokompozytami GOAg w obu gatunkach bakterii; jednak podczas gdy w grupach poddanych ekspozycji na AgNPs ROS osiągały podobny poziom, GO nie powodował stresu oksydacyjnego, osiągając wartości zbliżone do grup kontrolnych. Podobne wyniki zostały uzyskane w analizie peroksydacji lipidów, w której również nanokompozyt GOAg powodował największą zawartość MDA, a GO najmniejszą. Podobna zależność została potwierdzona przez Song i wsp. 2016 (Song i wsp., 2016), którzy zasugerowali, że głównym mechanizmem działania przeciwbakteryjnego GOAg jest synergia między zaburzeniem błony komórkowej a peroksydacją lipidów. Można zatem stwierdzić, że zdolność do generowania ROS powoduje również peroksydację lipidów błonowych (Chang i wsp., 2016). Interakcja między poziomami ROS i MDA została również wykazana w przypadku AgNPs
stosowanych samodzielnie (Adeyemi i wsp., 2020). Uzyskane wyniki sugerują prawdopodobny mechanizm działania nanokompozytu GOAg, który rozpoczyna się od przyłączenia się nanokompozytu do komórek i powoduje zaburzenie ściany i błony komórkowej, ale także generuje ROS i powoduje peroksydację lipidów, które ostatecznie prowadzą do śmierci komórek bakteryjnych.

Popularność tkanin wynika z wszechstronnego zakresu zastosowań jakie są im przypisywane, biodegradowalności oraz niskich kosztów pozyskania. Ze względu na wytwarzanie z tkanin produktów opieki zdrowotnej np. maseczek higienicznych, poszukiwane są rozwiązania umożliwiające stworzenie materiałów o właściwościach antybakteryjnych, a tym samym przezwyciężenie niektórych ich cech, w tym hydrofilowości i porowatej struktury, które sprawiają, że materiały włókiennicze są odpowiednim podłożem do wzrostu mikroorganizmów (Ouadil i wsp., 2019). W przeprowadzonych badaniach, cztery rodzaje materiałów włókienniczych (bawełna, jedwab, polipropylen, flizelina) zostały pokryte nanokompozytem GOAg, a właściwości antybakteryjne zostały określone za pomocą normy ISO 20645:2004. Zgodnie ze wspomnianą normą ISO, wyniki oceniane są na podstawie strefy zahamowania wzrostu dookoła oraz pod wysuszoną próbką. Efekt antybakteryjny określony w normie jako 'dobry', został wykazany w grupach, w których próbka wykonana była z bawełny bądź jedwabiu, co zapewniła strefa zahamowania wzrostu w zakresie 1-0 mm oraz niewielki wzrost pod próbką bawełny, i dla próbki jedwabiu odpowiednio: >1mm oraz brak wzrostu pod próbką. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami innych badawczy. Farouk i wsp. 2020 przygotowali bawełne i len pokryte nanokompozytami o wysoce antybakteryjnych właściwościach (Farouk i wsp., 2020). Podobnie zadowalający efekt został wykazany poprzez bawełnę powlekaną AgNPs osiągając strefę zahamowania wzrostu w dwóch gatunkach bakterii: S. aureus i E. coli (Shateri-Khalilabad i wsp., 2017). Ponadto, zostało wykazane, że jedwab szczególnie mocno wiąże się z AgNPs i zachowuje swoje właściwości antybakteryjne nawet po 30 płukaniach (Belda Marín i wsp., 2020). Co ciekawe, również GO jest w stanie związać się z materiałami takimi jak jedwab, za pomocą wiązań elektrostatycznych ze względu na obecność wielu grup funkcyjnych z tlenem (Zulan i wsp., 2019). W przeprowadzonych badaniach GO został użyty jako nośnik dla innych nanocząstek; jest więc prawdopodobne, że nanokompozyt związał się z jedwabiem poprzez interakcję reaktywnych grup chemicznych GO z powierzchnią jedwabiu, aczkolwiek możliwe było również związanie AgNPs, znajdującym się na powierzchni GO. Dwojakie wiązanie mogło zaowocować silnymi właściwościami antybakteryjnymi testowanych materiałów włókienniczych.

W przypadku stosowania materiałów włókienniczych lub jakichkolwiek innych materiałów szczególnie ważne jest zbadanie ich biokompatybilności. Odpowiednim sposobem badania takich właściwości jest analiza angiogenezy z wykorzystaniem modelu CAM (Zwadlo-Klarwasser i wsp., 2001), który jest szeroko stosowany jako model toksykologiczny dla różnych substancji (Ribatti, 2017). W ostatnich latach model ten stał się nawet etapem pośrednim między badaniami *in vitro* i *in vivo* na zwierzętach (Fraguas-Sánchez i wsp., 2021). Prowadzenie badań w dziedzinie toksykologii nanomateriałów jest niezwykle trudne ze względu na dużą liczbę aspektów, które należy wziąć pod uwagę, oraz fakt, że do scharakteryzowania pojedynczej substancji w konwencjonalny sposób potrzeba wielu zwierząt (Buhr i wsp., 2020). W przeprowadzonym badaniu nanokompozyt GOAg, jako czynnik wpływający na możliwe zmiany w błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury, nie powodował efektu toksycznego, o czym świadczy gęstość i długość naczyń krwionośnych w teście CAM. Wyniki nie różniły się w odniesieniu do nietraktowanych grup kontrolnych materiałów włókienniczych.

8.2. Doświadczenie II: Określenie właściwości antybakteryjnych trójkomponentowych nanokompozytów składających się z GO lub GN z dodatkiem CuNPs i ZnONPs, oraz ich składowych, w stosunku do czterech gatunków bakterii: *S. aureus, S. enterica, L. monocytogenes* i *E. cloacae* (Publikacja 2: Lange i wsp., 2022).

GN, GO, CuNPs oraz ZnONPs jako nanostruktury używane w badaniu, zostały poddane analizie fizykochemiczej. Przeprowadzona została analiza potencjału zeta oraz rozkładu wielkości, a także analiza FT-IR. Na podstawie pomiaru potencjału zeta stwierdzono, że GO oraz GN były najbardziej stabilnymi nanomateriałami, osiągając odpowiednio wartości  $-27,53 \pm 0,70$  mV oraz  $-27,40 \pm 2,67$  mV. Wartość potencjału zeta dla CuNPs wynosiła  $-19,03 \pm 0,51$  mV, a dla ZnONPs 2,32  $\pm 0,83$  mV, czyniąc ZnONPs jedynym czynnikiem stosowanym pojedynczo z dodatnim potencjałem zeta. Utworzone nanokompozyty trójskładnikowe charakteryzowały się zróżnicowanym potencjałem zeta: GOZnOCu  $-20,47 \pm 1,42$  oraz GNZnOCu  $10,56 \pm 1,34$  mV. Rozmiar nanostruktur we wszystkich analizowanych przypadkach wynosił ponad 100 nm. Największe wartości

średnicy hydrodynamicznej wykazywały nanokompozyty: GNZnOCu  $2927,00 \pm 521,67$ nm oraz GOZnOCu 3843,33 ± 472,84 nm. Jednak nanocząstki metali, CuNPs i ZnONPs, miały średnice aglomeratów wynoszące odpowiednio 682 i 2155 nm, ale oba typy cechowały się brakiem stabilności, co było widoczne w pomiarach potencjału zeta (CuNPs =  $-19,03 \pm 0.51$  mV; ZnONPs =  $2,32 \pm 0.83$  mV). Żadna z uzyskanych wartości nie przekroczyła ±30 mV, co zapewniłoby im silnie kationowy lub anionowy charakter (Clogston i Patri, 2011). Na podstawie analizy TEM, wykazane zostało, że duże aglomeraty CuNPs i ZnONPs składają się ze znacznie mniejszych nanocząstek. Kształt materiałów grafenowych był podobny do tych w innych badaniach, w których GN i GO wykazywały budowę cienkich, płaskich płatków (Aziz i wsp., 2014), z czego wynika ich większa średnica hydrodynamiczna w porównaniu do CuNPs i ZnONPs. To samo zjawisko zaobserwowano w przypadku nanokompozytów, w których GN i GO stanowiły platformę dla innych nanocząstek. Ze względu na swój kształt wykazywały one duży rozmiar w analizie DLS, która opiera się na rozpraszaniu światła, a wyniki z tej analizy są obliczane za pomocą równania Stokesa-Einsteina, którego jednym z elementów jest średnica hydrodynamiczna kulistej cząstki (Stetefeld i wsp., 2016). Z tego samego powodu nanokompozyty wykazywały największe rozmiary spośród badanych nanostruktur. Tworzenie aglomeratów z kolei wpływa na efekt biologiczny, jaki wykazują nanocząstki (Skoglund i wsp., 2017). Agregacja CuNPs może być wynikiem szybkiego utleniania w warunkach ekspozycji na działanie atmosfery (Usman i wsp., 2013). Biorąc pod uwagę przygotowanie nanocząstek, które znajdowały się w normalnych warunkach (w temperaturze pokojowej z dostępem do tlenu), CuNPs, pomimo ujemnego potencjału zeta ( $-19.03 \pm 0.51$  mV), mogły tworzyć aglomeraty przekraczające 600 nm. ZnONPs w analizie TEM również charakteryzowały się aglomeratami składającymi się z pojedynczych nanocząstek, które wykazywały zróżnicowane rozmiary. Podobne wyniki wizualizacji ZnONPs uzyskali Mendes i wsp. 2022 (Mendes i wsp., 2022). W analizie FT-IR we wszystkich grupach zaobserwowano szeroki pik między 3000 a 3650 cm<sup>-1</sup>, który jest przypisany głównie wodzie i grupom hydroksylowym (-OH). Dodatkowo zaobserwowane zostały piki odpowiadające wiązaniom C-H oraz C=C, a także C-O, C=O i C-C.

Po analizie fizykochemicznej przeprowadzona została analiza żywotności za pomocą testu PrestoBlue, w której cztery gatunki bakterii *S. aureus, S. enterica, L. monocytogenes* i *E. cloacae* zostały poddane ekspozycji na nanostruktury oraz trójskładnikowe nanokompozyty. Czynnikiem najbardziej ograniczającym żywotność gatunków bakterii Gram-ujemnych był nanokompozyt GOZnOCu (30% u S. enterica, 15% u E. cloacae), natomiast dla bakterii Gram-dodatnich (tj. L. monocytogenes i S. aureus) takim czynnikiem był nanokompozyt GNZnOCu (55% u L. monocytogenes, 54% u S. aureus). PrestoBlue jest efektywnym wskaźnikiem wzrostu i żywotności bakterii, pomimo faktu, że częściowa wrażliwość na światło i czas testu zależy od metabolizmu bakterii (Lall i wsp., 2013). Niemniej jednak, istnieją pewne doniesienia opisane wcześniej, które stwierdzają, że nanomateriały węglowe mogą powodować ponowne utlenianie rezorufiny (różowej) do resazuryny (niebieskiej) lub hiperredukcję rezorufiny (różowej) do hydrorezorufiny (bezbarwnej), co wpływa na intensywność koloru uzyskanego w teście (Breznan i wsp., 2015). Z tego względu, przeprowadzona została analiza określająca liczbę jednostek tworzących kolonie (jtk/ml), jako analiza potwierdzająca wyniki testu PrestoBlue. W przeprowadzonych badaniach wyniki uzyskane z obu analiz są zgodne i czynnikami najbardziej ograniczającymi wzrost bakterii były te same, które zostały wskazane w analizie żywotności. Materiały grafenowe nie powodowały istotnego obniżenia żywotności w większości przypadków (GN w niewielkim stopniu jedynie w S. aureus, a GO w E. cloacae, S. enterica o kilkanaście punktów procentowych w zakresie 13-18%). Podobnie nie były to czynniki hamujące wzrost bakterii na podłożu agarowym, a w niektórych przypadkach (GN w E. cloacae, GO w L. monocytogenes, S. enterica) wartość log była wyższa niż w grupie kontrolnej. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, GO i GN mogą przylegać do powierzchni bakterii i owijać się wokół niej, oddzielając je od otaczającego medium i składników odżywczych, co jest jednym z już znanych mechanizmów antybakteryjnych materiałów grafenowych (Zhang i Tremblay, 2020), ale nie powoduje to mechanicznego uszkodzenia komórek, przez co śmierć komórek nie następuje w równie dużym stopniu jak w przypadku nanocząstek metali. Ze względu na duży rozmiar oraz kształt materiałów grafenowych, mogą mieć one utrudnioną dyfuzję w agarze. W przypadku nanocząstek metali, redukcję o około 3 log jtk/ml po ekspozycji na CuNPs i ZnONPs zaobserwowano tylko w przypadku L. monocytogenes. Zmniejszenie liczby jednostek tworzących kolonie L. monocytogenes o 1 log jtk/ml odnotowano w badaniu Skowron i wsp. 2022, gdy komórki zostały poddane działaniu nanocząstek miedzi i srebra, powodując w ten sposób redukcję wzrostu o 90% (Skowron i wsp., 2022).

Inne działanie obserwuje się w przypadku nanocząstek metali, które mogą wykazywać wiele mechanizmów, w tym zaburzenie błony, obniżenie zawartości ATP i uwalnianie jonów (Slavin i wsp., 2017). Nanocząstki metaliczne ingerują w powierzchnię komórki, ponieważ jest to pierwszy punkt oddziaływania, który powoduje zakłócenie potencjału i integralności ściany i błony komórkowej z powodu wiązania elektrostatycznego. Przerwanie błony komórkowej powoduje wypływ dużej ilości cytozolu, czemu bakterie zapobiegają poprzez pompy wypływu protonów (efflux) i transport elektronów (Gold i wsp., 2018). Ze względu na powyższe, w niniejszym doświadczeniu przeprowadzona została analiza wypływu LDH oraz zawartości ATP. Uzyskano wyniki, w których nanokompozyty powodowały największy wypływ LDH w stosunku do grup kontrolnych oraz największe obniżenie zawartości ATP. Wartość wypływu LDH po ekspozycji na GOZnOCu kształtowała się na poziomie: 93,4% u S. aureus, 42,9% u S. enterica, 60,6% u L. monocytogenes i 84,0% u E. cloacae. Ekspozycja badanych gatunków bakterii na drugi ze stosowanych nanokompozytów GNZnOCu spowodowała wypływ LDH na poziomie: 77,6% u S. aureus, 38,3% u S. enterica, 80,2% u L. monocytogenes i 49,7% u E. cloacae. Podczas przeprowadzonej analizy ATP, wykazane zostało, że nanokompozyt GOZnOCu najbardziej ogranicza wytwarzanie ATP we wszystkich badanych gatunkach bakterii (o około 9000 pmol/µl) wywołując silniejszy efekt niż GNZnOCu, który był drugim w kolejności najbardziej ograniczającym czynnikiem. Badania Panda i wsp. 2018 sugerują, że podłoże GO-metal zmienia proces transferu elektronów poprzez pochłanianie elektronów ze szlaków oddechowych bakterii i modyfikację zawierających tlen grup funkcyjnych na powierzchni GO (Panda i wsp., 2018). Takie zjawisko również mogło występować w przeprowadzonych badaniach, biorąc pod uwagę fakt, że GOZnOCu wywoływał największe obniżenie zawartości ATP. ZnONPs również spowodował spadek koncentracji ATP u wszystkich gatunków, natomiast znaczący spadek w przypadku CuNPs zaobserwowano tylko u gatunków Gram-dodatnich. Aktywność antybakteryjna ZnONPs jest odwrotnie proporcjonalna do jego wielkości (Siddiqi i wsp., 2018). W niniejszym badaniu ZnONPs charakteryzował się dużym rozmiarem (średnica hydrodynamiczna aglomeratów 2155,33 nm), z tendencją do aglomeracji, co może wpływać na jego ograniczony efekt toksyczny. W teście PrestoBlue ZnONPs powodował obniżenie żywotności komórek bakterii o około 20 punktów procentowych, jak również powodował niewielki wypływ LDH. Jednakże zawartość ATP była znacznie zmniejszona. Powszechnie, w prowadzonych badaniach, ZnONPs ma dodatni ładunek

powierzchniowy, co jest zgodne z uzyskanymi wynikami, zatem łatwo połączyć go z ujemnie naładowanymi strukturami (Długosz i wsp., 2020).W przeprowadzonej analizie fizykochemicznej, ZnONPs wykazywał dodatni potencjał zeta (2,3 mV), podczas gdy zarówno bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne wykazują ładunki ujemne na powierzchni (Ren i wsp., 2020). Ze względu na mechanizm działania nanocząstek metali, które mogą uszkadzać i naruszać błonę komórkową, dodatkowy aspekt łączenia się ZnONPs ze ścianą i błoną komórkową tłumaczy uzyskane wyniki z analizy ATP. Oprócz stosowanych materiałów, niezwykle ważna jest budowa bakterii, ponieważ ich głównym punktem interakcji z jakimkolwiek środkiem antybakteryjnym jest powierzchnia zewnętrzna (Wilson i wsp., 2001). Na powierzchni bakterii występują różne struktury, które różnią się w zależności od ściany komórkowej (Gram-dodatniej i Gram-ujemnej). Kwas teichojowy (Gram-dodatnie) lub lipopolisacharydy i fosfolipidy (Gram-ujemne) są związane zarówno z zasadowymi, jak i kwasowymi grupami funkcyjnymi. Takie połączenia determinują elektrostatyczne zachowanie bakterii, szczególnie w odniesieniu do jej interakcji z różnymi czynnikami (Halder i wsp., 2015). Błona cytoplazmatyczna jest wielofunkcyjna zarówno u bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, ponieważ stanowi miejsce aktywnego transportu i składników łańcucha oddechowego, a także systemów przenoszenia energii i H+-ATPazy pompy protonowej (Salton MRJ, 1996). Z tego względu w przeprowadzonym badaniu, gdy integralność błony została zakłócona, co jest widoczne poprzez wypływ LDH, zmieniona została również zawartość ATP, ponieważ koncentracja ATP zależy od prawidłowego funkcjonowania błony. Gdy niektóre struktury dostają się do wnętrza komórki, bakterie mogą przezwyciężyć zagrożenie ze strony substancji o właściwościach antybakteryjnych, takich jak nanocząstki, poprzez zależny od energii aktywny wypływ toksycznych jonów (Hochvaldová i wsp., 2022). Oznacza to, że nawet skuteczne nanostruktury moga mieć słabsze działanie, gdy bakterie są w stanie "wypompować" zagrażające związki. Jednak aby taka sytuacja miała miejsce, błona i ściana komórkowa powinny być nienaruszone, co nie zostało zaobserwowane w przeprowadzonych badaniach. Ze względu na tak duże zmiany w zawartości ATP oraz zaburzenia integralności błony, które były obserwowane, nanokompozyty mogły wpływać na siłę protonomotoryczną (PMF), która jest elektrochemicznym lub chemiosmotycznym gradientem protonów, określanym przez aktywne pompowanie protonów i wtórne ruchy jonów (Slonczewski i wsp., 2009). PMF, generowana przez błonę komórkową, opiera się na przemieszczaniu protonów przez łańcuch transportu elektronów. Jest to niezbędne do syntezy ATP w komórkach bakterii. PMF stanowi również kluczowy element przetrwania bakterii, ale w terapii przeciwdrobnoustrojowej cel ten został w dużej mierze pominięty z obawy o toksyczność, która może mieć podobny wpływ na inne komórki (Farha i wsp., 2013).

Nanomateriały moga stanowić alternatywe dla tradycyjnych antybiotyków ze względu na wielopoziomowe działanie jakie wykazują. Kliniczne zastosowania nanocząstek nie są jednak pozbawione trudności, które związane są z metodą dostarczania danej terapii (Mubeen i wsp., 2021). Obecnie wykorzystywane są nowe metody stosowania nanocząstek, np. transfer laserowy wykorzystywany do zwalczania biofilmów (Nastulyavichus i wsp., 2020), chociaż mimo to, konieczne jest przeprowadzenie podstawowych badań dotyczących właściwości nanocząstek koloidalnych i ich interakcji z komórkami bakteryjnymi, aby móc wprowadzić nowe rozwiązania terapeutyczne. Toksyczność nanocząstek podczas ich stosowania jest kluczowym elementem w dalszych zastosowaniach dla zwierząt i ludzi. Wiele aspektów wpływa na ich interakcję z komórkami i tkankami, ze względu na unikalne właściwości nanocząstek. Ich działanie różni się w zależności od typu, dawki, właściwości fizykochemicznych nanocząstek, jak również rodzaju zastosowanej linii komórkowej. Biorac pod uwagę, że istnieje kilka aspektów, które należy wziąć pod uwagę, konkretny wpływ nanocząstek nadal nie jest w pełni zrozumiały (Ozdal i Gurkok, 2022). W celu określenia potencjalnej toksyczności w stosunku do modelu linii komórkowej HFFF2, przeprowadzona została analiza ekspresji 42 cytokin prozapalnych. Na podstawie uzyskanych wyników zidentyfikowano trzy rodzaje cytokin o podwyższonej ekspresji: TNF-β, GRO i TARC. Chociaż toksyczność nie była znacząca, biorąc pod uwagę możliwość wystąpienia szkodliwych skutków, nanomateriały powinny być dogłębnie analizowane.

TNF-β, który jest czynnikiem nekrozy nowotworów, jest również znany jako limfotoksyna. Bierze udział w proliferacji, różnicowaniu i apoptozie komórek. Jest toksyczny dla wielu komórek nowotworowych (Joo, 2011). Wzrost poziomu TNF- β zaobserwowano w przypadku stosowania CuNPs, GNZnOCu i GOZnOCu; jednak w przypadku CuNPs i GNZnOCu wzrost był najwyższy ze wszystkich próbek. TARC, znany również jako ligand chemokiny 17 (CCL17), działa jako chemoatraktant komórek T-helper-2 (Th2). Chemokina ta jest związana z niektórymi chorobami układu oddechowego, w tym astmą oskrzelową, alergicznym nieżytem nosa i eozynofilowym zapaleniem płuc (Ness i wsp., 2006). Wzrost ekspresji TARC zaobserwowano

w komórkach HFFF2, które zostały poddane działaniu CuNPs i GNZnOCu. GRO należy do rodziny chemokin, która odgrywa kluczową rolę w reakcjach zapalnych i procesach gojenia się ran, ale jest również związana z nowotworzeniem, angiogenezą i przerzutowaniem (Wang i wsp., 2006). GRO zaobserwowano w komórkach tylko po traktowaniu ich CuNPs. Uzyskane wyniki sugerują, że CuNPs włączona do kompozytu wykazuje mniej toksyczny wpływ na linię komórkową HFFF2 niż stosowana bez dodatku pozostałych nanostruktur. Inne składniki nanokompozytów (GN, GO lub ZnONPs) nie były toksyczne dla komórek HFFF2 i nie powodowały wzrostu ekspresji cytokin prozapalnych.

# 8.3. Doświadczenie III: Określenie wpływu nanokompozytów składających się z GO, AgNPs, CuNPs lub ZnONPs i utworzonych z nich nanofilmów na formowanie biofilmu trzech gatunków bakterii: *S. aureus, S. enterica* oraz *P. aeruginosa* (Publikacja 3: Lange i wsp., 2024).

Wszystkie nanostruktury (GO, AgNPs, CuNPs, ZnONPs oraz nanokompozyty GOAg, GOCu, GOZnO) stosowane w badaniu zostały poddane analizom fizykochemicznym. Przeanalizowany został potencjał zeta, na podstawie którego stwierdzono, że największą stabilność koloidalną wykazywał nanokompozyt GOAg osiągając wartość -41,7 mV. Pozostałe dwa nanokompozyty wykazywały wartości świadczące o większej stabilności niż stosowane pojedynczo CuNPs i ZnONPs (GOCu -24,8 mV; CuNPs -18,8 mV; GOZnO -12,2 mV; ZnONPs 10,8 mV). Sam GO wykazywał wartość potencjału zeta -39,6 mV. Potencjał zeta uznawany jest za parametr świadczący o stabilności koloidalnej, którą można określić gdy wartość ta zbliża się, bądź przekracza ± 30 mV.

Z tego względu, na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano wzajemną stabilizację pojedynczych składników. Co więcej, wykazane zostało, że wszystkie nanokompozyty zachowują stabilność koloidalną do 48 h, osiągając wyższe wartości potencjału zeta niż bezpośrednio po przygotowaniu nanokompozytów (po 48 h GOAg -50,5 mV; GOCu -29,3 mV; GOZnO -25,7 mV). Dekorowanie GO nanocząstkami metali może zapewnić wyjątkową wydajność w proponowanych rozwiązaniach, która opiera się na synergicznym efekcie, jaki te materiały mogą wykazywać (Iordache i wsp., 2023). Wzajemne oddziaływanie składników było widoczne także w kształcie jaki wykazywały nanokompozyty, w których GO stanowił platformę dla pozostałych nanocząstek

osadzonych na jego powierzchni. Ze względu na wielkość jaką charakteryzował się GO (>400 nm) oraz formę płatków, nanokompozyty również charakteryzowały się wielkością przekraczającą 100 nm. GOZnO był nanokompozytem o największych rozmiarach, czego przyczyną mogło być tworzenie aglomeratów na powierzchni GO, ze względu na najmniejszą stabilność koloidalną jaką wykazywały ZnO (Zp = 10,8 mV). Aglomeracja na powierzchni GO była widoczna także podczas wizualizacji STEM. Tworzenie aglomeratów (słabych wiązań pomiędzy pojedynczymi nanocząstkami) wynika z wysokiej energii powierzchni jaką wykazują pojedyncze nanocząstki (Shrestha i wsp., 2020). Aglomeraty są strukturami stosunkowo łatwymi do przezwyciężenia, ponieważ siły interakcji pomiędzy poszczególnymi cząstkami są słabymi oddziaływaniami, takimi jak siły van der Waalsa, oddziaływania elektrostatyczne czy siła solwatacji (Endres i wsp., 2021). Co więcej, istnieją doniesienia mówiące o tym, że aglomeraty nie powodują mniejszej toksyczności niż mniejsze cząstki ze względu na inne mechanizmy jakie wykazują w potencjalnej szkodliwości (Zhang i wsp., 2022).

Wykazane zostało, że równomierne rozmieszczenie nanocząstek metali na powierzchni materiałów grafenowych pozwala zapobiegać ponownemu osadzaniu grafenu na warstwach nanokompozytów (Moafi i wsp., 2022). To zjawisko tłumaczy chropowatość powierzchni nanokompozytów uzyskaną w przeprowadzonych badaniach za pomocą AFM. Powierzchnia wszystkich nanokompozytów wykazała większą chropowatość w porównaniu do samego GO. Największą chropowatością charakteryzował się nanofilm GOZnO (195 nm), co jest uzasadnione poprzez utworzenie aglomeratów przez ZnONPs na powierzchni GO. Drugim w kolejności był nanofilm GOAg ze średnią chropowatością równą 134 nm. Szorstkie powierzchnie są bardziej sprzyjające adhezji bakterii niż powierzchnie gładkie z powodu zwiększonej powierzchni oraz ochrony przed czynnikami zewnętrznymi (Schubert i wsp., 2024).

Następnie przeprowadzona została analiza rentgenowska z dyspersją energii (EDX) nanokompozytów. Wszystkie nanokompozyty wykazywały wysoką zawartość węgla i tlenu. Wysoka zawartość tlenu w GO jest związana z obecnością licznych grup zawierających tlen, takich jak grupy hydroksylowe, karbonylowe i epoksydowe, które są umieszczone na płatkach wykonanych z węgla z grupami karboksylowymi na krawędziach (Uflyand i wsp., 2021). Co ciekawe, nanokompozyt GOZnO charakteryzował się najmniejszą zawartością tlenu w porównaniu do innych

nanokompozytów, które składały się z GO z dodatkiem nanocząstek metali a nie tlenków metali, aczkolwiek wyniki te są zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy, w których ZnONPs rozmieszczony na powierzchni płatków GO powodował defekty tlenu w ich strukturze (Le i wsp., 2022). Oprócz wspomnianych wcześniej pierwiastków, nanokompozyt GOAg wykazywał również zawartość Ag, o czym świadczyło spektrum w okolicy 3 keV. Jest to zgodne z wynikami innych zespołów badawczych, jako że jest to typowy pik dla srebra (Safaepour i wsp., 2009). Również w nanokompozycie GOCu zaobserwowane zostały spektra typowe dla Cu w okolicy 8 keV oraz poniżej 1 keV. Podobne widma zostały zaobserwowane przez Guzman i wsp. 2018 (Guzman i wsp., 2018). Przeprowadzona została także analiza EDX wytworzonych nanokompozytów w stosunku do supernatantu (po odwirowaniu), w celu określenia związania się nanocząstki metali/tlenków metali z GO. Wyniki wykazały, że w supernatancie obecne były nanocząstki metali/tlenków metali w zawartości mniejszej niż 1% (wagowo), co sugeruje, że wszystkie nanocząstki były związane z GO w minimum 99%.

Generowanie reaktywnych form tlenu jest jednym z głównych mechanizmów cytotoksyczności w badaniach in vitro podczas analizy nanocząstek. Uważa się, że nanocząstki metaliczne oddziałują z błoną komórkową bakterii poprzez wydzielanie jonów, co jest głównym mechanizmem ich działania (Alavi i wsp., 2022). W przeprowadzonej analizie ROS, czynnikiem wywołującym największy stres oksydacyjny był ZnONPs dla bakterii Gram-ujemnych (P. aeruginosa i S. enterica), natomiast dla bakterii Gram-dodatniej (S. aureus) był to GOAg. Struktura komórkowa bakterii Gram-ujemnych charakteryzuje się obecnością błony zewnętrznej oraz cienką ścianą komórkową. Błona zewnętrzna jest przepuszczalna dla niewielkich, rozpuszczalnych w wodzie molekuł (Sun i wsp., 2022). Jak zostało wykazane przez Yusof i wsp. 2021 (Mohd Yusof i wsp., 2021), nanocząstki tlenku cynku uwalniają jony proporcjonalnie do czasu inkubacji. Nanokompozyt GOCu wykazywał podobny poziom generowania ROS jak pozostałe nanokompozyty, co sugeruje jego efektywne działanie. Jednym z proponowanych mechanizmów działania CuNPs również jest uwalnianie jonów, które, między innymi, oddziałują z komórkami poprzez hamowanie produkcji enzymów i białek, ale mają również wysokie powinowactwo do amin i grup karboksylowych znajdujących się na powierzchni komórek, umożliwiając bezpośrednie wiązanie się z komórkami (Kim i wsp., 2023). Zdolność przeciwutleniająca to zdolność do usuwania wolnych rodników (Bedlovičová i wsp., 2020) i jest to sumaryczna aktywność składników komórek, które chronią przed stresem oksydacyjnym i wytwarzanymi rodnikami (Liu i wsp., 2020). Nanocząstki metali mogą hamować enzymy antyoksydacyjne (tj. SOD, CAT) poprzez zmianę ich struktury drugorzędowej, co wpływa na funkcjonowanie enzymów. Oznacza to, że podczas ekspozycji komórek na nanocząstki metali, enzymy antyoksydacyjne wykazują mniejszą lub brak aktywności z powodu zmiany ich struktury. W przedstawionych analizach zdolność antyoksydacyjna była niższa w przypadku traktowania nanokompozytami niż w grupach kontrolnych (niepoddanych działaniu nanokompozytów/nanocząstek), co oznacza, że całkowita aktywność antyoksydacyjna była niższa niż w przypadku prawidłowo funkcjonujących komórek (grupa kontrolna). Co ciekawe, wszystkie nanostruktury oraz nanokompozyty powodowały wzrost ROS i obniżenie zdolności antyoksydacyjnej w bakteriach Gramujemnych, ale jednoznaczna zależność nie została zaobserwowana w *S. aureus*.

Następnie zostały wykonane analizy biofilmu. W celu wybrania odpowiednich stężeń pojedynczych nanostruktur do wytworzenia nanokompozytów o właściwościach antybiofilmowych, przeprowadzone zostało barwienie fioletem krystalicznym struktury biofilmu. Jedynym stężeniem GO, które powodowało ograniczenie formowania biofilmu i było istotne statystycznie we wszystkich gatunkach bakterii było 5 µg/ml, choć sam GO nie wykazywał silnej toksyczności. Dla wszystkich gatunków AgNPs był czynnikiem, który cechował się dawkozależną toksycznością. Stężenia niższe niż 25 µg/ml powodowały formowanie biofilmu w minimum 50%. Nanofilm CuNPs skutkował podobnymi wartościami uformowania biofilmu w stężeniach 12,5; 25; 50; 100 µg/ml. W przypadku ZnONPs formowanie biofilmu zostało zredukowane tylko w dwóch najwyższych stężeniach tj. 50 i 100 µg/ml. Nawet jeśli niektóre ze stosowanych nanostruktur nie wykazywały zamierzonego działania jakim była inhibicja formowania biofilmu, co zostało zaobserwowane w niższych stężeniach ZnONPs, istnieją metody umożliwiające efektywne działanie takich nanostruktur. Przykładowo, antybakteryjną efektywność ZnONPs w stosunku zarówno do bakterii Gram-dodatnich jak i Gramujemnych można zwiększyć poprzez łączenie z nanomateriałami węglowymi, a w szczególności z GO. Uważa się, że takie połączenie może skutkować nawet dwukrotnie zwiększoną wydajnością nanofilmu niż pojedynczo stosowane ZnONPs (Gudkov i wsp., 2021).

W celu analizy grubości i jakościowej oceny formowania biofilmu przeprowadzone zostało podwójne barwienie fluorescencyjne za pomocą dwóch barwników DAPI i Syto9. Zastosowanie dwóch barwników pozwoliło wykluczyć niespecyficzne barwienie struktur. Grubość utworzonego biofilmu była znacznie zmniejszona we wszystkich próbkach w porównaniu z grupą kontrolną. Najcieńszy biofilm został zaobserwowany na nanofilmie GOAg we wszystkich trzech testowanych gatunkach bakterii, aczkolwiek pozostałe nanofilmy (GOCu i GOZnO) również powodowały ograniczenia w formowaniu biofilmu oraz przyczyniały się do innego umieszczenia komórek, które były znacznie luźniej ułożone, nie tworząc zwartej warstwy. P. aeruginosa charakteryzował się biofilmem, w którym duża liczba komórek w górnej części nie przylegała do dolnych części osadzonych na nanofilmach. Transport nanocząstek w obrębie biofilmu może zachodzić za pomocą kanałów wodnych, co zapewnia dostarczenie nanocząstek do dolnych warstw biofilmu. Takie zjawisko jest pożądane, ponieważ zapewnia nie tylko degradację komórek w górnych warstwach, ale także niszczenie struktury od wewnątrz, gdzie komórki wykazują inne właściwości metaboliczne. W niniejszym badaniu mogło to mieć miejsce w przypadku nanokompozytów dekorowanych nanocząstkami metali, co zostało częściowo potwierdzone podczas analizy za pomocą mikroskopii konfokalnej, której wykazano, że struktura biofilmu została częściowo zdegradowana. Jednak migracja nanocząstek jest pożądana, gdy ich transport odbywa się przez kanały, podczas gdy w strukturze biofilmu występują także struktury zwane porami. Środki antybakteryjne są rozcieńczane w porach, co może osłabiać ich działanie (Quan i wsp., 2022). Wyniki przeprowadzonej analizy nie wskazują na gromadzenie się nanocząstek w porach. Jednak ze względu na ciągłą reorganizację struktury biofilmu nie można wykluczyć tego zjawiska podczas długotrwałej ekspozycji.

W celu określenia struktury wytworzonego biofilmu, przeprowadzona została analiza przy użyciu SEM. Wizualizacja komórek wykazała, że nanofilmy nie sprzyjały tworzeniu biofilmu. *S. aureus* w grupie kontrolnej wykazywał przestrzenną strukturę, którą stanowiły upakowane warstwowo komórki. Na powierzchni nanofilmów GOCu oraz GOZnO komórki również przylegały do siebie, jednak ugrupowań komórkowych było znacznie mniej niż w grupie kontrolnej. W odróżnieniu od wspomnianych powyżej nanofilmów, nanofilm GOAg skutkował obecnością jedynie kilku komórek. Podobne rezultaty zostały zaobserwowane w biofilmie wytwarzanym przez *P. aeruginosa*.

W grupie kontrolnej biofilm *P. aeruginosa* utworzył bardzo grubą i niejednorodną strukturę z dobrze rozbudowaną macierzą EPS, w której osadzone były komórki, czego nie zaobserwowano w próbkach testowych. Biofilm utworzony przez *S. enterica* na nanofilmie GOAg był podobny do tego z grupy GOZnO. Komórki wszystkich gatunków w grupie kontrolnej wykazywały prawidłową morfologię, podczas gdy w grupach testowych poszczególne komórki wykazywały zmiany w strukturze komórkowej, stając się bardziej płaskie, a nawet skurczone.

Najmniejsze zageszczenie komórek występowało na podłożu z nanofilmów GOAg i GOZnO. Co ciekawe, były to dwa nanofilmy o najwyższej chropowatości powierzchni. Wyniki te są zgodne z innymi wynikami badań Wu i wsp. 2018, które wykazały, że szorstkie powierzchnie zmniejszały liczbę żywych komórek bakteryjnych (S. aureus i P. aeruginosa zostały użyte jako modele bakteryjne) już po 4 godzinach, we wczesnych etapach tworzenia biofilmu (Wu i wsp., 2018). W przeprowadzonych badaniach, chropowata powierzchnia GOZnO przyczyniła się do mniejszej aktywności metabolicznej, a w konsekwencji do zmniejszonej żywotności komórek w porównaniu do płaskich powierzchni (Xiang i wsp., 2023). Wyniki te sugerują, że chociaż chropowate powierzchnie są uważane za bardziej sprzyjające adhezji komórek bakteryjnych, nie sprzyjają one tworzeniu biofilmów, ale tylko wtedy, gdy formy planktoniczne osiedlają się na nanofilmach. Może to być związane z dużymi odległościami między bakteriami zamieszkującymi szorstkie powierzchnie, co uniemożliwia im tworzenie trójwymiarowej struktury ze względu na niezdolność wymiany informacji poprzez quorum sensing w oparciu o sygnały chemiczne, które informują je o gęstości populacji, transferze materiału genetycznego lub syntezie metabolitów wtórnych (Preda i Săndulescu, 2019). Pomimo, że uzyskane wyniki z analizy ROS sugerują efektywne działanie antybakteryjne nanokompozytu GOCu, w tak dużym stopniu nie zostało to zaobserwowane w analizie biofilmu. Sugeruje to, że nanokompozyt GOCu może być skutecznym środkiem antybakteryjnym dla form planktonicznych, ale nie dla biofilmu. Mechanizm taki wydaje się prawdopodobny ze względu na to, że uważa się, że CuNPs wydziela jony, które bezpośrednio wiążą się z komórkami bakterii, a komórki te w biofilmie zagnieżdżone są w EPS, przez co dostęp do nich jest trudniejszy. Największe ograniczenie biofilmu w przeprowadzonych analizach miało miejsce na powierzchni nanokompozytu GOAg. Nanocząstki srebra są dobrze znane ze swoich właściwości antybakteryjnych dzięki uwalnianiu jonów, które między innymi mogą przylegać do ścian komórkowych i błon oraz przerywać struktury zewnętrzne (Yin i wsp., 2020). Co więcej, nanocząstki srebra stosowane są jako czynniki antybakteryjne od czasów starożytnych, zatem efektywność ich działania jest dobrze poznana (Bruna i wsp., 2021).

# 9. Podsumowanie

Wyniki doświadczenia I wskazują na silny potencjał antybakteryjny nanokompozytu GOAg (w stężeniu GO 5 µg/ml, AgNPs 25 µg/ml), przewyższając działanie samych AgNPs, wobec dwóch szczepów bakterii P. aeruginosa i S. aureus (żywotność po potraktowaniu P. aeruginosa i S. aureus wybranym stężeniem GOAg wynosiła odpowiednio 27% i 31% w porównaniu do samych AgNPs, gdy żywotność obu gatunków wynosiła odpowiednio 31% i 34%). Wykazane zostało, że traktowanie komórek bakterii nanokompozytem GOAg charakteryzuje się kilkoma punktami interakcji. Udowodniono, że błona i ściana komórkowa mikroorganizmów zostaje naruszona, a stres oksydacyjny i peroksydacja lipidów dodatkowo przyczyniają się do śmierci komórek. W oparciu o uzyskane wyniki, nanokompozyty GOAg są w stanie zapewnić większą stabilność koloidalną AgNPs (Zp GOAg wynosił -23,6 ± 8,78 mV, podczas gdy Zp AgNPs wynosił  $-18,7 \pm 5,33$  mV). Co więcej, materiały włókiennicze pokryte nanokompozytem GOAg wykazały doskonałe właściwości antybakteryjne, spośród których wyróżniał się jedwab. Biorąc pod uwagę powyższe fakty dotyczące skutecznego działania nanokompozytów, stwierdzono, że nanokompozyt GOAg może mieć praktyczne zastosowanie zarówno w powlekaniu materiałów włókienniczych, jak i ich niezależnym użytkowaniu, ze względu na skuteczne właściwości przeciwdrobnoustrojowe, które wykazują uzyskane nanokompozyty.

Wyniki doświadczenia II wskazują na wieloaspektowe działanie nanokompozytów trójskładnikowych. W przeprowadzonych badaniach GN i GO stanowiły platformę dla CuNPs i ZnONPs. Nanokompozyty trójskładnikowe wykazywały działanie antybakteryjne w stosunku do czterech gatunków bakterii: *S. aureus, S. enterica, L. monocytogenes* i *E. cloacae*. Nanokompozyty spowodowały zmianę integralności błony (wypływ LDH po ekspozycji na GOZnOCu kształtował się na poziomie: 93,4% u *S. aureus*, 42,9% u *S. enterica*, 60,6% u *L. monocytogenes* i 84,0% u *E. cloacae*; po ekspozycji na GNZnOCu 77,6% u *S. aureus*, 38,3% u *S. enterica*, 80,2% u *L. monocytogenes* i 49,7% u *E. cloacae*). To z kolei wpłynęło na zmiany w metabolizmie bakterii, co następnie spowodowało wyczerpanie zawartości ATP. GN i GO były najbardziej stabilnymi materiałami, osiągając wartości potencjału zeta odpowiednio:  $-27,4 \pm 2,67$  mV oraz  $-27,53 \pm 0,7$  mV, natomiast najmniejszą stabilność wykazywał ZnO (Zp = 2,32 ± 0,83 mV) oraz GNZnOCu (Zp = 10,56 ± 1,34 mV). Pomimo właściwości antybakteryjnych nanokompozytów, podczas ich ewentualnego stosowania zawsze należy brać pod uwagę ogólną toksyczność, która często wymaga dalszych badań w celu zapewnienia bezpieczeństwa. Analiza ekspresji cytokin prozapalnych wykazała nieznacznie podniesioną ekspresję kilku cytokin, jednakże zostało to zaobserwowane w przypadku CuNPs (TNF-  $\beta$ , TARC, GRO), GNZnOCu (TNF-  $\beta$ , TARC) oraz w jednej cytokinie (TNF-  $\beta$ ) w GOZnOCu.

Wyniki doświadczenia III wskazują na możliwość efektywnego połączenia nanocząstek metali z GO, który stanowi platformę i poprawia właściwości fizykochemiczne nanocząstek metali ze względu na większą stabilność koloidalną jaką wykazywały wszystkie nanokompozyty w porównaniu do stosowanych pojedynczo AgNPs, CuNPs i ZnONPs. Nanokompozyty GOAg oraz GOZnO charakteryzowały się największą chropowatością powierzchni (134 nm dla GOAg oraz 195 nm dla GOZnO). Nanokompozyty generowały stres oksydacyjny, przez co wpływały także na obniżenie zdolności antyoksydacyjnej komórek. Utworzone nanokompozyty (GOAg, GOCu i GOZnO) były skuteczne jako nanofilm ograniczający formowanie biofilmu przez trzy gatunki bakterii: S. aureus, S. enterica oraz P. aeruginosa, powodując zmiany zarówno w architekturze biofilmu, jak i grubości całej struktury. Nanokompozyt GOAg najbardziej ograniczał grubość formowanego biofilmu w stosunku do wszystkich trzech gatunków bakterii (4,41  $\pm$  1.01 µm u S. aureus, 3,46  $\pm$  0,89 µm u S. enterica, 4,08  $\pm$  1, 25  $\mu$ m u *P. aeruginosa* w stosunku do grup kontrolnych: 9,20 ± 1.62  $\mu$ m u *S. aureus*, 8,90 ± 1,54 μm u S. enterica, 19,51 ± 2,75 μm u P. aeruginosa). Jest to szczególnie ważne, ponieważ biofilmy stanowią realne zagrożenie dla zdrowia publicznego; jednak ze względu na ich złożoną strukturę są trudne do wyeliminowania i mogą utrzymywać się pomimo stosowania konwencjonalnych środków przeciwbakteryjnych.

# 10. Wnioski

 Nanokompozyty tlenku grafenu i nanocząstek srebra (GOAg) (w stężeniu GO 5 μg/ml i AgNPs 25 μg/ml) wykazują toksyczne działanie w stosunku do dwóch gatunków bakterii: *S. aureus* i *P. aeruginosa* poprzez zahamowanie ich wzrostu, indukcję produkcji reaktywnych form tlenu, peroksydację lipidów i immobilizację komórek.

- Materiały włókiennicze (bawełna i jedwab) funkcjonalizowane nanokompozytami GOAg (w stężeniu GO 5 μg/ml i AgNPs 25 μg/ml) wykazują działanie antybakteryjne, nie indukując toksyczności określonej na modelu błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury.
- 3. Nanokompozyt tlenku grafenu, nanocząstek tlenku cynku i nanocząstek miedzi GOZnOCu (w stężeniach GO 10 μg/ml, ZnONPs 100 μg/ml i CuNPs 25 μg/ml) wykazuje działanie antybakteryjne względem czterech gatunków bakterii: *S. aureus, S. enterica, L. monocytogenes* i *E. cloacae* poprzez obniżenie żywotności oraz przerwanie ciągłości ściany i błony komórkowej, jak również obniżenie zawartości wewnątrzkomórkowego ATP.
- 4. Nanokompozyt trójskładnikowy GNZnOCu (w stężeniu GN 10 µg/ml, ZnONPs 100 µg/ml i CuNPs 25 µg/ml) wykazuje działanie toksyczne wobec gatunków bakterii (*S. aureus, S. enterica, L. monocytogenes* i *E. cloacae*), jak również wobec komórek linii HFFF2, powodując wzrost poziomu ekspresji cytokin prozapalnych (TNF-β i TARC).
- Nanokompozyty GOAg, GOCu, GOZnO (GO 5 μg/ml, AgNPs 25 μg/ml, CuNPs 12,5 μg/ml i ZnONPs 50 μg/ml) indukują produkcję reaktywnych form tlenu oraz zmniejszają zdolność antyoksydacyjną trzech gatunków bakterii: *S. aureus, S. enterica* oraz *P. aeruginosa*.
- 6. Nanofilmy GOAg, GOCu, GOZnO, utworzone z wodnych roztworów koloidalnych nanostruktur GO, AgNPs, CuNPs, ZnONPs (odpowiednio o stężeniach 5, 25, 12,5, 50 μg/ml), powodują ograniczenie formowania biofilmu przez trzy gatunki bakterii: *S. aureus, S. enterica* oraz *P. aeruginosa*, wpływając na zmniejszenie grubości uformowanego biofilmu oraz zmiany w obrębie całej struktury.
- 7. Włączenie GO do nanokompozytów zawierających nanocząstki metaliczne (AgNPs, CuNPs, ZnONPs) w proporcjach GO1:Ag5, GO1:Cu2,5, GO1:ZnO10, a także do nanokompozytów trójskładnikowych GOZnOCu w proporcji GO1:Cu2,5:ZnO10, zwiększa stabilność wodnych roztworów w porównaniu do roztworów poszczególnych nanocząstek metali i ich tlenków.

# 11. Bibliografia

- Adeyemi, O. S., Shittu, E. O., Akpor, O. B., Rotimi, D., i Batiha, G. E. (2020). Silver nanoparticles restrict microbial growth by promoting oxidative stress and DNA damage. *EXCLI Journal*, 19, 492. https://doi.org/10.17179/EXCLI2020-1244
- Alavi, M., Rai, M., Martinez, F., Kahrizi, D., Khan, H., Rose Alencar de Menezes, I., Douglas Melo Coutinho, H., i Costa, J. (2022). The efficiency of metal, metal oxide, and metalloid nanoparticles against cancer cells and bacterial pathogens: different mechanisms of action. *Cellular, Molecular and Biomedical Reports*, 2(1), 10–21. https://doi.org/10.55705/cmbr.2022.147090.1023
- Aziz, M., Halim, F. S. A., i Jaafar, J. (2014). Preparation and characterization of graphene membrane electrode assembly. *Jurnal Teknologi (Sciences and Engineering)*, 69(9), 11–14. https://doi.org/10.11113/JT.V69.3388
- Baer, D. R. (2011). Surface Characterization of Nanoparticles: critical needs and significant challenges. *Journal of Surface Analysis (Online)*, 17(3), 163. https://doi.org/10.1384/jsa.17.163
- Balaure, P. C., i Grumezescu, A. M. (2020). Recent Advances in Surface Nanoengineering for Biofilm Prevention and Control. Part I: Molecular Basis of Biofilm Recalcitrance. Passive Anti-Biofouling Nanocoatings. *Nanomaterials*, 10(6), 1–30. https://doi.org/10.3390/NANO10061230
- Bartlett, J. G., Gilbert, D. N., i Spellberg, B. (2013). Seven Ways to Preserve the Miracle of Antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 56(10), 1445–1450. https://doi.org/10.1093/cid/cit070
- Bedlovičová, Z., Strapáč, I., Baláž, M., i Salayová, A. (2020). A Brief Overview on Antioxidant Activity Determination of Silver Nanoparticles. *Molecules*, 25(14). https://doi.org/10.3390/MOLECULES25143191
- Belda Marín, C., Fitzpatrick, V., Kaplan, D. L., Landoulsi, J., Guénin, E., i Egles, C. (2020). Silk Polymers and Nanoparticles: A Powerful Combination for the Design of Versatile Biomaterials. *Frontiers in Chemistry*, *8*, 1141. https://doi.org/10.3389/fchem.2020.604398

- Berlanga, M., i Guerrero, R. (2016). Living together in biofilms: The microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microbial Cell Factories*, *15*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/S12934-016-0569-5/FIGURES/3
- Breznan, D., Das, D., MacKinnon-Roy, C., Simard, B., Kumarathasan, P., i Vincent, R. (2015). Non-specific interaction of carbon nanotubes with the resazurin assay reagent: Impact on in vitro assessment of nanoparticle cytotoxicity. *Toxicology in Vitro*, 29(1), 142–147. https://doi.org/10.1016/J.TIV.2014.09.009
- Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P., i Caro, N. (2021). Silver nanoparticles and their antibacterial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13). https://doi.org/10.3390/ijms22137202
- Buhr, C. R., Wiesmann, N., Tanner, R. C., Brieger, J., i Eckrich, J. (2020). The Chorioallantoic Membrane Assay in Nanotoxicological Research—An Alternative for In Vivo Experimentation. *Nanomaterials*, 10(12), 2328. https://doi.org/10.3390/nano10122328
- Chang, Y.-N., Gong, J.-L., Zeng, G.-M., Ou, X.-M., Song, B., Guo, M., Zhang, J., i Liu, H.-Y. (2016). Antimicrobial behavior comparison and antimicrobial mechanism of silver coated carbon nanocomposites. *Process Safety and Environmental Protection*, 102, 596–605. https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.05.023
- Chen, S., Li, X., Zhao, Y., Chang, L., i Qi, J. (2015). Graphene oxide shell-isolated Ag nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering. *Carbon*, 81(1), 767–772. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.10.021
- Clogston, J. D., i Patri, A. K. (2011). Zeta Potential Measurement. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 697, 63–70. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1\_6
- Dadi, R., Azouani, R., Traore, M., Mielcarek, C., i Kanaev, A. (2019). Antibacterial activity of ZnO and CuO nanoparticles against gram positive and gram negative strains. *Materials Science and Engineering: C*, 104, 109968. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109968
- Di Giulio, M., Zappacosta, R., Di Lodovico, S., Di Campli, E., Siani, G., Fontana, A., i Cellini, L. (2018). Antimicrobial and Antibiofilm Efficacy of Graphene Oxide against Chronic Wound Microorganisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(7). https://doi.org/10.1128/AAC.00547-18

- Díez-Pascual, A. M. (2020). Antibacterial Action of Nanoparticle Loaded Nanocomposites Based on Graphene and Its Derivatives: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 3563, 21*(10), 3563. https://doi.org/10.3390/IJMS21103563
- Długosz, O., Szostak, K., Staroń, A., Pulit-Prociak, J., i Banach, M. (2020). Methods for Reducing the Toxicity of Metal and Metal Oxide NPs as Biomedicine. *Materials*, 13(2). https://doi.org/10.3390/MA13020279
- Endres, S. C., Ciacchi, L. C., i M\u00e4dler, L. (2021). A review of contact force models between nanoparticles in agglomerates, aggregates, and films. *Journal of Aerosol Science*, 153, 105719. https://doi.org/10.1016/J.JAEROSCI.2020.105719
- Farha, M. A., Verschoor, C. P., Bowdish, D., i Brown, E. D. (2013). Article Collapsing the Proton Motive Force to Identify Synergistic Combinations against Staphylococcus aureus. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.07.006
- Farouk, A., Saeed, S. E.-S., Sharaf, S., i Abd El-Hady, M. M. (2020). Photocatalytic activity and antibacterial properties of linen fabric using reduced graphene oxide/silver nanocomposite. *RSC Advances*, 10(68), 41600–41611. https://doi.org/10.1039/D0RA07544B
- Fatima, F., Siddiqui, S., i Khan, W. A. (2021). Nanoparticles as Novel Emerging Therapeutic Antibacterial Agents in the Antibiotics Resistant Era. *Biological Trace Element Research*, 199(7), 2552–2564. https://doi.org/10.1007/s12011-020-02394-3
- Flemming, H. C., Neu, T. R., i Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: The "House of Biofilm Cells." *Journal of Bacteriology*, 189(22), 7945–7947. https://doi.org/10.1128/JB.00858-07
- Fraguas-Sánchez, A. I., Martín-Sabroso, C., i Torres-Suárez, A. I. (2021). The chick embryo chorioallantoic membrane model: a research approach for ex vivo and in vivo experiments. *Current Medicinal Chemistry*, 28. https://doi.org/10.2174/0929867328666210625105438
- Franco, D., Calabrese, G., Guglielmino, S. P. P., i Conoci, S. (2022). Metal-Based Nanoparticles: Antibacterial Mechanisms and Biomedical Application.

*Microorganisms* 2022, Vol. 10, Page 1778, 10(9), 1778. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10091778

- Gabrielyan, L., Hovhannisyan, A., Gevorgyan, V., Ananyan, M., i Trchounian, A. (2019).
   Antibacterial effects of iron oxide (Fe3O4) nanoparticles: distinguishing concentration-dependent effects with different bacterial cells growth and membrane-associated mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(6), 2773–2782. https://doi.org/10.1007/s00253-019-09653-x
- Garg, P., Attri, P., Sharma, R., Chauhan, M., i Chaudhary, G. R. (2022). Advances and Perspective on Antimicrobial Nanomaterials for Biomedical Applications. *Frontiers in Nanotechnology*, 4, 36. https://doi.org/10.3389/FNANO.2022.898411/BIBTEX
- Gatoo, M. A., Naseem, S., Arfat, M. Y., Mahmood Dar, A., Qasim, K., i Zubair, S. (2014).
  Physicochemical properties of nanomaterials: Implication in associated toxic manifestations. *BioMed Research International*, 2014. https://doi.org/10.1155/2014/498420
- Girma, A. (2023). Alternative mechanisms of action of metallic nanoparticles to mitigate the global spread of antibiotic-resistant bacteria. *The Cell Surface*, 10, 100112. https://doi.org/10.1016/J.TCSW.2023.100112
- Gold, K., Slay, B., Knackstedt, M., i Gaharwar, A. K. (2018). Antimicrobial Activity of Metal and Metal-Oxide Based Nanoparticles. *Advanced Therapeutics*, 1(3), 1700033. https://doi.org/10.1002/ADTP.201700033
- Gudkov, S. V., Burmistrov, D. E., Serov, D. A., Rebezov, M. B., Semenova, A. A., i
  Lisitsyn, A. B. (2021). A Mini Review of Antibacterial Properties of ZnO
  Nanoparticles. *Frontiers in Physics*, 9, 49.
  https://doi.org/10.3389/fphy.2021.641481
- Guzman, M., Arcos, M., Dille, J., Godet, S., i Rousse, C. (2018). Effect of the concentration of NaBH4 and N2H4 as reductant agent on the synthesis of copper oxide nanoparticles and its potential antimicrobial applications. *Nano Biomedicine* and Engineering, 10(4), 392–405. https://doi.org/10.5101/NBE.V10I4.P392-405
- Halder, S., Yadav, K. K., Sarkar, R., Mukherjee, S., Saha, P., Haldar, S., Karmakar, S., i Sen, T. (2015). Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria:

a study with cationic agents. *SpringerPlus*, 4(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/S40064-015-1476-7/FIGURES/4

- Han, C., Romero, N., Fischer, S., Dookran, J., Berger, A., i Doiron, A. L. (2017). Recent developments in the use of nanoparticles for treatment of biofilms. *Nanotechnology Reviews*, 6(5), 383–404. https://doi.org/10.1515/NTREV-2016-0054/ASSET/GRAPHIC/J\_NTREV-2016-0054\_FIG\_001.JPG
- Hochvaldová, L., Večeřová, R., Kolář, M., Prucek, R., Kvítek, L., Lapčík, L., i Panáček,
  A. (2022). Antibacterial nanomaterials: Upcoming hope to overcome antibiotic resistance crisis. *Nanotechnology Reviews*, *11*(1), 1115–1142. https://doi.org/10.1515/NTREV-2022-0059/ASSET/GRAPHIC/J\_NTREV-2022-0059\_FIG\_004.JPG
- Hosnedlova, B., Kabanov, D., Kepinska, M., Narayanan, V. H. B., Parikesi, A. A., Fernandez, C., Bjørklund, G., Nguyen, H. V., Farid, A., Sochor, J., Pholosi, A., Baron, M., Jakubek, M., i Kizek, R. (2022). Effect of Biosynthesized Silver Nanoparticles on Bacterial Biofilm Changes in S. aureus and E. coli. *Nanomaterials* 2022, Vol. 12, Page 2183, 12(13), 2183. https://doi.org/10.3390/NANO12132183
- Huh, A. J., i Kwon, Y. J. (2011). "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, 156(2), 128–145. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002
- Hutchings, M., Truman, A., i Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future.
   *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80.
   https://doi.org/10.1016/J.MIB.2019.10.008
- Iordache, M., Oubraham, A., Sorlei, I. S., Lungu, F. A., Capris, C., Popescu, T., i Marinoiu, A. (2023). Noble Metals Functionalized on Graphene Oxide Obtained by Different Methods—New Catalytic Materials. *Nanomaterials 2023, Vol. 13, Page 783, 13*(4), 783. https://doi.org/10.3390/NANO13040783
- Jaworski, S., Wierzbicki, M., Sawosz, E., Jung, A., Gielerak, G., Biernat, J., Jaremek, H., Łojkowski, W., Woźniak, B., Wojnarowicz, J., Stobiński, L., Małolepszy, A., Mazurkiewicz-Pawlicka, M., Łojkowski, M., Kurantowicz, N., i Chwalibog, A. (2018). Graphene Oxide-Based Nanocomposites Decorated with Silver

Nanoparticles as an Antibacterial Agent. Nanoscale Research Letters, 13(1). https://doi.org/10.1186/S11671-018-2533-2

- Joo, K. J. (2011). Role of Clusterin and Tumor Necrosis Factor Receptors on the Apoptosis of Prostate Cancer Cells. *Korean Journal of Andrology*, 29(1), 43–52. https://doi.org/10.5534/KJA.2011.29.1.43
- Kim, J., Kang, S. H., Choi, Y., Lee, W., Kim, N., Tanaka, M., Kang, S. H., i Choi, J. (2023). Antibacterial and biofilm-inhibiting cotton fabrics decorated with copper nanoparticles grown on graphene nanosheets. *Scientific Reports 2023 13:1*, *13*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-023-38723-4
- Kourmouli, A., Valenti, M., van Rijn, E., Beaumont, H. J. E., Kalantzi, O.-I., Schmidt-Ott, A., i Biskos, G. (2018). Can disc diffusion susceptibility tests assess the antimicrobial activity of engineered nanoparticles? *Journal of Nanoparticle Research*, 20(3), 62. https://doi.org/10.1007/s11051-018-4152-3
- Kumar, B., i Kumar, B. (2020). Graphene- and Graphene Oxide-Bounded Metal Nanocomposite for Remediation of Organic Pollutants. *Carbon-Based Material for Environmental Protection and Remediation*. https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.92992
- Kumar, P., Huo, P., Zhang, R., i Liu, B. (2019). Antibacterial Properties of Graphene-Based Nanomaterials. *Nanomaterials*, 9(5), 737. https://doi.org/10.3390/nano9050737
- Lall, N., Henley-Smith, C. J., De Canha, M. N., Oosthuizen, C. B., i Berrington, D. (2013). Viability Reagent, PrestoBlue, in Comparison with Other Available Reagents, Utilized in Cytotoxicity and Antimicrobial Assays. *International Journal* of Microbiology, 2013. https://doi.org/10.1155/2013/420601
- Le, T. D. H., Tuan, H. N. A., Trinh, K. S., i Van, K. T. (2022). Enhanced antibacterial property of zinc oxide nanoparticles by incorporation of graphene oxide. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 104(1), 246–257. https://doi.org/10.1007/S10971-022-05923-9
- Li, M., Chen, Z., Sun, Y., Wang, F., Wu, C., Xu, J., i Zhang, J. (2021). Preparation and antibacterial activity of graphene oxide/cuprous oxide/zinc oxide nanocomposite.

Materials Research Express, 8(12), 125003. https://doi.org/10.1088/2053-1591/AC3950

- Lin, Y. K., Yang, S. C., Hsu, C. Y., Sung, J. T., i Fang, J. Y. (2021). The Antibiofilm Nanosystems for Improved Infection Inhibition of Microbes in Skin. *Molecules*, 26(21). https://doi.org/10.3390/MOLECULES26216392
- Liu, W., Worms, I., i Slaveykova, V. I. (2020). Interaction of silver nanoparticles with antioxidant enzymes. *Environmental Science: Nano*, 7(5), 1507–1517. https://doi.org/10.1039/C9EN01284B
- Medici, S., Peana, M., Pelucelli, A., i Zoroddu, M. A. (2021). An updated overview on metal nanoparticles toxicity. *Seminars in Cancer Biology*, 76, 17–26. https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2021.06.020
- Mendes, C. R., Dilarri, G., Forsan, C. F., Sapata, V. de M. R., Lopes, P. R. M., de Moraes,
  P. B., Montagnolli, R. N., Ferreira, H., i Bidoia, E. D. (2022). Antibacterial action and target mechanisms of zinc oxide nanoparticles against bacterial pathogens. *Scientific Reports 2022 12:1*, *12*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-022-06657-y
- Mirzaei, R., Mohammadzadeh, R., Alikhani, M. Y., Shokri Moghadam, M., Karampoor, S., Kazemi, S., Barfipoursalar, A., i Yousefimashouf, R. (2020). The biofilmassociated bacterial infections unrelated to indwelling devices. *IUBMB Life*, 72(7), 1271–1285. https://doi.org/10.1002/IUB.2266
- Moafi, A., Heidari, O., Soltannia, B., Wlodarski, W., Shahi, F., i Parvin, P. (2022). Reduction of metal nanoparticle decorated flexible graphene oxide by laser at various temperatures and under selected atmospheres. *Carbon Trends*, 6, 100140. https://doi.org/10.1016/J.CARTRE.2021.100140
- Mohd Yusof, H., Abdul Rahman, N., Mohamad, R., Hasanah Zaidan, U., i Samsudin, A. A. (2021). Antibacterial potential of biosynthesized zinc oxide nanoparticles against poultry-associated foodborne pathogens: An in vitro study. *Animals*, 11(7). https://doi.org/10.3390/ani11072093
- Moraes, A. C. M. de, Araujo Lima, B., Fonseca de Faria, A., Brocchi, M., i Luiz Alves,O. (2015). Graphene oxide-silver nanocomposite as a promising biocidal agent

against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 6847. https://doi.org/10.2147/IJN.S90660

- Mubeen, B., Nayab Ansar, A., Rasool, R., Ullah, I., Sarim Imam, S., Ghoneim, M. M., Alzarea, S. I., Nadeem, M. S., i Kazmi, I. (2021). antibiotics Nanotechnology as a Novel Approach in Combating Microbes Providing an Alternative to Antibiotics. https://doi.org/10.3390/antibiotics10121473
- Nastulyavichus, A., Tolordava, E., Rudenko, A., Zazymkina, D., Shakhov, P., Busleev, N., Romanova, Y., Ionin, A., i Kudryashov, S. (2020). In Vitro Destruction of Pathogenic Bacterial Biofilms by Bactericidal Metallic Nanoparticles via Laser-Induced Forward Transfer. *Nanomaterials*, 10(11), 2259. https://doi.org/10.3390/nano10112259
- Ness, T. L., Hogaboam, C. M., i Kunkel, S. L. (2006). CHEMOKINES, CC | TARC (CCL17). Encyclopedia of Respiratory Medicine, Four-Volume Set, 380–385. https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00465-8
- Ouadil, B., Amadine, O., Essamlali, Y., Cherkaoui, O., i Zahouily, M. (2019). A new route for the preparation of hydrophobic and antibacterial textiles fabrics using Agloaded graphene nanocomposite. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 579, 123713. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123713
- Ozdal, M., i Gurkok, S. (2022). Recent advances in nanoparticles as antibacterial agent. *ADMET i DMPK*, *10*(2), 115. https://doi.org/10.5599/ADMET.1172
- Panda, S., Rout, T. K., Prusty, A. D., Ajayan, P. M., i Nayak, S. (2018). Electron Transfer Directed Antibacterial Properties of Graphene Oxide on Metals. *Advanced Materials*, 30(7). https://doi.org/10.1002/ADMA.201702149
- Parnianchi, F., Nazari, M., Maleki, J., i Mohebi, M. (2018). Combination of graphene and graphene oxide with metal and metal oxide nanoparticles in fabrication of electrochemical enzymatic biosensors. *International Nano Letters 2018 8:4*, 8(4), 229–239. https://doi.org/10.1007/S40089-018-0253-3
- Pazos-Ortiz, E., Roque-Ruiz, J. H., Hinojos-Márquez, E. A., López-Esparza, J., Donohué-Cornejo, A., Cuevas-González, J. C., Espinosa-Cristóbal, L. F., i Reyes-López, S. Y. (2017). Dose-Dependent Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles on

Polycaprolactone Fibers against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Journal of Nanomaterials*, 2017, 1–9. https://doi.org/10.1155/2017/4752314

Peter Jurtshuk, Jr. (1996). Bacterial Metabolism. Medical Microbiology.

- Pinto, R. M., Soares, F. A., Reis, S., Nunes, C., i Van Dijck, P. (2020). Innovative Strategies Toward the Disassembly of the EPS Matrix in Bacterial Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 11(May), 1–20. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00952
- Prakasham, R. S., i Kumar, B. S. (2019). Bacterial Metabolism–Coupled Energetics. Biomass, Biofuels, Biochemicals: Microbial Electrochemical Technology: Sustainable Platform for Fuels, Chemicals and Remediation, 227–260. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64052-9.00009-1
- Prasad, K., Lekshmi, G. S., Ostrikov, K., Lussini, V., Blinco, J., Mohandas, M., Vasilev, K., Bottle, S., Bazaka, K., i Ostrikov, K. (2017). Synergic bactericidal effects of reduced graphene oxide and silver nanoparticles against Gram-positive and Gramnegative bacteria. *Scientific Reports*, 7(1), 1591. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01669-5
- Preda, V. G., i Săndulescu, O. (2019). Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. *Discoveries*, 7(3), e10. https://doi.org/10.15190/D.2019.13
- Quan, K., Hou, J., Zhang, Z., Ren, Y., Peterson, B. W., Flemming, H. C., Mayer, C., Busscher, H. J., i van der Mei, H. C. (2022). Water in bacterial biofilms: pores and channels, storage and transport functions. *Critical Reviews in Microbiology*, 48(3), 283–302. https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1962802
- Quinteros, M. A., Cano Aristizábal, V., Dalmasso, P. R., Paraje, M. G., i Páez, P. L. (2016). Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicology in Vitro*, 36, 216–223. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.08.007
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., i Sintim, H. O. (2015).
  Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493–512. https://doi.org/10.4155/fmc.15.6

- Ren, E., Zhang, C., Li, D., Pang, X., i Liu, G. (2020). Leveraging metal oxide nanoparticles for bacteria tracing and eradicating. *View*, 1(3), 20200052. https://doi.org/10.1002/VIW.20200052
- Ribatti, D. (2017). The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reproductive Toxicology*, 70, 97–101. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.11.004
- Safaepour, M., Shahverdi, A. R., Shahverdi, H. R., Khorramizadeh, M. R., i Gohari, A. R. (2009). Green Synthesis of Small Silver Nanoparticles Using Geraniol and Its Cytotoxicity against Fibrosarcoma-Wehi 164. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 1(2), 111–115.
- Saleh, N. B., Chambers, B., Aich, N., Plazas-Tuttle, J., Phung-Ngoc, H. N., i Kirisits, M. J. (2015). Mechanistic lessons learned from studies of planktonic bacteria with metallic nanomaterials: implications for interactions between nanomaterials and biofilm bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUN), 677. https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00677
- Salton MRJ, K. K. (1996). Structure. In Baron S (Ed.), *Medical Microbiology* (4th ed.). University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Sánchez-López, E., Gomes, D., Esteruelas, G., Bonilla, L., Lopez-Machado, A. L., Galindo, R., Cano, A., Espina, M., Ettcheto, M., Camins, A., Silva, A. M., Durazzo, A., Santini, A., Garcia, M. L., i Souto, E. B. (2020). Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials 2020, Vol. 10, Page 292, 10*(2), 292. https://doi.org/10.3390/NANO10020292
- Sayed, F. A. Z., Eissa, N. G., Shen, Y., Hunstad, D. A., Wooley, K. L., i Elsabahy, M. (2022). Morphologic design of nanostructures for enhanced antimicrobial activity. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 536. https://doi.org/10.1186/S12951-022-01733-X
- Schubert, A., Griesmüller, C., Gersdorff, N., Bürgers, R., Wiechens, B., i Wassmann, T. (2024). Antibacterial coating of orthodontic elastomeric ligatures with silver and bismuth nanofilms by magnetron sputtering: A feasibility study. *Clinical and Experimental Dental Research*, 10(2). https://doi.org/10.1002/CRE2.864

- Shallcross, L. J., i Davies, D. S. C. (2014). Antibiotic overuse: a key driver of antimicrobial resistance. *British Journal of General Practice*, 64(629), 604–605. https://doi.org/10.3399/bjgp14X682561
- Shateri-Khalilabad, M., Yazdanshenas, M. E., i Etemadifar, A. (2017). Fabricating multifunctional silver nanoparticles-coated cotton fabric. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S2355–S2362. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.08.013
- Shrestha, S., Wang, B., i Dutta, P. (2020). Nanoparticle processing: Understanding and controlling aggregation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 279, 102162. https://doi.org/10.1016/J.CIS.2020.102162
- Siddiqi, K. S., ur Rahman, A., Tajuddin, i Husen, A. (2018). Properties of Zinc Oxide Nanoparticles and Their Activity Against Microbes. *Nanoscale Research Letters* 2018 13:1, 13(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/S11671-018-2532-3
- Singh, J., Vishwakarma, K., Ramawat, N., Rai, P., Singh, V. K., Mishra, R. K., Kumar, V., Tripathi, D. K., i Sharma, S. (2019). Nanomaterials and microbes' interactions: a contemporary overview. *3 Biotech*, 9(3), 68. https://doi.org/10.1007/s13205-019-1576-0
- Skoglund, S., Hedberg, J., Yunda, E., Godymchuk, A., Blomberg, E., i Odnevall Wallinder, I. (2017). Difficulties and flaws in performing accurate determinations of zeta potentials of metal nanoparticles in complex solutions—Four case studies. *PLOS ONE*, 12(7), e0181735. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0181735
- Skowron, K., Grudlewska-Buda, K., Wiktorczyk-Kapischke, N., Wałecka-Zacharska, E., Kraszewska, Z., Bernaciak, Z., Kotlarek, A., Budzyńska, A., i Gospodarek-Komkowska, E. (2022). Effect of intimate hygiene fluids on the number of Listeria monocytogenes isolated from women. *Medical Research Journal*, 7(1), 24–31. https://doi.org/10.5603/MRJ.A2022.0005
- Slavin, Y. N., Asnis, J., Häfeli, U. O., i Bach, H. (2017). Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of Nanobiotechnology 2017 15:1*, 15(1), 1–20. https://doi.org/10.1186/S12951-017-0308-Z

- Slonczewski, J. L., Fujisawa, M., Dopson, M., i Krulwich, T. A. (2009). Cytoplasmic pH Measurement and Homeostasis in Bacteria and Archaea. ADVANCES IN MICROBIAL PHYSIOLOGY, 55. https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05501-5
- Song, B., Zhang, C., Zeng, G., Gong, J., Chang, Y., i Jiang, Y. (2016). Antibacterial properties and mechanism of graphene oxide-silver nanocomposites as bactericidal agents for water disinfection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 604, 167– 176. https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.04.018
- Stetefeld, J., McKenna, S. A., i Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409. https://doi.org/10.1007/S12551-016-0218-6
- Sukhanova, A., Bozrova, S., Sokolov, P., Berestovoy, M., Karaulov, A., i Nabiev, I. (2018). Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Research Letters*, 13(1), 44. https://doi.org/10.1186/s11671-018-2457-x
- Sun, J., Rutherford, S. T., Silhavy, T. J., i Huang, K. C. (2022). Physical properties of the bacterial outer membrane. *Nature Reviews. Microbiology*, 20(4), 236. https://doi.org/10.1038/S41579-021-00638-0
- Szunerits, S., i Boukherroub, R. (2016). Antibacterial activity of graphene-based materials. *Chemistry*, 4(43), 6892–6912. https://doi.org/10.1039/C6TB01647Bï
- Tiwari, V., Mishra, N., Gadani, K., Solanki, P. S., Shah, N. A., i Tiwari, M. (2018). Mechanism of anti-bacterial activity of zinc oxide nanoparticle against Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN), 1218. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01218
- Truong, T., Kumar, S., Huang, Y.-T., Chen, D., Liu, Y.-K., i Lue, S. (2020). Size-Dependent Antibacterial Activity of Silver Nanoparticle-Loaded Graphene Oxide Nanosheets. *Nanomaterials*, 10(6), 1207. https://doi.org/10.3390/nano10061207
- Uflyand, I. E., Naumkina, V. N., i Zhinzhilo, V. A. (2021). Nanocomposites of Graphene Oxide and Metal-Organic Frameworks. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 94(11), 1453–1468. https://doi.org/10.1134/S107042722111001X/FIGURES/9

- Usman, M. S., El Zowalaty, M. E., Shameli, K., Zainuddin, N., Salama, M., i Ibrahim, N. A. (2013). Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 4467. https://doi.org/10.2147/IJN.S50837
- Wahab, S. ;, Salman, A. ;, Khan, Z. ;, Khan, S. ;, Krishnaraj, C. ;, Alfei, S., Wahab, S., Salman, A., Khan, Z., Khan, S., Krishnaraj, C., i Yun, S.-I. (2023). Metallic Nanoparticles: A Promising Arsenal against Antimicrobial Resistance—Unraveling Mechanisms and Enhancing Medication Efficacy. *International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol. 24, Page 14897, 24*(19), 14897. https://doi.org/10.3390/IJMS241914897
- Wang, B., Hendricks, D. T., Wamunyokoli, F., i Parker, M. I. (2006). A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer. *Cancer Research*, 66(6), 3071–3077. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2871
- Wang, H., Zhang, Y., Xu, X., Yang, F., Li, K., Wei, D., i Liu, Z. (2020). Efficient loading of silver nanoparticles on graphene oxide and its antibacterial properties. https://doi.org/10.1088/2632-959X/ab9546
- Wang, L., Hu, C., i Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227. https://doi.org/10.2147/IJN.S121956
- Ward, B. (2015). Bacterial Energy Metabolism. Molecular Medical Microbiology: Second Edition, 1–3, 201–233. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00011-1
- Wilson, W. W., Wade, M. M., Holman, S. C., i Champlin, F. R. (2001). Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods*, 43(3), 153–164. https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00224-4
- Wu, S., Altenried, S., Zogg, A., Zuber, F., Maniura-Weber, K., i Ren, Q. (2018). Role of the Surface Nanoscale Roughness of Stainless Steel on Bacterial Adhesion and Microcolony Formation. ACS Omega, 3(6), 6456–6464.

https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.8B00769/SUPPL\_FILE/AO8B00769\_SI\_00 1.PDF

- Xiang, E., Moran, C. S., Ivanovski, S., i Abdal-hay, A. (2023). Nanosurface Texturing for Enhancing the Antibacterial Effect of Biodegradable Metal Zinc: Surface Modifications. *Nanomaterials*, 13(13). https://doi.org/10.3390/NANO13132022/S1
- Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., i Chu, C. H. (2020). The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 2555. https://doi.org/10.2147/IJN.S246764
- Yougbare, S., Chang, T. K., Tan, S. H., Kuo, J. C., Hsu, P. H., Su, C. Y., i Kuo, T. R. (2019). Antimicrobial Gold Nanoclusters: Recent Developments and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 2924*, 20(12), 2924. https://doi.org/10.3390/IJMS20122924
- Zhang, N., Xiong, G., i Liu, Z. (2022a). Toxicity of metal-based nanoparticles: Challenges in the nano era. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 1001572. https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.1001572/BIBTEX
- Zhang, N., Xiong, G., i Liu, Z. (2022b). Toxicity of metal-based nanoparticles: Challenges in the nano era. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 1001572. https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.1001572/BIBTEX
- Zhang, S., Lin, L., Huang, X., Lu, Y. G., Zheng, D. L., i Feng, Y. (2022). Antimicrobial Properties of Metal Nanoparticles and Their Oxide Materials and Their Applications in Oral Biology. *Journal of Nanomaterials*, 2022(1), 2063265. https://doi.org/10.1155/2022/2063265
- Zhang, T., i Tremblay, P. L. (2020). Graphene: An Antibacterial Agent or a Promoter of Bacterial Proliferation? *IScience*, 23(12), 101787. https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2020.101787
- Zhang, Y., Shareena Dasari, T. P., Deng, H., i Yu, H. (2015). Antimicrobial Activity of Gold Nanoparticles and Ionic Gold. *Journal of Environmental Science and Health*, *Part C*, 33(3), 286–327. https://doi.org/10.1080/10590501.2015.1055161
- Zulan, L., Zhi, L., Lan, C., Sihao, C., Dayang, W., i Fangyin, D. (2019). Reduced Graphene Oxide Coated Silk Fabrics with Conductive Property for Wearable

Electronic Textiles Application. *Advanced Electronic Materials*, 5(4), 1800648. https://doi.org/10.1002/aelm.201800648

Zwadlo-Klarwasser, G., Görlitz, K., Hafemann, B., Klee, D., i Klosterhalfen, B. (2001).
The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of the angiogenic and inflammatory response to biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2001 12:3*, *12*(3), 195–199. https://doi.org/10.1023/A:1008950713001 12. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej wraz z oświadczeniami współautorów





# Article Nanocomposites of Graphene Oxide—Silver Nanoparticles for Enhanced Antibacterial Activity: Mechanism of Action and Medical Textiles Coating

Agata Lange <sup>1</sup>, Ewa Sawosz <sup>1</sup>, Mateusz Wierzbicki <sup>1</sup>, Marta Kutwin <sup>1</sup>, Karolina Daniluk <sup>1</sup>, Barbara Strojny <sup>1</sup>, Agnieszka Ostrowska <sup>1</sup>, Barbara Wójcik <sup>1</sup>, Maciej Łojkowski <sup>2,3</sup>, Marcin Gołębiewski <sup>4</sup>, André Chwalibog <sup>5</sup>, and Sławomir Jaworski <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8 Str., 02-786 Warsaw, Poland; agata\_lange@sggw.edu.pl (A.L.); ewa\_sawosz\_chwalibog@sggw.edu.pl (E.S.); mateusz\_wierzbicki@sggw.edu.pl (M.W.); marta\_prasek@sggw.edu.pl (M.K.); karolina\_daniluk@sggw.edu.pl (K.D.); barbara\_strojny@sggw.edu.pl (B.S.); agnieszka\_ostrowska@sggw.edu.pl (A.O.); barbara\_wojcik@sggw.edu.pl (B.W.)
- <sup>2</sup> Faculty of Materials Science and Engineering, Warsaw University of Technology, Wołoska 141 Str., 02-507 Warsaw, Poland; 00183042@pw.edu.pl
- <sup>3</sup> Centre for Advanced Materials and Technology CEZAMAT, Warsaw University of Technology, Poleczki 19 Str., 02-822 Warsaw, Poland
- <sup>4</sup> Department of Animal Breeding, Institute of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8 Str., 02-786 Warsaw, Poland; marcin\_golebiewski@sggw.edu.pl
- Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Copenhagen, Groennegaardsvej 3 Str., 1870 Frederiksberg, Denmark; ach@sund.ku.dk
- Correspondence: slawomir\_jaworski@sggw.edu.pl; Tel.: +48-22-59-366-75

Abstract: The resistance of microorganisms to antibiotics is a crucial problem for which the application of nanomaterials is among a growing number of solutions. The aim of the study was to create a nanocomposite (composed of graphene oxide and silver nanoparticles) with a precise mode of antibacterial action: what enables textiles to be coated in order to exhibit antibacterial properties. A characterization of nanomaterials (silver nanoparticles and graphene oxide) by size distribution, zeta potential measurements, TEM visualization and FT-IR was performed. The biological studies of the nanocomposite and its components included the toxicity effect toward two pathogenic bacteria species, namely Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus, interaction of nanomaterials with the outer layer of microorganisms, and the generation of reactive oxygen species and lipid peroxidation. Afterwards, antibacterial studies of the nanocomposite's coated textiles (cotton, interlining fabric, polypropylene and silk) as well as studies of the general toxicity towards a chicken embryo chorioallantoic membrane model were conducted. The toxicity of the nanocomposite used was higher than its components applied separately (zones of growth inhibition for *P. aeruginosa* for the final selected concentrations were as follows: silver nanoparticles 21  $\pm$  0.7 mm, graphene oxide 14  $\pm$  1.9 mm and nanocomposite  $23 \pm 1.6$  mm; and for *S. aureus* were: silver nanoparticles  $27 \pm 3.8$  mm, graphene oxide  $14 \pm 2.1$  mm, and nanocomposite  $28 \pm 0.4$  mm. The viability of *P. aeruginosa* and *S. aureus* after treatment with selected GO-Ag decreased to 27% and 31%, respectively, compared to AgNPs, when the viability of both species was 31% and 34%, accordingly). The coated textiles showed encouraging antibacterial features without general toxicity towards the chicken embryo chorioallantoic membrane model. We demonstrated that graphene oxide might constitute a functional platform for silver nanoparticles, improving the antibacterial properties of bare silver. Due to the application of the nanocomposite, the textiles showed promising antibacterial features with a low general toxicity, thereby creating a wide possibility for them to be used in practice.

Keywords: nanocomposite; silver nanoparticles; graphene oxide; antibacterial; coating



Citation: Lange, A.; Sawosz, E.; Wierzbicki, M.; Kutwin, M.; Daniluk, K.; Strojny, B.; Ostrowska, A.; Wójcik, B.; Łojkowski, M.; Gołębiewski, M.; et al. Nanocomposites of Graphene Oxide—Silver Nanoparticles for Enhanced Antibacterial Activity: Mechanism of Action and Medical Textiles Coating. *Materials* **2022**, *15*, 3122. https://doi.org/10.3390/ ma15093122

Academic Editor: Anton Nikiforov

Received: 12 March 2022 Accepted: 24 April 2022 Published: 26 April 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 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

The introduction of antibiotics into medicine has revolutionized the therapy of infectious diseases. Antibiotics are used primarily to fight infections and as growth and health promoters in livestock [1]. However, the unjustified use and overuse of antibiotics has contributed to an increase in the number of resistant bacteria strains [2]. Among Gram-positive bacteria, methicillin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant Enterococcus sp. cause great difficulties in treatment. The most serious Gram-negative infections are caused by *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* [3]. Every time a new antimicrobial is introduced, resistant strains emerge. Infections caused by antibiotic-resistant germs are difficult and sometimes impossible to treat. Growing antibiotic resistance is forcing the search for new, alternative antibacterial agents. Nanoparticles (NPs) are often used to target microorganisms as an alternative to antibiotics. Furthermore, nanomaterials may be used effectively in biomedical practice to coat textiles, which is what ensures them antibacterial properties [4]. Among popular textiles, especially important are medical types which are popular in everyday life (for example those from which face masks are produced) and, due to the coating, do not contain bacteria, especially drug-resistant ones.

Most of the mechanisms of antibiotic resistance are not related to nanoparticles nor nanomaterials. The toxicity of nanoparticles is based on the mechanical damage of the cell wall and membrane, ion secretion and the activation of oxidative stress [5]. Studies have shown that many NPs have antibacterial activity, including silver nanoparticles (AgNPs), gold, zinc, copper and iron [6–10]. However, most research has focused on the use of AgNPs. It has been demonstrated that the bactericidal properties of AgNPs are strongly influenced by their size, shape and concentration [11,12]. Various shapes of nanoparticles show different antibacterial properties. Pal et al. [13] showed that triangular-shaped nanoparticles exhibit stronger antibacterial properties than rod-shaped and spherical nanoparticles. Different surface chemistry and functionalization may change the interaction of nanoparticles with bacteria and inhibit their antibacterial activity. Some studies have shown that smaller diameter nanoparticles have stronger antibacterial properties [14]. The smaller size also promotes the secretion of ions that destroy bacterial cell structures. Silver nanoparticles can accumulate on the bacterial cell membrane and cause denaturation of membrane proteins. They can also penetrate the bacterial cell, damaging the organelles [6]. However, silver nanoparticles often agglomerate upon contact with bacteria. The inhibitory effect of aggregated nanoparticles decreases with an increase in the degree of aggregation of AgNPs [15]. To reduce this problem, it is possible to synthesize nanocomposites containing AgNPs, ensuring a better and more stable dispersion of the AgNPs. As we showed in a previous study [16], one of the materials that can act as a carrier for AgNPs is graphene oxide (GO). It is water-soluble and provides a large platform for convenient functionalization-based molecule attachment [17]. Nanocomposites can provide a better dispersion of nanoparticles and reduce their agglomeration. Factors such as size and agglomeration are especially important for nanocomposites, since, depending on these, some nanomaterials may not be able to penetrate the bacteria cell wall [18]. However, an increase in the exposed surface while creating platforms for AgNPs also causes a prolonged release of active Ag ions which damage the bacteria's external membrane by direct contact [19].

In this study, we hypothesized that GO-based nanocomplexes (GO-Ag) will have a stronger antibacterial effect than bare AgNPs. Nanoparticles distributed evenly on the surface of graphene may have a stronger contact with the surface of bacterial cells, leading to their damage. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of GO decorated with AgNPs compared to bare AgNPs with the distinction of a nanocomposite mechanism, using the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Thereafter, its antibacterial features on medical textiles were assessed.

In order to examine the initial assumptions, the following analyses were carried out: physicochemical characterization of nanomaterials, evaluation of bacterial growth by the agar well diffusion method, ultrastructural analysis of bacteria cells by transmission electron microscopy (TEM), determination of bacteria viability by XTT assay, evaluation of reactive oxygen species (ROS) generation, assessment of lipid peroxidation by MDA assay and estimation of antibacterial activity of textile materials coated with nanomaterials by the ISO 20645:2004 standard, as well as general toxicity by chorioallantoic membrane (CAM) assay.

### 2. Materials and Methods

# 2.1. Bacterial Culture

Microbial strains (*P. aeruginosa* (ATCC 27853) and *S. aureus* (ATCC 25923)) were obtained from LGC Standards (Lomianki, Poland). Both strains in the form of spore suspensions were maintained frozen in 20% (v/v) glycerol at -20 °C. In order to use them in experiments, they were defrosted and purified from glycerol by washing with distilled water. Afterwards, bacterial strains were cultured in Mueller–Hinton broth medium (BioMaxima, Lublin, Poland) and incubated in a shaking incubator at 37 °C overnight.

Before the experiments, the bacterial cells were adjusted to a dedicated concentration by dilution in a sterile distilled saline solution, based on the McFarland scale [20].

## 2.2. Characterization of Nanoparticles

Silver nanoparticles were obtained from Nano-Tech (Warsaw, Poland) and GO was obtained from Advanced Graphene Products (Zielona Gora, Poland). Suspensions of Ag-NPs (25  $\mu$ g/mL), GO (5  $\mu$ g/mL) and their mixture GO-Ag (AgNPs (25  $\mu$ g/mL) + (GO 5  $\mu$ g/mL)) were prepared in deionized water and sonicated for 30 min before usage in each experiment. In order to specify the physicochemical properties of the nanocomposites, the individual characteristics of the AgNPs and GO as well as their combination were defined with the methods previously described in the research of Jaworski et al. [16]. The shape was determined using TEM JEM-1220 (JEOL, Tokyo, Japan) at 80 keV. Size distribution (dynamic light scattering method) and zeta potential (laser Doppler electrophoresis method) measurements were carried out using the Zetasizer Nano-ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) at room temperature (23 °C).

FT-IR measurements were performed using a Nicolet iS10 spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA): 200 mg of KBr powder (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) was pressed together under 10 Atm to form discs, and then a droplet of the suspension (concentration of 75  $\mu$ g/mL) was pipetted onto the KBr disc and dried in a vacuum overnight. The dried KBr with the analyte was then once again milled and dried. The operation was repeated multiple times if necessary. The discs were investigated in transmittance mode.

### 2.3. Agar Well Diffusion Method

The well diffusion test was performed in order to determine the antibacterial activity of the nanoparticles. Different concentrations of nanoparticles were tested in order to select the optimal antibacterial concentration of the nanocomposites created (AgNPs-50, 25, 10, 5, 2.5 ( $\mu$ g/mL); GO-10, 5 ( $\mu$ g/mL); GO-Ag-Ag 25 ( $\mu$ g/mL) + GO 5 ( $\mu$ g/mL); Ag 25 ( $\mu$ g/mL) + GO 10 ( $\mu$ g/mL)). Nanoparticles were prepared by dilution in deionized water and sonicated for 30 min before usage. The bacterial inoculum was prepared by adjusting the turbidity of the suspensions to match 0.5 McFarland standard, which is equivalent to  $1.5 \times 10^8$  cells/mL [20]. A total of 100  $\mu$ L of both strains of microorganisms was spread over the surface of a Mueller–Hinton agar plate (BioMaxima, Lublin, Poland). Wells (made by a 13 mm diameter sterile cork borer) were punched in culture agar plates, and 100  $\mu$ L of nanoparticles as the substances tested and 100  $\mu$ L of distilled water as the control were placed into each well. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. The area of inhibition was identified as a clear zone around a well and the zone was measured in mm.

#### 2.4. Ultrastructural Analysis by Transmission Electron Microscopy (TEM)

The effect of the interaction between the nanoparticles used and the bacteria cells was evaluated by transmission electron microscope JEM-1220 (JEOL, Tokyo, Japan), operated at a voltage of 80 keV. The overnight bacteria suspension was adjusted to  $1.5 \times 10^8$  cells/mL and treated with AgNPs, GO and GO-Ag. Droplets of each sample were placed onto TEM grids (Formvar on 3 mm 200 Mesh Cu Grids, Agar Scientific, Stansted, UK), and the samples were observed immediately.

# 2.5. Viability XTT Assay

The viability rate was determined by Cell Proliferation Kit II (Cat. No. 11465015001, Merck, Darmstadt, Germany), where the tetrazolium salt XTT (sodium 3'-[1-[(phenylamino)carbony]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate) is reduced by dehydrogenase enzymes in metabolically active cells, giving a colored formazan product which is measured spectrophotometrically. Bacterial strains were cultured in Mueller-Hinton broth medium (BioMaxima, Lublin, Poland) in a shaking incubator at 37  $^\circ C$ overnight. Nanoparticles were prepared by dilution in deionized water and sonicated for 30 min before usage. The final concentrations of the nanoparticles were as follows: AgNPs (0.8; 1.56; 3.125; 6.25; 12.5; 25 (µg/mL)), GO (5 µg/mL) and GO-Ag (Ag 0.8 + GO 5; Ag 1.56 + GO 5; Ag 3.125 + GO5; Ag 6.25 + GO5; Ag 12.5 + GO 5; Ag 25 + GO 5 (μg/mL)). A total of 90  $\mu$ L of bacterial suspension (5  $\times$  10<sup>5</sup> cells/well) was placed in a 96-well plate and treated with 10  $\mu$ L Ag, GO and GO-Ag nanoparticles for 24 h in a bacteriological incubator under standard conditions (37 °C). Subsequently, 50 µL of XTT mix was added into each well and incubated for 3 h at 37 °C. Absorbance at 450 nm was measured using a microplate Elisa reader (Infinite M200, Tecan, Durham, NC, USA). The results were repeated a minimum of three times for each group. Cell viability was expressed as a percentage of the optical density of the test sample reduced by a blank probe in relation to the optical density of the control reduced by a blank probe, where the control is the optical density of the bacterial suspension without nanoparticles, and the blank probe is optical density of the wells without bacterial cells.

# 2.6. ROS Production

The detection of intracellular ROS was determined using the Fluorometric Intracellular Ros Kit (Cat. No. MAK143, Sigma, St Louis, MO, USA), with the main principle being that ROS reacts with a sensor in the cytoplasm, giving a fluorometric product. Bacterial strains were cultured in Mueller–Hinton broth medium (BioMaxima, Lublin, Poland) in a shaking incubator at 37 °C overnight. Nanoparticles were prepared by dilution in deionized water (final concentration used: AgNPs 25  $\mu$ g/mL, GO 5  $\mu$ g/mL and GO-Ag (Ag 25  $\mu$ g/mL + GO 5  $\mu$ g/mL)) and sonicated for 30 min before usage. Bacterial inocula (5 × 10<sup>5</sup> cells per well) with test nanoparticles (final volume 100  $\mu$ L) were placed in 96-well plates and incubated at 37 °C for 24 h. A Master Reaction Mix was prepared according to protocol and 50  $\mu$ L of the mixture was added to each well. Shortly after, the fluorescence measurements were conducted with an excitation wavelength at 490 nm and an emission wavelength at 525 nm using the microplate reader Infinite M200 (Infinite M200, Tecan, Durham, NC, USA). The results were replicated a minimum of three times for each group.

## 2.7. Lipid Peroxidation (MDA) Assay

Lipid peroxidation was determined by MDA assay kit (Cat. No. MAK085, Sigma, St Louis, MO, USA) in which malondialdehyde (MDA), as a by-product of lipid peroxidation of the bacterial cell membrane, reacts with thiobarbituric acid (TBA), giving the fluorimetric product proportional to the MDA present. The bacterial strains were cultured in Mueller–Hinton broth medium (BioMaxima, Lublin, Poland) in a shaking incubator at 37 °C overnight. The nanoparticles were prepared by dilution in deionized water (final concentration used: AgNPs 25  $\mu$ g/mL, GO 5  $\mu$ g/mL and GO-Ag (Ag 25  $\mu$ g/mL + GO 5  $\mu$ g/mL)) and sonicated for 30 min before usage. After being exposed to the nanoparticles for 24 h,
bacterial inoculum (1 × 10<sup>6</sup>) were homogenized by MDA Lysis Buffer and centrifuged at 13,000 × g for 10 min, according to the protocol. A total of 200  $\mu$ L of supernatant was placed into a microcentrifuge tube, and then 600  $\mu$ L TBA was added and incubated at 95 °C for 60 min. A total of 200  $\mu$ L of the mixture was placed into a 96-well plate and the absorbance at 532 nm was measured. The test was replicated a minimum of three times for each group.

## 2.8. Textile Fabrics–Determination of Antibacterial Activity–Agar Diffusion Plate Test (ISO 20645:2004)

The antibacterial activity of the textile fabrics was determined according to normative test ISO 20645:2004. Four types of medical materials (silk, polypropylene, cotton and interlining fabric) in round form (diameter 25 mm) were covered with 500  $\mu$ L of the GO-Ag nanocomposite by ultrasonic treatment for 30 min.

The agar phase consisted of two distinct layers. The lower layer was agar only and the upper layer was agar with a bacteria culture. First, 10 mL of nutrient agar (BioMaxima, Lublin, Poland) was placed on Petri dishes (90 mm in diameter). Then, 150 mL of cooled nutrient agar was mixed with 1 mL of bacterial suspension  $(1.5 \times 10^8 \text{ cells/mL})$  and poured on the surfaces of prepared Petri dishes. After complete solidification, textile fabrics were placed on the surface of the inoculum medium, ensuring that they adhered evenly to the surface. The plates were incubated for 24 h at 37 °C and the results were determined by the presence or absence of bacterial growth in the area of contact between the sample and the agar.

#### 2.9. Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay

The textile fabric implants were made of four types of medical materials (silk, polypropylene, cotton and interlining fabric). Implants of 10 mm diameter were covered with 200  $\mu$ L of the GO-Ag nanocomposite by ultrasonic treatment for 30 min to complete surface coverage.

Fertilized eggs (line Ross 308) were obtained from a local hatchery (Marylka, Mazovian voivodship, Poland). The eggs were cleaned and sterilized with UVC and then kept in standard conditions (temperature 37 °C, humidity 60%, turned once per hour) until the sixth day of chicken embryo development. Then, small holes were made in the shell above the air space and the textile fabric implants (10 mm diameter) were placed on the chicken embryo chorioallantoic membrane. The eggs were incubated in standard conditions to day seven of chicken embryo development. Thereafter, implants with CAM were affixed with 1.5 mL 4% paraformaldehyde and incubated for 30 min at 4 °C. Then, the implants with CAM were slightly cut out using a sterile scalpel and observed under a stereomicroscope (SZX10, Olympus Corporation, CellD software version 3.1, Tokyo, Japan). Angiogenesis was measured by the density and length of the blood vessels that formed on the implant surface using ImageJ software version 1.50e with a plugin Vessel analyzer. All measurements were repeated a minimum of three times.

#### 2.10. Statistics

In this study, all data are represented as mean  $\pm$  standard deviation. For statistical analysis, one-way analysis of variance with the post-hoc Tukey test (HSD) was performed using GraphPad Prism 9 software, and the significance level was considered at *p*-value  $\leq 0.05$ .

#### 3. Results

#### 3.1. Characterization of Nanoparticles

The physicochemical characteristic of nanomaterials allows the interpretation of their properties in relation to living cells, tissues and organisms. The results from the size distribution, zeta potential and visualization of nanoparticles/agglomerates are presented in Figure 1. The hydrodynamic diameter of the AgNPs exceeded 200 nm, but the slightly negative zeta potential and visualization by TEM indicated that they create agglomerates. In the case of GO, the large hydrodynamic diameter (1170 nm) is related to the GO's

shape; its visualization by TEM revealed it to be in the form of flakes, not a sphere. Finally, complexes created between GO and AgNPs were visualized, showing a variable zeta potential as well as differentiated size; however, the value of the zeta potential was the most negative, approaching the limit value of  $\pm 30$  mV (zeta potential value for GO-Ag was—23.6  $\pm$  8.78 mV).



**Figure 1.** Physicochemical characterization of nanomaterials-silver (AgNPs), graphene oxide (GO) and GO with AgNP complexes (GO-Ag): (**A**) hydrodynamic diameter measured by dynamic light scattering; (**B**) zeta potential of nanomaterials measured by laser Doppler electrophoresis, three colors (blue, green, red) represent repeated measurements of the same sample; (**C**) TEM visualization; (**D**) values of measurements. Each measurement was repeated three times.

The FTIR spectra of the pellets prepared from KBr and the analytes are presented in Figure 2. Wide bands at  $3430 \text{ cm}^{-1}$  related to the -OH groups were found in all spectra. The bands at 2913 cm<sup>-1</sup> and 2843 cm<sup>-1</sup> are related to the CH groups. The band at 1743 cm<sup>-1</sup> in the GO spectrum is related to the carboxyl C=O group. The band at 1640 cm<sup>-1</sup> in the case of GO should be associated with the overlapping H-O-H and C=C vibrations [16]. The bands found at 1445 cm<sup>-1</sup>, 1374 cm<sup>-1</sup> 1160 cm<sup>-1</sup> 1066 cm<sup>-1</sup> and 1015 cm<sup>-1</sup> are related to the C-O and C-OH hydroxyl groups. The AgNPs spectrum is related to the moieties attached to the surface of the nanoparticles. The bands related to the CH groups are also present at around 2900 cm<sup>-1</sup> band. The band at around 1640 cm<sup>-1</sup> is due to the OH scissoring vibrations. The 1374 cm<sup>-1</sup> and the 1066 cm<sup>-1</sup> bands can be ascribed to the C-O and the C-OH vibrations as well [21]. The spectra of the GO and AgNPs composites express the composite characteristics of the two spectra.



**Figure 2.** FT-IR transmittance spectrum of graphene oxide (GO), silver (AgNPs) and GO with AgNP complexes (GO-Ag) in comparison to KBr spectrum.

#### 3.2. Agar Well Diffusion Method

We examined the antibacterial effect of AgNPs, GO and GO-Ag towards two bacteria strains—*S. aureus* and *P. aeruginosa* (Figure 3). The GO-Ag nanocomplex caused higher antibacterial activity but the zone of inhibition created by the complex was indistinguishable between the two different concentrations of GO, so that the combination of silver nanoparticles and GO was still the most effective towards bacteria species. Based on our results, it is noticeable that growth inhibition depends on the microbial species. *S. aureus* showed much bigger zones of growth inhibition in all samples of AgNPs and GO-Ag nanocomposites than *P. aeruginosa*. Thus, *S. aureus* was more sensitive than *P. aeruginosa* to exposure to the substances tested.

#### 3.3. Ultrastructural Analysis by TEM

One of the most possible mechanisms of interaction of nanomaterials with bacteria cells is the disruption of the cell membrane and wall, which both form an outer cover of bacteria. Bare AgNPs and GO were located near cells (Figure 4). AgNPs were found in direct contact with bacteria; they covered the outer layer of *P. aeruginosa*, but the same location of those nanoparticles was not observed for *S. aureus*. The GO provided a large platform on which bacterial cells were situated. The GO-Ag nanocomplex enabled the AgNPs to wrap the bacteria by using a GO carrier, which ensured the bacteria's direct exposure to the AgNPs.



**Figure 3.** Antibacterial effect of nanomaterials-silver nanoparticles (AgNPs), graphene oxide (GO) and GO with AgNP complexes (GO-Ag) by agar well diffusion method: (**A**) effect on *P. aeruginosa* (sample picture); (**B**) effect on *S. aureus* (sample picture); (**C**) zone of inhibition [mm] after treatment with nanomaterials. Ag25GO5 means the composite consisting of AgNPs at concentration 25 µg/mL and GO at 5 µg/mL; Ag25GO10 means the composite consisting of AgNPs at concentration 25 µg/mL and GO at 10 µg/mL; different letters (a–e) indicate significant differences between groups within bacteria species (*p*-value  $\leq$  0.05).

13<sup>e</sup>

13<sup>c</sup>

control

#### 3.4. Viability XTT Assay

Both AgNPs and GO-Ag affected the bacterial viability in a dose-dependent manner (Figure 5A). The complex decreased the viability of *P. aeruginosa* more than when using the component nanoparticles separately in major probes with diverse AgNP concentrations. However, the same tendency was not observed in the *S. aureus* bacterial culture, although the complex reduced the viability by up to 40%.

#### 3.5. ROS Production

In the presented study, all nanomaterials caused the generation of ROS at a higher level compared to the control (Figure 5B). The ROS effect strictly depends on the ROS amount, as it may pose a risk to bacterial function if the optimum is exceeded. The highest ROS production was observed in the GO-Ag complex in both bacterial strains, while the lowest was seen in the GO group. AgNPs led to increased ROS production in all tested microorganisms, though this was only slightly lower than in the complex group.





#### 3.6. Lipid Peroxidation (MDA) Assay

Lipid peroxidation was determined to be a result of oxidative stress from the reaction between malondialdehyde (MDA) and thiobarbituric acid (TBA). The highest lipid peroxidation, which was twice as high as the control, occurred after the treatment of the bacteria suspension with GO-Ag within all samples (Figure 5C). The other individual nanoparticles also increased the MDA level; however, GO was the lowest in relation to the control.

## 3.7. Textile Fabrics—Determination of Antibacterial Activity—Agar Diffusion Plate Test (ISO 20645:2004)

According to ISO standard [22], a zone of inhibition in the range of 0–1 mm and more than 1 mm is assumed to be a good antibacterial effect of the materials tested. Such an effect was achieved in both bacteria strains in the cotton and silk groups (Figure 6). The results showed that polypropylene and interlining fabric had no antibacterial effect for *P. aeruginosa* and *S. aureus*.





#### 3.8. Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay

Angiogenesis was measured using the chicken embryo CAM implantation method. Both length and density in the nanoparticle treatment group were similar to the control (Figure 7). The biggest changes in the development of blood vessels in relation to the control were observed in the interlining fabric implant; however, the differences were insignificant.



**Figure 6.** Antibacterial activity of textile materials against: (**A**) *P. aeruginosa;* (**B**) *S. aureus;* (**C**) evaluation according to ISO 20645:2004. Within each plate shown, implants placed closer to the upper edge of each plate are treated with nanomaterials and implants placed closer to the lower edge of each plate are control textiles.



**Figure 7.** Angiogenesis analysis measured using CAM model: (**A**) measurements under stereomicroscope and the same measurements as binary images (sample pictures), respectively; (**B**) percentage of density and length of blood vessels. There were no significant differences between groups (*p*-value  $\leq 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Currently, with traditional antibiotics being overused, the discovery of new antibacterial therapies appears to be essential for the further curing of infections. The possible solutions are currently attributed to nanotechnology, in which nanoparticles are considered to be therapeutic agents against the antibiotic resistance era [23]. The aim of our study was to evaluate an effective nanocomposite that is able to combat pathogenic bacteria. In order to achieve the intended effect, we conducted a two-level study in which the antibacterial effect was determined by the use of a nanocomposite as the main agent; subsequently, its application to textiles was defined.

In the present study, we demonstrated that AgNPs and GO flakes are able to create a complex structure with changed size distribution and zeta potential in comparison to individual nanoparticles (Figure 1). Silver nanoparticles, which have been used as medical agents since ancient times, are known for their tendency to create agglomerates which may weaken their antibacterial properties [24]. However, the formation of complexes composed of AgNPs and GO ensures better stabilization of the components [25]. This was evident in our study, in which the GO-Ag complex had zeta potential closest to  $\pm$ 30 mV, which indicated that the complex was characterized by better colloidal stability than the components alone. The size distribution of GO indicated the presence of large nanoparticles/agglomerates exceeding 1000 nm in diameter. However, as shown in the TEM analysis, GO was in the form of flakes, not a sphere, and therefore the definition of diameter is not completely clear. Nevertheless, the TEM visualization showed that GO still provides a large platform for attaching AgNPs to its surface, creating a carrier to transport smaller particles. It has been previously demonstrated that GO may be used as a carrier for other antibacterial components, including AgNPs [16,26], CuO [27], or Cu<sub>2</sub>O [28]. Moreover, Vi et al. [29] indicated the strong synergetic effect of GO-Ag due to its promotion of AgNPs on the scaffold formed of GO, so that AgNPs, well known for their antibacterial properties, might directly attack bacteria. The lack of colloidal stability of AgNPs was also visible in the hydrodynamic diameter exceeding 200 nm, as evidenced by the creation of agglomerates. Although it is recognized that smaller particles are more toxic [30], it may be slightly different when using composites. Results obtained from the research of Truong et al. [31] indicated that smaller GO-Ag did not have a better antibacterial effect because they only disturbed bacteria cells, while the bigger ones physically separated those cells from the nutrient medium and allowed silver ions to penetrate the cells' structure, giving better antibacterial properties.

The antibacterial properties of nanomaterials are shown in Figure 3, where the inhibition of growth is visible by the zone around each well. The biggest zones of inhibition were observed in the bacteria in the wells with AgNPs as well as with the GO-Ag nanocomplex. GO had no antibacterial effect, giving the zone of inhibition growth was only 1 mm more than the well's diameter itself. Similar results were obtained in previous studies where the zone of inhibition created by a complex of reduced GO (rGO) and AgNPs was twice the size of the rGO used on its own [32]. The diffusion of nanoparticles through the agar is hampered, but due to the highly satisfactory results obtained from agar diffusion tests, it appears to release silver ions from AgNPs as the main antibacterial agent [33]. This confirms our results where the zone of inhibition was similar in two groups: the bare AgNPs and the GO-Ag complex where AgNPs were used in the same concentration as in the individual AgNPs group. Considering that the GO nanoparticles were large flakes, the mechanism of releasing Ag ions from nanoparticles, which inhibits bacterial growth in GO-Ag nanocomposites, seems likely due to satisfactory antibacterial results from the agar well diffusion test, where bare GO did not cause an antibacterial effect and, due to its large size, may have diffusion limitations in agar.

The visualization of the interaction between nanomaterials and bacteria cells was analyzed by TEM (Figure 4). The main visible point of action was the accumulation around the bacteria cells, as well as on their surface, especially in the case of GO-Ag, where large GO flakes with smaller AgNPs coated the bacteria surface. The accumulation of the nanocomposite around the bacteria cells was confirmed by Moraes et al. [34]. The results clearly showed that nanomaterials interact with the cell membrane. This was also confirmed in our previous study [16], where the disruption of the cell membrane was expressed by LDH leakage in all groups of microorganisms after exposure to AgNPs and GO-Ag composites. However, due to the preparation of samples in which the cells were in one piece, it is possible that there are more interaction points between nanoparticles and bacteria than just adhesion to the membrane surface. As outlined previously, the exposure of NPs to bacteria cells involves action at many different levels, including disruption of the cell wall and membrane, generation of ROS and growth inhibition [16,35]. To determine the changes that occur in the bacteria metabolism, we performed the tetrazolium salt assay XTT. The results clearly showed that the cells' metabolism was limited after exposure to the nanomaterials used in a dose-dependent manner (Figure 5A). Viability did not differ substantially between two bacteria species in the same groups; however, *P. aeruginosa* seemed to be more sensitive to GO-Ag, although the difference was marginal.

The higher susceptibility of *P. aeruginosa* was not visible in other analyses, for example, the agar well diffusion method, where *S. aureus* was more sensitive. The complexity of using a composite, however, leads to different parts interacting with different bacteria properties. On the one hand, the thin cell wall of Gram-negative bacteria does not provide protection against silver ions, which can penetrate the wall regardless of the presence of an outer layer [36]. On the other hand, it was reported that Gram-negative bacteria repel negatively-charged GO sheets, thereby indicating a higher viability than Gram-positive bacteria. GO sheets, despite their negative zeta potential, may interact with the negative surface charge of Gram-positive bacteria, even if, theoretically, these two charges should repel each other. The interaction may occur due to the stronger covalent bonds among carboxylic groups of GO and amines of peptidoglycan and amino acids [37]. In the FT-IR analysis (Figure 2), C-O and C-OH hydroxyl groups were found; thus, the hypothesis about their interaction with peptidoglycan seems to be probable.

The interaction of AgNPs with bacteria is defined as bimodal; the mechanism primarily consists of the impact on the cell membrane and wall, but subsequently leads to adsorption of NPs into the cell. ROS are also generated, which, despite their action inside the cell, are considered to be possible elements of the primary mechanism, as they counteract the antioxidant defense and lead to cell damage [38]. In our study, the highest level of ROS was in the nanocomplex groups; however, while bare AgNPs achieved a similar level, GO caused no oxidative stress, with the value close to the control groups (Figure 5B). A higher ROS production caused by GO-Ag than the level triggered by GO was also confirmed by Truong et al. [31].

Exceeding the optimum level of ROS results in a lack of scavenging by antioxidants which are able to neutralize ROS. Consequently, the induced oxidative stress is high enough to start destroying cells by acting directly on membrane lipids [39]. In the present study, both AgNPs and the complex GO-Ag caused oxidative stress, as reflected in the increase in the lipid peroxidation level. Such a correlation was confirmed by Song et al. [40], who suggested that the main mechanism of the antibacterial action of GO-Ag is synergetic between cell membrane disruption and lipid peroxidation. The capability of ROS generation resulted in membrane lipid peroxidation [41]. The interaction between the levels of ROS and MDA was also determined in the case of bare AgNPs [42]. In our research, the concentration of MDA in both bacteria species was the highest after exposure to GO-Ag, compared with the control. Similarly high values were achieved in the group of AgNPs, but the concentration was lower than in the abovementioned example (Figure 5C). Curiously, the higher concentration of MDA and lower generation of ROS presented in P. aeruginosa, which is Gram-negative bacteria, indicated that they react in a different way than Grampositive bacteria due to the presence of an outer membrane in the Gram-negative species. To summarize, the probable mechanism of action of the GO-Ag nanocomposite begins with the attachment to cells, which causes cell wall and membrane disturbance, but also the



generation of ROS and lipid peroxidation, which, all together, ultimately lead to bacterial cell death (Figure 8).

**Figure 8.** The mechanism of action of GO-Ag nanocomposite toward bacterial cells, including attachment of the complex, generation of ROS, lipid peroxidation and degradation of outer layer of bacteria resulting in bacteria death.

Textile fabrics' popularity is due to their wide range of applications, biodegradability, low cost and versatile usage. In order to create these materials with antibacterial properties, it is necessary to overcome some of their features, including hydrophilicity and porous structure, which make textiles a suitable growth medium for microorganisms [43]. Coating textiles in order to exhibit antibacterial features enables a wide range of usage, especially in the context of textiles from which healthcare products such as face masks are produced. It not only assures better properties, but also limits the spread of microorganisms, which are frequently drug-resistant. Farouk et al. [44] prepared nanocomposite-coated cotton and linen with highly antibacterial properties. In our study, only cotton and silk coated with the nanocomposite GO-Ag had antibacterial properties that had a good effect on both bacteria species, according to the standard ISO 20645:2004 for textile fabrics (Figure 6). A similar effect with the use of those two textiles was confirmed in other studies, where cotton coated with AgNPs had antibacterial properties demonstrated by the zone of inhibition towards the two bacteria *E. coli* and *S. aureus* [45]. Furthermore, silk coated with AgNPs inhibited the growth of bacteria strains even after 30 washes, implying a strong bond between the two structures [46]. GO contains many oxide functional groups by which it is able to bind, through the electrostatic interaction between two types of chemical groups, to textiles such as silk [47]. In our research, GO was used as a carrier for other nanoparticles; thus, it is probable that the nanocomposite attached to the silk through the interaction of the GO's reactive chemical groups and the silk surface, which resulted in the best antibacterial properties of the tested textiles.

When using textiles or other kinds of materials, it is especially important to study their biocompatibility. An appropriate way to investigate such properties is the CAM assay [48], which is widely used as a toxicology model for different substances [49]. In recent years, this model has even become an intermediate step between in vitro and in vivo animal studies [50]. Conducting research in the field of nanomaterial toxicology is extremely challenging due to the large number of aspects that have to be taken into consideration, and the fact that many animals would be required to characterize a single substance [51]. In our

study, the GO-Ag complex, as a factor influencing possible changes in the chorioallantoic membrane, did not cause the toxicity effect (Figure 7), as shown by the density and length of blood vessels from the CAM assay. The results were not diverse in relation to the non-treated control groups of the textile materials. The biggest differences were observed in the interlining group, but the difference was a few percentage points only. Similar results when using the nanoplatform GO-Ag were obtained by Wierzbicki et al. [52].

#### 5. Conclusions

In conclusion, the effect of the application of GO decorated with silver nanoparticles towards two bacteria strains, P. aeruginosa and S. aureus, exhibited strong antibacterial potential (viability after the treatment of *P. aeruginosa* and *S. aureus* with the selected GO-Ag decreased to 27% and 31%, respectively, compared to AgNPs, when the viability of both species was 31% and 34%, accordingly). We demonstrated that, when bacteria cells are treated with a GO-Ag nanocomposite, more than the basic interaction point occurs. It was proven that the microbial cell membrane is disrupted, and oxidative stress and lipid peroxidation also contribute to cell death. Based on our results, nanocomposites of GO-Ag are able to overcome the limitation of single nanocomponents (zeta potential of GO-Ag was  $-23.6 \pm 8.78$  mV, while bare AgNPs was  $-18.7 \pm 5.33$  mV), and they may, therefore, constitute an effective agent towards resistant bacteria. Furthermore, nanocomposite-coated textiles showed excellent antibacterial properties, especially silk. Given the abovementioned facts concerning the effective action of nanocomposites and the coated textiles, we concluded that composites of GO-Ag may have practical applications in both coating textiles and using them independently, due to the efficient antimicrobial features that GO-Ag nanocomposites demonstrate.

Author Contributions: Conceptualization, S.J., E.S. and A.L.; methodology, S.J., E.S. and A.L.; software, A.L.; validation, M.W., M.K., B.S. and A.L.; formal analysis, A.L. and S.J.; investigation, A.L., S.J., E.S., K.D., M.K., M.W., B.S., B.W., M.Ł., M.G. and A.O.; resources, S.J. and E.S.; data curation, A.L.; writing—original draft preparation, A.L., M.Ł., A.O.; writing—review and editing, A.L., S.J. and A.C.; visualization, K.D.; supervision, S.J.; project administration, S.J., E.S. and A.L.; funding acquisition, E.S. and M.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the National Center for Research and Development in Poland, project number POIR.02.03.02-10-0016/20 and by the National Center for Research and Development in Poland, project dedicated to COVID-19 Hospitals 23/2020 and by The National Science Centre, project number 2016/21/N/NZ6/01529.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on reasonable request from the corresponding author.

Acknowledgments: The manuscript is part of the Ph.D. thesis of Agata Lange.

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

#### References

- Bartlett, J.G.; Gilbert, D.N.; Spellberg, B. Seven Ways to Preserve the Miracle of Antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 2013, 56, 1445–1450. [CrossRef] [PubMed]
- Shallcross, L.J.; Davies, D.S.C. Antibiotic overuse: A key driver of antimicrobial resistance. *Br. J. Gen. Pract.* 2014, 64, 604–605. [CrossRef]
- Rossolini, G.M.; Arena, F.; Pecile, P.; Pollini, S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2014, 18, 56–60. [CrossRef] [PubMed]
- Petkova, P.; Francesko, A.; Fernandes, M.M.; Mendoza, E.; Perelshtein, I.; Gedanken, A.; Tzanov, T. Sonochemical Coating of Textiles with Hybrid ZnO/Chitosan Antimicrobial Nanoparticles. ACS Appl. Mater. Interfaces 2014, 6, 1164–1172. [CrossRef] [PubMed]

- 5. Huh, A.J.; Kwon, Y.J. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J. Control. Release* 2011, 156, 128–145. [CrossRef]
- Yin, I.X.; Zhang, J.; Zhao, I.S.; Mei, M.L.; Li, Q.; Chu, C.H. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int. J. Nanomed.* 2020, 15, 2555–2562. [CrossRef]
- Zhang, Y.; Dasari, T.P.S.; Deng, H.; Yu, H. Antimicrobial Activity of Gold Nanoparticles and Ionic Gold. J. Environ. Sci. Heath Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. 2015, 33, 286–327. [CrossRef]
- 8. Tiwari, V.; Mishra, N.; Gadani, K.; Solanki, P.; Shah, N.A.; Tiwari, M. Mechanism of Anti-bacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticle Against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1218. [CrossRef]
- Dadi, R.; Azouani, R.; Traore, M.; Mielcarek, C.; Kanaev, A. Antibacterial activity of ZnO and CuO nanoparticles against gram positive and gram negative strains. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 104, 109968. [CrossRef]
- Gabrielyan, L.; Hovhannisyan, A.; Gevorgyan, V.; Ananyan, M.; Trchounian, A. Antibacterial effects of iron oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles: Distinguishing concentration-dependent effects with different bacterial cells growth and membrane-associated mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019, 103, 2773–2782. [CrossRef]
- 11. Rai, M.; Kon, K.; Ingle, A.; Duran, N.; Galdiero, S.; Galdiero, M. Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: The emerging trends and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 1951–1961. [CrossRef] [PubMed]
- 12. Raza, M.A.; Kanwal, Z.; Rauf, A.; Sabri, A.N.; Riaz, S.; Naseem, S. Size- and Shape-Dependent Antibacterial Studies of Silver Nanoparticles Synthesized by Wet Chemical Routes. *Nanomaterials* **2016**, *6*, 74. [CrossRef] [PubMed]
- Pal, S.; Tak, Y.K.; Song, J.M. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73, 1712–1720. [CrossRef]
- 14. Lu, Z.; Rong, K.; Li, J.; Yang, H.; Chen, R. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, *24*, 1465–1471. [CrossRef] [PubMed]
- 15. Bélteky, P.; Rónavári, A.; Igaz, N.; Szerencsés, B.; Tóth, I.Y.; Pfeiffer, I.; Kiricsi, M.; Kónya, Z. Silver nanoparticles: Aggregation behavior in biorelevant conditions and its impact on biological activity. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 667–687. [CrossRef] [PubMed]
- Jaworski, S.; Wierzbicki, M.; Sawosz, E.; Jung, A.; Gielerak, G.; Biernat, J.; Jaremek, H.; Łojkowski, W.; Woźniak, B.; Wojnarowicz, J.; et al. Graphene Oxide-Based Nanocomposites Decorated with Silver Nanoparticles as an Antibacterial Agent. *Nanoscale Res. Lett.* 2018, *13*, 1–17. [CrossRef] [PubMed]
- 17. Campbell, E.; Hasan, M.T.; Pho, C.; Callaghan, K.; Akkaraju, G.R.; Naumov, A.V. Graphene Oxide as a Multifunctional Platform for Intracellular Delivery, Imaging, and Cancer Sensing. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 416. [CrossRef]
- 18. Warsi, A.-Z.; Aziz, F.; Zulfiqar, S.; Haider, S.; Shakir, I.; Agboola, P.O. Synthesis, Characterization, Photocatalysis, and Antibacterial Study of WO<sub>3</sub>, MXene and WO<sub>3</sub>/MXene Nanocomposite. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 713. [CrossRef]
- Baldino, L.; Aragón, J.; Mendoza, G.; Irusta, S.; Cardea, S.; Reverchon, E. Production, characterization and testing of antibacterial PVA membranes loaded with HA-Ag3 PO4 nanoparticles, produced by SC-CO2 phase inversion. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2018, 94, 98–108. [CrossRef]
- Mcfarland Standards Product Code SD2350, SD2300, SD2301, SD2302, SD2303, SD2304; Standard Operating Procedure. Pro-Lab Diagnostics: Richmond Hill, ON, Canada, 2012.
- Aziz, S.B.; Hussein, G.; Brza, M.A.; Mohammed, S.J.; Abdulwahid, R.T.; Saeed, S.R.; Hassanzadeh, A. Fabrication of Interconnected Plasmonic Spherical Silver Nanoparticles with Enhanced Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) Peaks Using Quince Leaf Extract Solution. *Nanomaterials* 2019, 9, 1557. [CrossRef]
- ISO-ISO 20645:2004; Textile Fabrics—Determination of Antibacterial Activity—Agar Diffusion Plate Test. The European Committee for Standardization: Brussels, Belgium, 2004. Available online: <a href="https://www.iso.org/standard/35499.html">https://www.iso.org/standard/35499.html</a> (accessed on 13 August 2021).
- 23. Fatima, F.; Siddiqui, S.; Khan, W.A. Nanoparticles as Novel Emerging Therapeutic Antibacterial Agents in the Antibiotics Resistant Era. *Biol. Trace Element Res.* **2021**, *199*, 2552–2564. [CrossRef] [PubMed]
- 24. Bruna, T.; Maldonado-Bravo, F.; Jara, P.; Caro, N. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 7202. [CrossRef] [PubMed]
- Chen, S.; Li, X.; Zhao, Y.; Chang, L.; Qi, J. Graphene oxide shell-isolated Ag nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering. *Carbon* 2015, *81*, 767–772. [CrossRef]
- 26. Wang, H.; Zhang, Y.; Xu, X.; Yang, F.; Li, K.; Wei, D.; Liu, Z. Efficient loading of silver nanoparticles on graphene oxide and its antibacterial properties. *Nano Express* **2020**, *1*, 010041. [CrossRef]
- 27. Menazea, A.; Ahmed, M. Synthesis and antibacterial activity of graphene oxide decorated by silver and copper oxide nanoparticles. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1218*, 128536. [CrossRef]
- Yang, Z.; Hao, X.; Chen, S.; Ma, Z.; Wang, W.; Wang, C.; Yue, L.; Sun, H.; Shao, Q.; Murugadoss, V.; et al. Long-term antibacterial stable reduced graphene oxide nanocomposites loaded with cuprous oxide nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 2019, 533, 13–23. [CrossRef]
- 29. Vi, T.T.T.; Kumar, S.R.; Pang, J.-H.S.; Liu, Y.-K.; Chen, D.W.; Lue, S.J. Synergistic Antibacterial Activity of Silver-Loaded Graphene Oxide towards *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 366. [CrossRef]
- Sukhanova, A.; Bozrova, S.; Sokolov, P.; Berestovoy, M.; Karaulov, A.; Nabiev, I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Res. Lett.* 2018, 13, 44. [CrossRef]

- 31. Truong, T.T.V.; Kumar, S.R.; Huang, Y.-T.; Chen, D.W.; Liu, Y.-K.; Lue, S.J. Size-Dependent Antibacterial Activity of Silver Nanoparticle-Loaded Graphene Oxide Nanosheets. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1207. [CrossRef]
- Prasad, K.; Lekshmi, G.S.; Ostrikov, K.; Lussini, V.; Blinco, J.; Mohandas, M.; Vasilev, K.; Bottle, S.; Bazaka, K.; Ostrikov, K. Synergic bactericidal effects of reduced graphene oxide and silver nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Sci. Rep.* 2017, 7, 1591. [CrossRef]
- Kourmouli, A.; Valenti, M.; van Rijn, E.; Beaumont, H.J.E.; Kalantzi, O.-I.; Schmidt-Ott, A.; Biskos, G. Can disc diffusion susceptibility tests assess the antimicrobial activity of engineered nanoparticles? *J. Nanoparticle Res.* 2018, 20, 62. [CrossRef] [PubMed]
- 34. de Moraes, A.C.M.; Lima, B.A.; de Faria, A.F.; Brocchi, M.; Alves, O.L. Graphene oxide-silver nanocomposite as a promising biocidal agent against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 6847–6861. [CrossRef] [PubMed]
- 35. Singh, J.; Vishwakarma, K.; Ramawat, N.; Rai, P.; Singh, V.K.; Mishra, R.K.; Kumar, V.; Tripathi, D.K.; Sharma, S. Nanomaterials and microbes' interactions: A contemporary overview. *3 Biotech* **2019**, *9*, 68. [CrossRef]
- Pazos-Ortiz, E.; Roque-Ruiz, J.H.; Hinojos-Márquez, E.A.; López-Esparza, J.; Donohue-Cornejo, A.; Cuevas-González, J.C.; Espinosa-Cristóbal, L.F.; Reyes-López, S.Y. Dose-Dependent Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles on Polycaprolactone Fibers against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. J. Nanomater. 2017, 2017, 4752314. [CrossRef]
- Di Giulio, M.; Zappacosta, R.; Di Lodovico, S.; DI Campli, E.; Siani, G.; Fontana, A.; Cellini, L. Antimicrobial and Antibiofilm Efficacy of Graphene Oxide against Chronic Wound Microorganisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018, 62, e00547-18. [CrossRef]
- 38. Slavin, Y.N.; Asnis, J.; Häfeli, U.O.; Bach, H. Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J. Nanobiotechnol.* **2017**, *15*, 65. [CrossRef] [PubMed]
- 39. Quinteros, M.A.; Aristizábal, V.C.; Dalmasso, P.R.; Paraje, M.G.; Páez, P.L. Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicol. Vitr.* **2016**, *36*, 216–223. [CrossRef]
- 40. Song, B.; Zhang, C.; Zeng, G.; Gong, J.; Chang, Y.; Jiang, Y. Antibacterial properties and mechanism of graphene oxide-silver nanocomposites as bactericidal agents for water disinfection. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, 604, 167–176. [CrossRef]
- 41. Chang, Y.-N.; Gong, J.-L.; Zeng, G.-M.; Ou, X.-M.; Song, B.; Guo, M.; Zhang, J.; Liu, H.-Y. Antimicrobial behavior comparison and antimicrobial mechanism of silver coated carbon nanocomposites. *Process Saf. Environ. Prot.* **2016**, *102*, 596–605. [CrossRef]
- Adeyemi, O.S.; Shittu, E.O.; Akpor, O.B.; Rotimi, D.; Batiha, G.E.-S. Silver nanoparticles restrict microbial growth by promoting oxidative stress and DNA damage. EXCLI J. 2020, 19, 492–500.
- Ouadil, B.; Amadine, O.; Essamlali, Y.; Cherkaoui, O.; Zahouily, M. A new route for the preparation of hydrophobic and antibacterial textiles fabrics using Ag-loaded graphene nanocomposite. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 2019, 579, 123713. [CrossRef]
- 44. Farouk, A.; Saeed, S.E.-S.; Sharaf, S.; El-Hady, M.M.A. Photocatalytic activity and antibacterial properties of linen fabric using reduced graphene oxide/silver nanocomposite. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 41600–41611. [CrossRef]
- Shateri-Khalilabad, M.; Yazdanshenas, M.E.; Etemadifar, A. Fabricating multifunctional silver nanoparticles-coated cotton fabric. *Arab. J. Chem.* 2017, 10, S2355–S2362. [CrossRef]
- 46. Marín, C.B.; Fitzpatrick, V.; Kaplan, D.L.; Landoulsi, J.; Guénin, E.; Egles, C. Silk Polymers and Nanoparticles: A Powerful Combination for the Design of Versatile Biomaterials. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 1141. [CrossRef]
- 47. Zulan, L.; Zhi, L.; Lan, C.; Sihao, C.; Dayang, W.; Fangyin, D. Reduced Graphene Oxide Coated Silk Fabrics with Conductive Property for Wearable Electronic Textiles Application. *Adv. Electron. Mater.* **2019**, *5*, 1800648. [CrossRef]
- Zwadlo-Klarwasser, G.-C.; Görlitz, K.; Hafemann, B.; Klee, D.; Klosterhalfen, B. The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of the angiogenic and inflammatory response to biomaterials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2001, 12, 195–199. [CrossRef]
- 49. Ribatti, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. Reprod. Toxicol. 2017, 70, 97–101. [CrossRef]
- Fraguas-Sánchez, A.I.; Martín-Sabroso, C.; Torres-Suárez, A.I. The chick embryo chorioallantoic membrane model: A research approach for ex vivo and in vivo experiments. *Curr. Med. Chem.* 2021, 28, 1702–1717. [CrossRef]
- 51. Buhr, C.R.; Wiesmann, N.; Tanner, R.C.; Brieger, J.; Eckrich, J. The Chorioallantoic Membrane Assay in Nanotoxicological Research—An Alternative for *In Vivo* Experimentation. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 2328. [CrossRef]
- 52. Wierzbicki, M.; Jaworski, S.; Sawosz, E.; Jung, A.; Gielerak, G.; Jaremek, H.; Łojkowski, W.; Woźniak, B.; Stobiński, L.; Małolepszy, A.; et al. Graphene Oxide in a Composite with Silver Nanoparticles Reduces the Fibroblast and Endothelial Cell Cytotoxicity of an Antibacterial Nanoplatform. *Nanoscale Res. Lett.* 2019, 14, 1–11. [CrossRef]

Warszawa, 18.09.2024r.

mgr inż. Agata Lange agata lange1@sggw.edu.pl

> Rada Dyscypliny Nauki **Biologiczne**

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Agata Lange, Ewa Sawosz, Mateusz Wierzbicki, Marta Kutwin, Karolina Daniluk, Barbara Strojny, Agnieszka Ostrowska, Barbara Wójcik, Maciej Łojkowski, Marcin Gołębiewski, André Chwalibog, Sławomir Jaworski. 2022; Nanocomposites of Graphene Oxide-Silver Nanoparticles for Enhanced Antibacterial Activity: Mechanism of Action and Medical Textiles Coating. Materials. 15(9):3122." mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: zaplanowaniu wykonywanych badań (analizy fizykochemiczne, analizy biologiczne) oraz opracowaniu metodyki, sprawdzeniu poprawności danych, wykonaniu analiz (analiza fizykochemiczna: pomiar potencjału zeta i średnicy hydrodynamicznej; analizy biologiczne: metoda dyfuzyjno-studzienkowa, przygotowanie preparatów do mikroskopii, analiza XTT, ROS, MDA, badanie normatywne zgodnie z norma ISO 20645:2004, analiza angiogenezy z wykorzystaniem modelu CAM) oraz opracowaniu uzyskanych danych z wszystkich przeprowadzonych analiz, przygotowaniu i redakcji manuskryptu oraz współuczestniczeniu w zarządzaniu całym projektem publikacji.

Agale Lange Podpis

prof. dr hab. Ewa Sawosz Chwalibóg ewa\_sawosz@sggw.cdu.pl

> Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Agata Lange, Ewa Sawosz, Mateusz Wierzbicki, Marta Kutwin, Karolina Daniluk, Barbara Strojny, Agnieszka Ostrowska, Barbara Wójcik, Maciej Łojkowski, Marcin Gołębiewski, André Chwalibog, Sławomir Jaworski. 2022; Nanocomposites of Graphene Oxide-Silver Nanoparticles for Enhanced Antibacterial Activity: Mechanism of Action and Medical Textiles Coating. *Materials*. 15(9):3122." mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zarządzaniu projektem, współuczestniczeniu w przeprowadzonych analizach oraz zapewnieniu finansowania przeprowadzonych analiz i procesu wydawniczego.

Podpis

### dr Marta Kutwin

marta\_prasek@sggw.edu.pl

#### Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Agata Lange, Ewa Sawosz, Mateusz Wierzbicki, Marta Kutwin, Karolina Daniluk, Barbara Strojny, Agnicszka Ostrowska, Barbara Wójcik, Maciej Łojkowski, Marcin Gołębiewski, André Chwalibog, Sławomir Jaworski. 2022; Nanocomposites of Graphene Oxide-Silver Nanoparticles for Enhanced Antibacterial Activity: Mechanism of Action and Medical Textiles Coating. *Materials*. 15(9):3122." mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na sprawdzaniu poprawności oraz współuczestniczeniu w przeprowadzanych analizach.

Podpis/utuin Moute

Warszawa, 18.09.2024r.

dr inż. Agnieszka Ostrowska agnieszka\_ostrowska@sggw.edu.pl

> Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Agata Lange, Ewa Sawosz, Mateusz Wierzbicki, Marta Kutwin, Karolina Daniluk, Barbara Strojny, Agnieszka Ostrowska, Barbara Wójcik, Maciej Łojkowski, Marcin Gołębiewski, André Chwalibog, Sławomir Jaworski. 2022; Nanocomposites of Graphene Oxide-Silver Nanoparticles for Enhanced Antibacterial Activity: Mechanism of Action and Medical Textiles Coating. *Materials*. 15(9):3122." mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: przeprowadzan<sup>3</sup>u analiz oraz przygotowywaniu wersji roboczej manuskryptu.

A. Ormoure

Podpis

Warszawa, 18.09.2024r.

dr hab. Sławomir Jaworski, prof. SGGW slawomir\_jaworski@sggw.edu.pl

> **Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne**

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Agata Lange, Ewa Sawosz, Mateusz Wierzbicki, Marta Kutwin, Karolina Daniluk, Barbara Strojny, Agnieszka Ostrowska, Barbara Wójcik, Maciej Łojkowski, Marcin Gołębiewski, André Chwalibog, Sławomir Jaworski. 2022; Nanocomposites of Graphene Oxide-Silver Nanoparticles for Enhanced Antibacterial Activity: Mechanism of Action and Medical Textiles Coating, Materials. 15(9):3122." mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: zaplanowaniu wykonywanych badań oraz opracowaniu metodyki, pomocy w wykonywaniu analiz i analizie formalnej uzyskanych wyników, zapewnieniu materiałów do badań, nadzorze przeprowadzonych analiz, redakcji manuskryptu i zarządzaniu projektem.

Podpis Javors ( Starvour, .



Article



## Bacterial Surface Disturbances Affecting Cell Function during Exposure to Three-Compound Nanocomposites Based on Graphene Materials

Agata Lange <sup>1,\*</sup><sup>(D)</sup>, Ewa Sawosz <sup>1</sup>, Karolina Daniluk <sup>1</sup>, Mateusz Wierzbicki <sup>1</sup><sup>(D)</sup>, Artur Małolepszy <sup>2</sup><sup>(D)</sup>, Marcin Gołębiewski <sup>3</sup><sup>(D)</sup> and Sławomir Jaworski <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, 02-786 Warsaw, Poland
- Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, 00-654 Warsaw, Poland
  Department of Animal Breeding, Institute of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences,
- 02-786 Warsaw, Poland
- \* Correspondence: agata\_lange@sggw.edu.pl (A.L.); slawomir\_jaworski@sggw.edu.pl (S.J.); Tel.: +48-225936675 (S.J.)

**Abstract:** Combating pathogenic microorganisms in an era of ever-increasing drug resistance is crucial. The aim of the study was to evaluate the antibacterial mechanism of three-compound nanocomposites that were based on graphene materials. To determine the nanomaterials' physicochemical properties, an analysis of the mean hydrodynamic diameter and zeta potential, transmission electron microscope (TEM) visualization and an FT-IR analysis were performed. The nanocomposites' activity toward bacteria species was defined by viability, colony forming units, conductivity and surface charge, cell wall integrity, ATP concentration, and intracellular pH. To ensure the safe usage of nanocomposites, the presence of cytokines was also analyzed. Both the graphene and graphene oxide (GO) nanocomposites exhibited a high antibacterial effect toward all bacteria species (*Enterobacter cloacae, Listeria monocytogenes, Salmonella enterica,* and *Staphylococcus aureus*), as well as exceeded values obtained from exposure to single nanoparticles. Nanocomposites caused the biggest membrane damage, along with ATP depletion. Nanocomposites that were based on GO resulted in lower toxicity to the cell line. In view of the many aspects that must be considered when investigating such complex structures as are three-component nanocomposites, studies of their mechanism of action are crucial to their potential antibacterial use.

Keywords: nanocomposites; bacteria; graphene materials; cell functions

#### 1. Introduction

The biochemical reactions of bacterial metabolism constitute the base of their survival. They provide structural and functional components as well as the energy required for life processes [1]. Changes in energy metabolism are, in turn, associated with other cellular processes such as nutrient uptake or the efflux of toxic compounds [2]. Energy dependencies are explained by the commonly known Mitchell's theory, under which the "intact" membrane serves as a proton pump, in which, during electron transport, a proton extrusion reaction occurs, and energy is generated. Such energy is strictly linked to ATP synthesis [3].

The bacteria's external surface is crucial in the interaction between the cell and the surrounding environment [4]. Peptidoglycan is one of the basic components of the cell wall structure. Differentiation between Gram-positive and Gram-negative bacteria relies on the various natures of peptides, while the sugar moieties' compositions are common for both types [5].

Nanomaterials are used as antimicrobial agents because they perform multiple mechanisms that occur simultaneously in bacteria cells, in contrast to traditional antibiotics whose



Citation: Lange, A.; Sawosz, E.; Daniluk, K.; Wierzbicki, M.; Małolepszy, A.; Gołębiewski, M.; Jaworski, S. Bacterial Surface Disturbances Affecting Cell Function during Exposure to Three-Compound Nanocomposites Based on Graphene Materials. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 3058. https://doi.org/ 10.3390/nano12173058

Academic Editors: Maria Letizia Manca and Heyou Han

Received: 26 July 2022 Accepted: 30 August 2022 Published: 2 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 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/). mechanisms are acting as simple structures or processes [6–8]. The toxicity of nanomaterials is affected by many different aspects, including size, surface area and chemistry, and the ability to agglomerate [9]. An increase in the proportion of atoms and molecules on a nanomaterial's surface causes the surface properties to determine their behavior [10]. One possible usage of nanoparticles is their application in the form of drug carriers, given that they have a small size and that they may be potentially biocompatibility if their surface electron status, which is involved in cytotoxicity, is properly prepared [11]. Despite the same scale, distinct types of nanomaterials exhibit different physical and chemical properties. Metal and metal oxide nanoparticles possess promising conductive properties, and they may transfer electrons, while carbon-based nanoparticles (graphene, graphene oxide/GO, or carbon nanotubes) possess electrochemical features. The connection between metal and carbon nanomaterials leads to a higher surface-to-volume ratio, which results in enhanced electrocatalytic properties [12].

Metal-based nanoparticles (e.g., silver, copper, copper oxide, zinc oxide) have already been defined as antibacterial with non-specific toxicity, which makes them able to fight pathogens that are listed as a priority [13]. This is especially important, given the new age of bacterial resistance, as many bacteria species have acquired resistance to bactericides and antibiotics, and many organic substances with antibacterial potential cause allergic reactions [14]. Despite this, graphene family materials may also exhibit antibacterial properties toward typical groups of pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Streptococcus mutans, Escherichia coli, Staphylococcus epidermidis, and Enterococcus faecalis, which may cause infections that are harmful to human health [15]. The planktonic bacteria model was the first to allow researchers to begin the work on antimicrobial agents. This enabled the production of biocides that could combat bacteria [16]. Even though most bacteria species are able to live in a biofilm structure, which is more complicated and different from that of planktonic cells [17], biofilm formation, nonetheless, starts with the adherence of free-floating planktonic bacteria cells to the surfaces [18]. Some of the genera (Salmonella, Listeria, Staphylococcus, Clostridium, *Campylobacter*, *Enterobacter*) are related to food products; therefore, they cause foodborne diseases because of the colonization of food products or the production of toxins which are subsequently ingested by humans [19–21]. Graphene family materials tend to agglomerate because of inner-plane interactions; thus, to counteract this process, the graphene-based materials' surfaces have been modified and functionalized by a metal ions', oxides', and sulfides' NPs or polymers [15]. In addition, the dispersion of some metal nanoparticles such as zinc oxide on the graphene sheets prevents their agglomeration by allowing this material to come into close contact with bacterial cells [22]. GO may constitute a functional platform for metal nanoparticles as it provides a long-term release of metal-based nanoparticles, even if more than two compounds' nanocomposites are created [23]. However, the mechanisms of multicomponent nanocomposites have many more interaction points, given the effects that single nanoparticles may exhibit [24]. Given the many components that these composites may have, the creation of antibacterial nanocomposites is strongly needed to examine the strict mechanism of the antibacterial effect [25].

The aim of the study was to evaluate the mechanism of three-compound nanocomposites that can disrupt bacterial cells by the disorder of proton and electron flow. For this purpose, the following processes were carried out: for the physicochemical analysis of the nanomaterials, the zeta potential measurements were taken, a hydrodynamic diameter determination was made, a transmission electron microscope (TEM) visualization was conducted, and an FT-IR analysis was performed; to determine their impact on the bacteria cells, a viability analysis was performed via a PrestoBlue assay, and their ability to conduct colony formation, and the cell wall and membrane integrity were determined via a lactate dehydrogenase (LDH) assay, then, the bacterial conductivity and zeta potential, ATP concentration, and intracellular pH were measured. Thereafter, the toxicity toward human cells was verified.

#### 2. Materials and Methods

#### 2.1. Bacterial Culture

*Enterobacter cloacae* (ATCC BAA-2341), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), *Salmonella enterica* (ATCC 13076), and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) were obtained from LGC Standards (Teddington, GB) in the form of a spore suspension. Before their use in the experiments, the suspensions were defrosted and washed with distilled water to remove glycerol. The bacteria strains were cultured in nutrient media: tryptic soy agar (TSA) for *S. aureus* and *S. enterica*, and brain heart agar (BHA) for *L. monocytogenes* and *E. cloacae*. Before each experiment, the bacteria's suspension in distilled buffer saline was prepared according to the appropriate density in the McFarland scale [26].

#### 2.2. Physicochemical Analysis of Nanoparticles

Copper nanoparticle (Cu) (purity 99.8%, 25 nm), zinc oxide (ZnO), and graphene (GN) nanopowders (11–15 nm) were obtained from SkySpring Nanometerials (Houston, TX, USA), and GO was obtained from Advanced Graphene Products (Zielona Góra, Poland).

The zeta potential was measured by electrophoretic light scattering (ELS), and the hydrodynamic average was measured by dynamic light scattering using the Zeta Sizer Nano-ZS90 analyzer (Malvern Instruments, Malvern, UK) at room temperature for all nanomaterials, preceded by sonication at 500 W and 20 kHz for 2 min, and in case of nanocomposites, they were left for 15 min for self-combination.

TEM analysis was conducted with the use of the JEM-1220 (JEOL, Tokyo, Japan), operated at a voltage of 80 KeV. Droplets of each sample were placed onto TEM grids (Formvar on 3 mm 200 mesh Cu grids, Agar Scientific, Stansted, UK), and the samples were observed immediately.

FT-IR measurements were performed using a Nicolet iS10 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) spectrometer. Before the sample measurement, a "dry air" background was recorded, which was subtracted automatically during the registration of spectra for the investigated samples. The samples were mixed with KBr at a ratio of 1/300 mg and then compressed at 7 MPa cm<sup>-2</sup> to form a pellet, and the transmission spectrum was recorded. The spectra were collected in the range of 400-4000 cm<sup>-1</sup>.

The pH measurements of nanomaterials in ultra-pure water as a solvent were measured with the use of the pH meter SI Analytics HandyLab 100 (Xylem Water Solutions, Washington, WA, USA). The analysis was performed in triplicate at the room temperature.

#### 2.3. Bacteria Viability

To analyze cell viability, the PrestoBlue assay (Cat. No. A13261, Invitrogen, Waltham, MA, USA) was conducted. The bacterial cultures were adjusted to  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL in a distilled buffer saline; 90 µL of each suspension were added onto the 96-well plate, and 10 µL of ten concentrated nanomaterials (ZnO, 100 µg/mL; Cu, 25 µg/mL; GO, 10 µg/mL; and GN, 10 µg/mL, along with the following nanocomposites: GO, 10 µg/mL + ZnO, 100 µg/mL + Cu, 25 µg/mL; GN, 10 µg/mL + ZnO, 100 µg/mL + Cu, 25 µg/mL) were added into the appropriate wells and incubated for 24 h (37 °C). Thereafter, 10 µL of the PrestoBlue<sup>TM</sup> reagent was added, and after 10 min of incubation (37 °C), fluorescence was measured ( $\lambda_{ex} = 570$  nm,  $\lambda_{em} = 600$  nm) using a microplate reader (ELISA) (Infinite M200, Tecan, Durham, NC, USA). The assays were conducted for graphene and GO that was connected with zinc oxide and copper, separately, but the results from the three-component composites (the most effective for the most bacteria strains) were clearer and are thus, presented.

Cell viability was expressed as a percentage of control reduced by appropriate blank probes, where the control was the optical density of the wells with cells without nanomaterials and "blank" was the optical density of the wells with the medium without cells.

#### 2.4. The Plate Count Method

To determine the number of colony forming units (CFU) that were affected by nanoparticle suspension, the plate count method was performed. The bacterial cultures were adjusted to  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL in a distilled buffer saline and treated with nanoparticle suspensions (ZnO, 100 µg/mL; Cu, 25 µg/mL; GO, 10 µg/mL; GN, 10 µg/mL, along with the following nanocomposites: GO, 10 µg/mL + ZnO, 100 µg/mL + Cu, 25 µg/mL; GN, 10 µg/mL + ZnO, 100 µg/mL + Cu, 25 µg/mL). Samples were then incubated for 24 h under shaking conditions at 37 °C. Thereafter, a dilution of  $10^{-6}$  was made and spread onto the nutrient agar plates (Biomaxima, Lublin, Poland). Plates were incubated for 24 h at 37 °C. The colony forming units were counted and transformed to the logarithmic scale.

#### 2.5. Bacterial Cell Conductivity and Zeta Potential

The characterization of bacterial cell conductivity and zeta potential was assessed by ELS, with the use of the Zeta Sizer Nano-ZS90 analyzer (Malvern Instruments, Malvern, UK). The bacterial cultures  $(1.5 \times 10^8 \text{ cells/mL})$  were treated with nanoparticle suspensions (ZnO, 100 µg/mL; Cu, 25 µg/mL; GO, 10 µg/mL; GN, 10 µg/mL, along with the following nanocomposites: GO, 10 µg/mL + ZnO, 100 µg/mL + Cu, 25 µg/mL; GN, 10 µg/mL + ZnO, 100 µg/mL + Cu, 25 µg/mL; GN, 10 µg/mL + ZnO, 100 µg/mL + Cu, 25 µg/mL). Conductivity and zeta potential were measured at room temperature immediately after the addition of nanoparticles and after 24 h of incubation (37 °C). The results were presented as the difference between the values obtained in 24 h and 0 h (the beginning of the experiment), reduced by a blank probe (nanosuspension without cells).

#### 2.6. LDH Leakage

The membrane integrity was measured by the release of LDH using the Cytotoxicity Detection Kit (Cat. No. 11644793001, Sigma Aldrich, Hamburg, Germany); 90 µL of bacteria inocula  $(4.5 \times 10^8 \text{ cells/mL})$  were prepared in Mueller–Hinton broth (Biomaxima, Lublin, Poland) in a 96-well plate, and then 10 µL nanoparticle suspensions were added into each well to obtain the appropriate concentrations (ZnO, 100  $\mu$ g/mL; Cu, 25  $\mu$ g/mL; GO,  $10 \,\mu\text{g/mL}$ ; GN 10  $\mu\text{g/mL}$ , along with the following nanocomposites: GO,  $10 \,\mu\text{g/mL}$  + ZnO,  $100 \,\mu\text{g/mL} + \text{Cu}$ ,  $25 \,\mu\text{g/mL}$ ; GN  $10 \,\mu\text{g/mL} + \text{ZnO}$   $100 \,\mu\text{g/mL} + \text{Cu}$   $25 \,\mu\text{g/mL}$ ). The bacteria suspensions without nanoparticles were used as the control, and the nanoparticles without bacteria suspensions were the blank probes. After replenishing each well, the microplate was centrifuged at 3000 rpm for 5 min. One hundred microliters of the supernatant were transferred to 96-well plates, and 100  $\mu$ L of the LDH assay mixture were added to each well. The plate was incubated for 30 min at room temperature. The optical density of each well was recorded at 450 nm on an ELISA reader (Infinite M200, Tecan, Männedorf, Switzerland). LDH leakage was expressed as the percentage between the optical densities of the samples tested and of the control probes, both reduced by the optical density of the blank probes for appropriate samples.

#### 2.7. ATP Concentration

ATP concentration was measured using the ATP Assay Kit (Cat. No. MAK190, Sigma Aldrich, Hamburg, Germany). The bacteria inocula ( $4.5 \times 10^8$  cells/mL) were treated with the appropriate nanosuspension concentrations for 24 h (37 °C), and the samples were placed in a 96-well plate with a volume of 50 µL; 50 µL of the reaction mix was added into the appropriate wells. The standard curve and preparation of the samples were conducted according to the manufacturer's instructions. The fluorescence ( $\lambda_{ex} = 535/\lambda_{em} = 587$  nm) was measured after 30 min of incubation of the 96-well plate that was protected from the light in a microplate reader (Infinite M200, Tecan, Männedorf, Switzerland).

#### 2.8. Intracellular pH

To examine the intracellular pH of the cells, the Fluorometric Intracellular pH Assay Kit (cat. no. MAK150, Sigma Aldrich, Hamburg, Germany), using BCFL-AM, was used.

The bacteria were centrifuged for 5 min at  $5000 \times g$ , the pellet was suspended in PBS (McFarland scale, 0.5), and 100 µL of the dye-loading solution was added into each well. The cells were incubated, while they were protected from the light, for 30 min at 37 °C, followed by incubation at room temperature for an additional 30 min. The compounds that were tested (nanoparticles and nanocomposites) were added into each appropriate well with a volume of 50 µL. The fluorescence ( $\lambda_{ex} = 490/\lambda_{em} = 535$  nm) was measured after 3 min from the addition of compounds using a microplate reader (Infinite M200, Tecan, Männedorf, Switzerland).

#### 2.9. Cytokine Antibody Array

The cytokine expression profiles in HFFF-2 (ATCC, Manassas, VA, USA) were detected using Human Cytokine Antibody Array Membrane (Cat. No. ab133997, Abcam, Cambridge, UK) for 42 targets. HFFF-2 was maintained in Dulbecco's modified Eagle's culture medium, containing 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Houston, TX, USA), with 1% penicillin and streptomycin (Life Technologies) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air in the NuAire DH AutoFlow CO<sub>2</sub> Air-Jacketed Incubator (Plymouth, MN, USA). When the cells reached 80% confluence, the medium was removed, and the nanosuspensions were added into the cell cultures and incubated for 24 h. Thereafter, the cells were trypsinized and harvested. The protein extracts were prepared using TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Germany) by centrifugation at  $13,000 \times g$  for 10 min at 4 °C, with a pre-frosted adapter at 50 Hz for 10 min. The concentration of protein extracts was determined using the BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Three samples from each group were diluted to a final concentration of 5  $\mu g/\mu L$ . The procedure was performed according to the manufacturer's instructions. The immunoblot pictures were captured using Azure Biosystem C200 (Dublin, CA, USA) and analyzed with the Protein-Array Analyzer plugin of the ImageJ software (version 1.50e, National Institutes of Health, USA).

#### 2.10. Statistical Analysis

All the data are represented as mean values with standard deviation. One-way analysis of variance with the post-hoc Tukey test (HSD) was performed using the GraphPad Prism 9 software (version 9.2.0, San Diego, CA, USA). The statistically significant differences were considered at *p*-value  $\leq 0.05$ .

#### 3. Results

#### 3.1. Physicochemical Analysis of Nanoparticles

The nanoparticles that were tested were able to create agglomerates, which is evident, given the values of the zeta potential (Figure 1 and Table 1) and the TEM analysis (Figure 2). Interestingly, ZnO and GNZnOCu had positive zeta values (2.32 mV and 10.56 mV, respectively) in comparison to the other samples, which all had negative values. The highest values were observed in the GO (-27.53 mV) and GN (-27.40 mV) samples, and they were also the most stable samples, reaching zeta values closest to the limit value of  $\pm 30$  mV.

The mean hydrodynamic diameter indicates that all the samples exceeded the nanometer scale. However, as shown in the TEM analysis, the large agglomerates contain much smaller nanoparticles, which is due to their instability when they are clumped together. It is also shown in the mean average that was gained by DLS (Figure 1), that GN, GO, and GNZnOCu had two fractions of particles in which one was much bigger than the other one. Furthermore, GN and GO were in the form of flakes; thus, their hydrodynamic diameters were bigger than those of the metal nanoparticles. The same phenomenon was observed in the case of nanocomposites, where GN and GO constituted the platform for other nanoparticles.



**Figure 1.** Physicochemical analysis (mean average and zeta potential, respectively) of nanoparticles: (**A**) GN; (**B**) GO; (**C**) ZnO; (**D**) Cu; (**E**) GNZnOCu; (**F**) GOZnOCu. The mean average was measured by DLS, and the zeta potential was measured by ELS. Three different colors mean repetitions.

verage (nm) Zeta Potential (mV)
$4.33 \pm 691.22 -27.40 \pm 2.67$
$4.90 \pm 23.39 \qquad -27.53 \pm 0.70$
$5.33 \pm 148.74$ $2.32 \pm 0.83$
$1.87 \pm 47.18 - 19.03 \pm 0.51$
$7.00 \pm 521.67 \qquad \qquad 10.56 \pm 1.34$
$3.33 \pm 472.84 -20.47 \pm 1.42$

Table 1. Mean diameter (nm) and zeta potential (mV) of nanoparticles aggregates and nanocomposites tested.



Figure 2. Visualization of nanomaterials by TEM: (A) GN; (B) GO; (C) ZnO; (D) Cu; (E) GNZnOCu; (F) GOZnOCu.

The pH of the nanomaterials tested were: 6.51 ( $\pm$ 0.12) (water), 6.55 ( $\pm$ 0.07) (GN), 6.49 ( $\pm$ 0.1) (GO), 6.76 ( $\pm$ 0.06) (ZnO), 6.59 ( $\pm$ 0.03) (Cu), 6.63 ( $\pm$ 0.05) (GNZnOCu), and 6.50 ( $\pm$ 0.05) (GOZnOCu).

The FT-IR spectra of GN, GO, and ZnO as well as their composites are shown in Figure 3. The broad peak observed between 3000 and 3650 cm<sup>-1</sup> is assigned mainly to the water and hydroxyl groups (O-H). The smaller features from 2850 to about 3000 cm<sup>-1</sup> can be attributed to the C–H stretch and C–H bending around 1310 cm<sup>-1</sup>. The peak around 1615 cm<sup>-1</sup> can be assigned to aromatic (sp<sup>2</sup> vibrational) C=C bonds that are present in graphitic carbon. Another peak was observed around 1500 cm<sup>-1</sup> on the FT-IR spectrum revealed C=O bonds. An absorption band at 1385 cm<sup>-1</sup> was present because of aliphatic C–C bonds (sp<sup>3</sup> C–H bend). The overlapping peaks, which form an absorption band in the 1300–950 cm<sup>-1</sup> region, can be attributed to C–O moieties existing in a different structural environment [27,28].



**Figure 3.** FT-IR spectra of nanomaterials: (**A**) GNZnOCu nanocomposite and its components; (**B**) GOZnOCu and its components.

#### 3.2. Bacteria Viability

In all the bacterial species, one of the types of the nanocomposites were the most toxic compounds, and bare GN was less toxic than these (Figure 4). GNZnOCu was the most toxic compound for *L. monocytogenes* and *S. aureus*, while GOZnOCu was the most toxic compound for *E. cloacae* and *S. enterica*. GO caused a viability of approximately 80% (ZnO caused slightly less). Cu were harmful compounds to a similar extent to nanocomposites (more harmful for *E. cloacae* than GNZnOCu, and for *L. monocytogenes* than GOZnOCu). In Gram-negative species, GOZnOCu was more toxic than GNZnOCu, which was contrary to Gram-positive species, where the latter caused a higher decrease in viability.



# **Figure 4.** Viability of bacteria after treatment with nanoparticles. C is the control sample, and the results are mean values $\pm$ standard deviation. "\*" symbols indicate statistically significant differences in comparison to the control.

#### 3.3. The Plate Count Method

One of the types of nanocomposites were the most limiting factor of all the probes (Figure 5); these were: GOZnOCu for *E. cloacae* and *S. enterica*, and GNZnOCu for *L. monocytogenes* and both for *S. aureus*. Metal nanoparticles were effective toward most bacteria species, especially for *L. monocytogenes* (in a similar extent as GNZnOCu). GN and



GO did not limited colony formation, however a slight decrease was observed in the GO probe for *S. aureus* and GN for *L. monocytogenes*.

**Figure 5.** Mean CFU/mL (log) for bacteria after treatment with nanoparticles. C is the control sample, and the results are mean values  $\pm$  standard deviation. "\*" symbols indicate statistically significant differences in comparison to the control.

#### 3.4. Bacterial Cells' Conductivity and Zeta Potential

The zeta potential values of Gram-positive bacteria were positive in contrast to those of Gram-negative bacteria, which were less than zero (Figure 6). The factor that was most different from the control in the case of *L. monocytogenes* and *S. aureus* was GNZnOCu, while for *E. cloacae* and *S. enterica*, these were GO and GOZnOCu. The values for GOZnOCu in the Gram-positive bacteria decreased, but in the Gram-negative bacteria, they increased. GNZnOCu and ZnO, in control, exhibited a positive zeta potential.



**Figure 6.** Conductivity [mS/cm] and zeta potential [mV] of bacteria species after treatment with nanomaterials. Control values are nanosuspensions without bacteria cells. C signifies the control samples, and the results are mean values  $\pm$  standard deviation. "\*" symbols indicate statistically significant differences in comparison to the control. The results are the difference between 0 h and 24 h of incubation with appropriate nanomaterials.

#### 3.5. LDH Leakage

The largest amount of LDH release was observed in one of the types of nanocomposite probes, among all the bacteria that was tested (Figure 7). For *E. cloacae* and *S. aureus*, the most toxic factor was GOZnOCu, as well as for *S. enterica*, but in a similar extent as GO. GNZnOCu was the most reactive for *L. monocytogenes*. Cu was more reactive than GNZnOCu for *E. cloacae* and it was also more reactive than GOZnOCu for *L. monocytogenes*. GN and GO caused slightly higher values of LDH release in comparison to the negative control. A higher LDH release was observed in the Gram-positive species, in which, after treatment with nanocomposites, these values were closer to the positive control, which indicates the maximum amount of LDH leakage.



**Figure 7.** Bacteria LDH release after treatment with nanomaterials. PC signifies the positive control samples, while NC signifies the negative control samples, and the results are mean values  $\pm$  standard deviation. "\*" symbols indicate statistically significant differences in comparison to the control.

#### 3.6. ATP Concentration

In all the bacteria species, the nanocomposites caused the smallest ATP concentration among all the samples, and the highest concentration in the GN and GO probes (Figure 8). ZnO also caused decreases in the ATP concentration in all the species; however, a significant

decrease in the case of Cu was observed only in the Gram-positive species. Based on the results obtained, the metal nanoparticles led to a greater reduction of ATP than the graphene-based nanoparticles did. Additionally, GOZnOCu was the most limiting factor, with a stronger effect than GNZnOCu.





#### 3.7. Intracellular pH

The intracellular pH assay measured decreases in the cells treated with various substances (Figure 9). Interestingly, the decrease in fluorescence was observed in all the bacteria species (except *E. cloacae*) that were treated with GOZnOCu. This decrease was also observed in the Gram-positive species (*L. monocytogenes* and *S. aureus*) in probes with GN and GO, which does not occur in the case of the Gram-negative species.



**Figure 9.** Intracellular pH in bacteria species after treatment with nanomaterials. C signifies the control samples, and the results are mean values  $\pm$  standard deviation. "\*" symbols indicate statistically significant differences in comparison to the control.

#### 3.8. Cytokine Antibody Array

A slight increase in the protein expression was observed for TNF- $\beta$ , growth-related oncogene (GRO), and thymus and activation-regulated chemokine (TARC) for HFFF-2 cells that were treated with GNZnOCu (Figure 10). The increase in the level of GRO was observed for GNZnOCu. The increase in TARC was observed for Cu and GNZNoCu. TNF- $\beta$  was observed, to a small extent, in GOZnOCu, and at a higher level for the Cu and GNZnOCu samples.



**Figure 10.** Analysis of the expression of cytokine proteins of the HFFF-2 cells after being treated with the following: (**A**) control; (**B**) GN; (**C**) GO; (**D**) ZnO; (**E**) Cu; (**F**) GNZnOCu; (**G**) GOZnOCu.

#### 4. Discussion

The obtained results indicate that it is possible to create three-compound nanocomposites that exhibit great antibacterial properties. However, given the many aspects influencing the behavior of nanocomposites, it is especially important to investigate them in depth.

The shape of the nanoparticles was similar to those in other studies, where graphene sheets and GO composed thin flat flakes [29]. Because of their shape, they appeared to be large when analyzed by DLS which is based on light scattering, and which is calculated using the Stokes–Einstein equation, and one of its elements is the hydrodynamic diameter of an equivalent spherical particle [30]. For the same reason, the nanocomposites appeared large. However, the metal nanoparticles, Cu and ZnO, had the diameters of aggregates that were 682 and 2155 nm, respectively, but both types were unstable, which was visible in the zeta potential measurements (Cu =  $-19.03 \pm 0.51$  mV; ZnO =  $2.32 \pm 0.83$  mV). None of the values that were obtained exceeded  $\pm 30$  mV, which would provide them with a strongly cationic or anionic character [31]. Therefore, they are large as a result of us creating agglomerates by them. This, in turn, influences the biological effect that the nanoparticles will have [32]. The analysis of the zeta potential in a different pH indicated (Figure S1) that the zeta potential became more negative as the pH increased. In our results, the nanosuspensions had pH values of around 6.5. Due to that aspect, they may be able to agglomerate, especially as bacterial culture additionally acidifies the environment [33], so in the tests that were performed, nanoparticles may have had the tendency to agglomerate. In addition, the agglomeration of the nanoparticles was clearly visualized in the TEM analysis (Figure 2). As mentioned before, the creation of aggregates/agglomerates influences the biological effect that is induced by the nanoparticles. It should be remembered that research on the influence of pH on nanoparticle stability and agglomeration state reflects the situation in an aqueous solution. There will be different situations in both in vitro and in vivo studies, in which the conditions will be additionally changed due to the presence of proteins, lipids, and other biomaterials that may adhere to the nanoparticle surface and change its properties, chemistry, and agglomeration state, and this will have a serious impact on the toxicology aspects [34]. Cu aggregation may be the result of rapid oxidization under the conditions of exposure to the atmosphere [35]. Given the preparation of the nanoparticles, which were in normal conditions (with room temperature and had access to oxygen), Cu, despite having a fairly negative zeta potential, may create agglomerates/aggregates exceeding 600 nm. ZnO in the TEM analysis showed aggregates with single nanoparticles that exhibited different shapes and sizes. Similar results for the visualization of ZnO were obtained by Mendes et al. [36]. In general, ZnO has a positive surface charge, which is compatible with our results, so it can be easily connected with negatively charged structures [37]. The FT-IR analysis showed that the bonds presented in the components, alone, are compatible with those found in the composites (Figure 3). Given the presence of C=O groups in the nanomaterials, the bond between the nanocomposites and the bacterial cell surface (amines of peptidoglycan and amino acids) can have a strong character [38].

Bacteria exposure to antimicrobials results in two basic mechanisms: bacterial injury or agent adhesion to the bacterial surface, and both of these mechanisms occur simultaneously [39]. In our results, the latter occurred. GO and GN, which were both in the form of flakes, were not highly effective antibacterial factors, which was visible from the PrestoBlue assay. These nanomaterials, applied in the concentration of 10  $\mu$ g/mL, limited the viability to a small extent. PrestoBlue is a good indicator for bacterial growth and viability, despite the fact that some of the light sensitivity and test time is dependent on the bacterial metabolism [40]. Nevertheless, there are some reports, described previously, that state that carbon nanoparticles can cause the re-oxidation of resorufin (pink) to resazurin (blue) or hyper-reduction of resorufin (pink) to hydroresorufin (colorless), which affects the intensity of the color obtained in the test [41]. GN and GO, given their physicochemical analysis (Figures 1 and 2), were multilayered, and so their weak antibacterial action is caused by their form because single flakes have a stronger antibacterial effect [42]. All the samples—even GN and GO, which were slightly toxic for bacteria—exceeded the LDH

leakage levels in relation to the negative control; however, this exceedance was not high in all the species. Remarkably, the conductivity of bacteria cells that were treated with GN and GO increased in all the cases, relative to the control. In contrast, the ATP assay indicated that these nanomaterials did not cause the limitation of the ATP content, but the internal pH was altered. Interestingly, these types of nanomaterials have the most negative zeta values in the physicochemical analysis, while in the analysis of bacterial zeta potential, the samples that were treated with them had values of greater than 0. An increase in the values of the zeta potential indicates strong binding between the cell surface and the dispersing solution [43]. The pH value, which is one of factors that influences the zeta potential, in the case of the nanomaterials in the medium was around 7.3, and this did not change over time (Table S1). However, bacteria, during the growth process, acidify the environment [33], which may level out the zeta potential values (Figure S1). Given the abovementioned facts, GO and GN may adhere to the bacterial surface and wrap around it, separating them from the surrounding medium and the nutrient, which is one of the already known graphene material antibacterial mechanisms [44], but this does not disrupting the cells mechanically, so cell death has not happened to that extent. An increase in the GN and GO samples was therefore observed in the colony forming units (Figure 5), because the bacteria cells were wrapped by the graphene-material sheets and during the spread plate method, the bacteria adhered with their surface to the surface of the agar plates, and these could grow easily if they were not disturbed mechanically. The mechanism wherein GO sheets wrap around the bacteria cells was shown in our previous study (Lange et al., 2022), where bacteria were directly on the surface of the GO flakes [45]. In the other tests that were presented, where the bacteria were grown in a liquid media, the flakes may have isolated them from the surrounding medium and thereby, affected their metabolism, causing effects such as a disturbance of conductivity.

A different pattern is observed with the metal nanoparticles, which may exhibit many mechanisms, including membrane disruption, ATP depletion, and ion release [46]. The metal-based nanoparticles interfere with the cell surface as this is the first interaction point, which generates the disruption of the cell membrane potential and integrity because of the process of electrostatic binding. By breaking the cell membrane, a large amount of cytosol is released, and the bacteria try to prevent this through proton efflux pumps and electron transport [47]. Considering the results obtained, Cu and ZnO decrease the bacterial viability (Figure 4), contributing to LDH leakage and a substantially reduced ATP. Metal nanoparticles influence the surface charge of the bacteria and affect their membranes (Figure 7), especially after the ZnO treatment. Also, for the ATP analysis, ZnO was the one that limited the ATP concentration in all bacteria species (Figure 8). A high concentration of ATP supports the bacteria division processes [48], thus, metal nanoparticles may be inhibited by the ability of bacteria to multiply, which resulted in the colony formation disturbances, to a small extent (Figure 5). The reduction of about 3 log CFU/mL after the exposure to Cu and ZnO was observed only for L. monocytogenes. A reduced number of L. monocytogenes by 1 log CFU/mL was reported in the study by Skowron et al., when they were treated with copper and silver nanoparticles, thus causing a reduction of 90% [49]. Cu, as a nanocolloid, had the value of the zeta potential equal to -19.03 mV, but the bacterial cells after treatment with those nanoparticles reached less negative values, which also surpassed the control values in three strains: E. cloacae, L. monocytogenes, and S. enterica. Only *S. aureus* had more negative values than its control. This suggests that despite the limited viability, bacteria may multiply, increasing the negative charge that they exhibit on the surface, especially since the LDH assay clearly showed that Cu was the least toxic compound and the cell contents did not leak, which could contribute to an increase in the zeta potential value. Analyzing ZnO, which had positive zeta potential (2.32 mV), in Gramnegative species, the values were more neutral (closer to 0) after the exposure of positively charged nanoparticles. Similar results were obtained by Halbus et al., where the reduction of the negative zeta potential value was observed after the binding with positively charged nanoparticles [50]. However, the antibacterial activity of ZnO is inversely proportional to

its size [51]. In our study, ZnO was large (hydrodynamic diameter of 2155.33 nm), with a tendency to agglomerate, so its mode of action might be limited. In the viability test, ZnO was slightly toxic to bacteria cells, which was similar to the LDH assay, but the ATP content was considerably reduced. This may be the cause for the surface charge because opposite charges bind to each other more easily, and ZnO had a positive charge (2.3 mV), whereas both the Gram-positive and Gram-negative bacteria exhibited negative charges on the surface because of the presence of lipopolysaccharides in the Gram-negative bacteria and teichoic acids in the Gram-positive bacteria [52].

The situation is different at the stage of nanocomposite usage. Their mechanism of action is multilevel. As previously shown, nanocomposites have a stronger antibacterial effect than their components do, alone [45,53]. An addition of already known nanoparticles with antibacterial properties to other carriers provides support for the nanoparticles and enhances the antimicrobial activity, thereby making wider use for them in biomedical fields a possibility [54]. As shown in a TEM analysis, GN and GO provide platforms for metal nanoparticles due to their flake's form. Nanocomposites may disrupt the cellular outer membrane and wall, but they may cause different disturbances in cell metabolism and life processes, and such a phenomenon was observed in our study. First, nanocomposites cause the biggest limitation to viability as well as LDH release and ATP reduction. Considering that fact, the bacterial cells formed fewer colonies after the treatment with nanocomposites (Figure 5) than they did with the metal nanoparticles. Differences in viability (Figure 4) and CFU number (Figure 5) may be the result of a reaction between carbon nanoparticles (GN and GO) with resazurin [41], but the general trend that nanocomposites were the most toxic was upheld in both cases. The metal nanoparticles damaged the bacteria mechanically through direct contact, as GN and GO constitute a platform which separate them from environment. It is believed that GO may entrap bacteria cells, which inhibits their division ability [25]. The enhanced antibacterial activity of nanocomposites was observed by Fontecha-Umaña et al., where they noted that the effect was more than 2 log CFU/mL because of the stabilization and slower release of metal ions [55]. The phenomenon of ion release affecting the cells may also have existed in our research, especially as the plate count method did not show the mechanism of the cellular effect, and it may pose a challenge when there are viable but not culturable cells, which have intact membranes and genetic material, but have different metabolic functions from viable culturable cells [56]. For this reason, we also analyzed other aspects of bacterial cell function in order to illustrate the possible action of the complex structures such as three-compound nanocomposites. LDH leakage, which may occur while the external layer is interrupted, was visible after the nanocomposites' treatment, to the largest extent (Figure 6). The limitation of CFU in the nanocomposite probes may be the results of membrane disturbances (Figure 7) and a reduction of ATP content (Figure 8), which resulted in the decreased ability to perform cell division and thus, resulted in a lower number of colonies being formed. However, their bacteria zeta potential is not consistent (same as the conductivity), which may be because the nanocomposites consisted of many compounds, among which each one has its own physicochemical properties. One study suggested that the GO-metal substrate changed the electron transfer process by absorbing electrons from the bacteria respiratory pathways and modifying the oxygen-containing functional groups on the GO surfaces [57]. Such a prediction may be true as the nanocomposites have significantly altered the conductivity of the bacteria, which may suggest the occurrence of the abovementioned phenomenon. Furthermore, a nonconductive substrate such as the GO/Glass system had no antibacterial activity [58], which suggests that metal nanoparticles, in addition to the graphene-based nanomaterials, changed their ability to disrupt the conductivity and surface potential.

Apart from the materials, the structure of the bacteria is extremely important because their main interaction point with any antibacterial agent is the external surface [4]. Various structures occur on the bacterial surface, which differ depending on the cell wall (Grampositive and Gram-negative). Teichoic acid (Gram-positive) or lipopolysaccharides and phospholipids (Gram-negative) are associated with both basic and acid functional groups.
Such connections determine the bacteria's electrostatic behavior, especially in regard to its interaction with various agents [59]. Plasma membranes are multifunctional in both Gram-positive and Gram-negative bacteria; they constitute the site of active transport and respiratory chain components as well as the energy-transducing systems and the H+-ATPase of the proton pump [60]. Therefore, in our study, if the integrity of the membrane was disrupted, the ATP content, conductivity, and zeta potential of the bacterial cells would also be altered, along with the intracellular pH, since all these functionalities depend on the proper functioning of the membrane.

In this research, the Gram-positive species demonstrated a lower susceptibility than the Gram-negative species did, based on the viability and integrity assays (Figures 4 and 7). However, the results that were obtained did not exhibit an unambiguous tendency as some species are more resistant than others. The cell wall structure of the Gram-positive bacteria is difficult to penetrate because of its thickness, and nanoparticles act only on the bacteria surface through electrostatic binding. This causes membrane depolarization and changes the potential, which results in the loss of integrity that finally leads to the interruption of energy transduction and cell death [61]. In this study, the bacteria had changed the electrostatic potential, which was differentiated by the group (Figure 6). The zeta potential values, in terms of bacterial function and metabolism, are strain dependent. However, this parameter may be used in accessing the interaction between the bacteria and the antibacterial agent, the dysfunction of the cell membrane, and ultimately in bacterial viability [39]. The zeta potential and conductivity results may be understood in two ways. Highly negative values of zeta potential may indicate that the bacteria will multiply, thus, increasing its negative charge. However, in live cells, ion homeostasis is maintained because of the functional transport systems (such as efflux pumps). In dead cells, this system is inactive; thus, ions may leak from cells that are remaining on their surface and change their charge to negative [43]. Additionally, the electrical conductivity may be changed by the metabolic processes during microbial growth, given the presence of the ions that are generated throughout those processes [62]. This suggests that the obtained results are not unambiguous, making the viability analysis (Figure 4) and ATP analysis (Figure 8) worth considering. However, when some structures get inside, bacteria may overcome the risk from antimicrobial agents such as nanoparticles by the energy-dependent active efflux of toxic ions [61]. This means that effective structures can have a weaker effect once the bacteria are able to "pump out" the threatening compounds. Such a phenomenon may be present in the case of S. aureus that was treated with GOZnOCu, which had the lowest zeta potential value in comparison to the control (Figure 6), but in other tests, the composite was the most toxic agent. This theory confirms the results of the pH assay, in which the decrease in fluorescence intensity was the lowest, but the intracellular pH was also influenced by the movement of the efflux pumps, which depends on the ATP. When the cytoplasmatic pH varies, it contributes to power or inhibit the protonmotive force (PMF), which is the electrochemical or chemiosmotic gradient of protons, determined by active proton pumping and secondary ion movements [63]. BCECF/AM may also be used to label clinical isolates to check the uptake [64]. Nonfluorescent BCECF/AM esters are hydrolyzed to a fluorescent BCECF acid form by an intracellular esterase, after entering the cell [65,66]. The fluorescence intensity of the intracellular BCECF may provide information about the intracellular pH [67], as the acid form of the dye is maintained inside the cell. However, acquiring such measurements may be complicated in the case of bacteria because some bacteria may excrete BCECF from their cells as a result of the ATP-driven efflux pumps [67]. Therefore, the samples that did not have a depleted ATP content could successfully pump out the BCECF of the cells, therefore giving disrupting results. Such a phenomenon could be the case for *E. cloacae* and *L. monocytognes*, which had drastically depleted ATP levels when they were treated with nanocomposites, and an increase in fluorescence was observed. Under standard growth conditions, most bacteria have a higher internal pH than in the surrounding environment does. The resulting pH gradient can be used as a motor force for processes requiring the supply of energy, such as ATP synthesis [68]. Not surprisingly, in

our results, the differences in fluorescence in the measurement of intracellular pH appeared in the samples where the contents of ATP were disturbed. PMF that is generated across the cell membrane is based on the extrusion of protons by the electron transport chain. This is necessary for ATP synthesis in bacteria cells. PMF also constitutes the crucial element of bacterial survival, but in antimicrobial therapy, it has been largely omitted for concerns of toxicity, which could have similar effects on other cells [69].

One of the tested bacteria showed results with higher values than the other species in conductivity, zeta potential, and intracellular pH. Listeria monocytogenes is a Grampositive pathogen, but its structure is not typical for Gram-positive bacteria and it is similar to that of Gram-negative bacteria because of the presence of partially deacetylated Nacetyloglucosamine residues and the ability for it to encode a high number of surface proteins [70]. There are suspicions that *Listeria monocytogenes* is the only Gram-positive bacteria that contains authentic LPS [60]; however, other studies have disproved this idea [71]. Furthermore, this bacteria species is characterized by small cells, around 0.5–4  $\mu$ m in diameter and  $0.5-2 \mu m$  in length [72]. Given its ability to invade and live inside cells, Listeria possesses defense factors that allow it to modify its metabolism, enabling it to survive. This main mechanism is based on the action of alternative sigma transcription factors, which are activated during environmental stress, nutrient deficiency, or altered pH. The nanoparticles/nanocomposites that are introduced into the bacterial suspension affected all these environmental factors, so it is very likely that this bacterial species coped with them through the action of sigma transcription factors. However, these factors are present in Gram-positive species, and also in S. aureus, although in our study, this bacterium had greater wall and membrane damage, which was the main cause of bacterial death, so the transcription of these factors may not have occurred. Furthermore, it has been shown that *Listeria* manages pH homeostasis differently from the way other species do [73], which, in the case of this study, may explain the high values that were obtained.

To summarize, the probable mechanism of action of graphene-based nanocomposites that are decorated with ZnO and Cu is multidimensional (Figure 11). GN and GO, which serve as a platform for metal nanoparticles, wrap around the bacteria and separate them from the medium containing the nutrient. When the structures are close to the cells, at the same time, with the addition of metal nanoparticles, ions are generated. They cause the modification of the zeta surface potential, membrane interruption, and LDH leakage, which cause cell death. Membrane integrity alteration and separation from the medium cause changes in the bacterial metabolism, which subsequently causes disorders of surface charge and ATP content depletion because of the alteration of proton and electron flow.

Nanomaterials may constitute an alternative for traditional antibiotics, owing to more specific targeting and controllability. Clinical applications of nanoparticles, however, are not without their difficulties, which are related to the delivery method of the therapy [74]. Novel methods of applying nanoparticles, such as by solid-film laser transfer, are currently in use [75], although basic research regarding the properties of colloidal nanoparticles and their interaction with bacterial cells must be carried out in order to be able to introduce new therapeutic solutions. The toxicity of nanoparticles when they are used is a crucial element in further applications to animals and humans. Many aspects influence their interaction with cells and tissues, owing to the unique properties of nanoparticles. Its effect varies depending on type, dose, physicochemical property, and the type of cell line that is used. Given that there are several aspects that need to be considered, the specific impact is still not fully understood [76]. The possibility of toxicity toward human cells is present in Figure 10. The assay enabled the detection of 42 cytokines at the same time. Based on our results, only three types of cytokines have been identified: TNF- $\beta$ , GRO, and TARC. While toxicity was not significant, given the possibility of harmful effects, nanomaterials should be analyzed in depth.



**Figure 11.** Mechanism of action of nanocomposites, which act on outer layer interruption, wrapping bacteria cells, and ATP depletion, causing cell death.

TNF- $\beta$ , which is a tumor necrosis factor, is also known as lymphotoxin. It is involved in cell proliferation, differentiation, and apoptosis, and it is connected to the cell permeability membrane. It is toxic toward many cancer cells [77]. An increase in the level of TNF- $\beta$  was observed in the cases of CuNPs, GNZnOCu, and GOZnOCu treatment; however, in Cu and GNZnOCu, the increase was the highest of all the samples. TARC, also known as chemokine ligand 17 (CCL17), acts as a chemoattractant of T-helper-2 (Th2) cells. This chemokine is connected with some respiratory diseases, including bronchial asthma, allergic rhinitis, and eosinophilic pneumonia [78]. The increase in TARC expression was observed in the HFFF-2 cells that were exposed to Cu and GNZnOCu. GRO is a member of the chemokine family that plays a critical role in inflammatory reactions and wound-healing processes, but it is also related to tumorigenesis, angiogenesis, and metastasis [79]. GRO was observed in the cells after their treatment with Cu, only. The obtained results suggest that Cu, when incorporated into the composite, shows a less toxic effect toward the HFFF-2 cells and did not cause a rise in the cytokine levels.

#### 5. Conclusions

Each type of bacteria reacts differently and has its own defense factors against unfavorable environmental conditions; on the other hand, each type of nanoparticle has a unique effect. For this reason, we have demonstrated the actions of nanocomposites consisting of three components, which evidently exhibit a multifaceted effect, damaging bacterial cells through different mechanisms of action, which include the mechanical damage of the membrane, changes in conductivity and surface charge, ATP content reduction, and changes in the intracellular pH. Despite the nanocomposites' excellent antimicrobial properties, general toxicity must always be considered during their possible application, which often needs to be further investigated to ensure safety.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: https: //www.mdpi.com/article/10.3390/nano12173058/s1, Figure S1: Zeta potential of nanomaterials tested in different pH values; Table S1: pH values of nanomaterials tested in culture medium in two time points (0 h and 24 h).

**Author Contributions:** Conceptualization, A.L. and S.J.; methodology, A.L. and S.J.; software, K.D.; validation, M.W., E.S. and A.M.; formal analysis, A.L.; investigation, A.L., K.D., M.W., A.M., M.G. and S.J.; resources, E.S.; data curation, A.L.; writing—original draft preparation, A.L.; writing—review and editing, A.L. and S.J.; visualization, A.L. and K.D.; supervision, S.J.; project administration, E.S.; funding acquisition, M.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the National Center for Research and Development in Poland, grant number POIR.02.03.02-28-0045/20.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on reasonable request from the corresponding author.

Acknowledgments: The manuscript is part of the Ph.D. thesis of Agata Lange.

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

#### References

- 1. Prakasham, R.S.; Kumar, B.S. Bacterial Metabolism–Coupled Energetics. *Biomass Biofuels Biochem. Microb. Electrochem. Technol.* Sustain. Platf. Fuels Chem. Remediat. 2019, 227–260. [CrossRef]
- 2. Ward, B. Bacterial Energy Metabolism. Mol. Med. Microbiol. Second Ed. 2015, 1–3, 201–233. [CrossRef]
- 3. Peter Jurtshuk, J. Bacterial Metabolism. In *Medical. Microbiology*, 4th ed.; University of Texas Medical Branch at Galveston: Galveston, TX, USA, 1996.
- 4. Wilson, W.W.; Wade, M.M.; Holman, S.C.; Champlin, F.R. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *J. Microbiol. Methods* **2001**, *43*, 153–164. [CrossRef]
- Yadav, A.K.; Espaillat, A.; Cava, F. Bacterial strategies to preserve cell wall integrity against environmental threats. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 2064. [CrossRef]
- 6. 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]
- 7. Yougbare, S.; Chang, T.K.; Tan, S.H.; Kuo, J.C.; Hsu, P.H.; Su, C.Y.; Kuo, T.R. Antimicrobial Gold Nanoclusters: Recent Developments and Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2924. [CrossRef]
- 8. Garg, P.; Attri, P.; Sharma, R.; Chauhan, M.; Chaudhary, G.R. Advances and Perspective on Antimicrobial Nanomaterials for Biomedical Applications. *Front. Nanotechnol.* **2022**, *4*, 36. [CrossRef]
- 9. Gatoo, M.A.; Naseem, S.; Arfat, M.Y.; Mahmood Dar, A.; Qasim, K.; Zubair, S. Physicochemical properties of nanomaterials: Implication in associated toxic manifestations. *Biomed Res. Int.* **2014**, 2014. [CrossRef]
- 10. Baer, D.R. Surface Characterization of Nanoparticles: Critical needs and significant challenges. J. Surf. Anal. 2011, 17, 163. [CrossRef]
- Shin, S.W.; Song, I.H.; Um, S.H. Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity. *Nanomaterials* 2015, 5, 1351–1365. [CrossRef]
- 12. Khalil, I.; Rahmati, S.; Muhd Julkapli, N.; Yehye, W.A. Graphene metal nanocomposites—Recent progress in electrochemical biosensing applications. *J. Ind. Eng. Chem.* **2018**, *59*, 425–439. [CrossRef]

- Sánchez-López, E.; Gomes, D.; Esteruelas, G.; Bonilla, L.; Lopez-Machado, A.L.; Galindo, R.; Cano, A.; Espina, M.; Ettcheto, M.; Camins, A.; et al. Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials* 2020, 10, 292. [CrossRef] [PubMed]
- 14. Brandelli, A.; Ritter, A.C.; Veras, F.F. Antimicrobial activities of metal nanoparticles. *Met. Nanoparticles Pharma* **2017**, 337–363. [CrossRef]
- 15. Kumar, P.; Huo, P.; Zhang, R.; Liu, B. Antibacterial Properties of Graphene-Based Nanomaterials. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 737. [CrossRef]
- Rabin, N.; Zheng, Y.; Opoku-Temeng, C.; Du, Y.; Bonsu, E.; Sintim, H.O. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.* 2015, 7, 493–512. [CrossRef]
- 17. Saleh, N.B.; Chambers, B.; Aich, N.; Plazas-Tuttle, J.; Phung-Ngoc, H.N.; Kirisits, M.J. Mechanistic lessons learned from studies of planktonic bacteria with metallic nanomaterials: Implications for interactions between nanomaterials and biofilm bacteria. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 677. [CrossRef]
- Han, C.; Romero, N.; Fischer, S.; Dookran, J.; Berger, A.; Doiron, A.L. Recent developments in the use of nanoparticles for treatment of biofilms. *Nanotechnol. Rev.* 2017, 6, 383–404. [CrossRef]
- 19. Bintsis, T. Foodborne pathogens. AIMS Microbiol. 2017, 3, 529. [CrossRef]
- 20. Zorraquín-Peña, I.; Cueva, C.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M.V. Silver Nanoparticles against Foodborne Bacteria. Effects at Intestinal Level and Health Limitations. *Microorganisms* **2020**, *8*, 132. [CrossRef]
- Nyenje, M.E.; Odjadjare, C.E.; Tanih, N.F.; Green, E.; Ndip, R.N. Foodborne Pathogens Recovered from Ready-to-Eat Foods from Roadside Cafeterias and Retail Outlets in Alice, Eastern Cape Province, South Africa: Public Health Implications. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2012, *9*, 2608. [CrossRef]
- 22. Szunerits, S.; Boukherroub, R. Antibacterial activity of graphene-based materials. *Chemistry* **2016**, *4*, 6892–6912. [CrossRef] [PubMed]
- Li, M.; Chen, Z.; Sun, Y.; Wang, F.; Wu, C.; Xu, J.; Zhang, J. Preparation and antibacterial activity of graphene oxide/cuprous oxide/zinc oxide nanocomposite. *Mater. Res. Express* 2021, *8*, 125003. [CrossRef]
- Díez-Pascual, A.M. Antibacterial Action of Nanoparticle Loaded Nanocomposites Based on Graphene and Its Derivatives: A Mini-Review. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 3563. [CrossRef] [PubMed]
- 25. Fauzi, F.; Musawwa, M.M.; Hidayat, H.; Kusumaatmaja, A.; Dwandaru, W.S.B. Nanocomposites based on biocompatible polymers and graphene oxide for antibacterial coatings. *Polym. Polym. Compos.* **2021**, *29*, S1609–S1620. [CrossRef]
- 26. Pro-Lab Diagnostics Mcfarland Standards. Standard Operating Procedure; Pro-Lab Diagnostics: Richmond Hill, ON, Canada, 2012.
- 27. Thongam, D.D.; Gupta, J.; Sahu, N.K. Effect of induced defects on the properties of ZnO nanocrystals: Surfactant role and spectroscopic analysis. *SN Appl. Sci.* **2019**, *1*, 1–14. [CrossRef]
- Lesiak, B.; Trykowski, G.; Tóth, J.; Biniak, S.; Kövér, L.; Rangam, N.; Stobinski, L.; Malolepszy, A. Chemical and structural properties of reduced graphene oxide—dependence on the reducing agent. *J. Mater. Sci.* 2021, *56*, 3738–3754. [CrossRef]
- 29. Aziz, M.; Halim, F.S.A.; Jaafar, J. Preparation and characterization of graphene membrane electrode assembly. *J. Teknol.* **2014**, *69*, 11–14. [CrossRef]
- Stetefeld, J.; McKenna, S.A.; Patel, T.R. Dynamic light scattering: A practical guide and applications in biomedical sciences. Biophys. Rev. 2016, 8, 409. [CrossRef]
- 31. Clogston, J.D.; Patri, A.K. Zeta Potential Measurement. *Methods Mol. Biol.* 2011, 697, 63–70. [CrossRef]
- 32. Skoglund, S.; Hedberg, J.; Yunda, E.; Godymchuk, A.; Blomberg, E.; Odnevall Wallinder, I. Difficulties and flaws in performing accurate determinations of zeta potentials of metal nanoparticles in complex solutions—Four case studies. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0181735. [CrossRef]
- Sánchez-Clemente, R.; Igeño, M.I.; Población, A.G.; Guijo, M.I.; Merchán, F.; Blasco, R. Study of pH Changes in Media during Bacterial Growth of Several Environmental Strains. *Proceedings* 2018, 2, 1297. [CrossRef]
- Berg, J.M.; Romoser, A.; Banerjee, N.; Zebda, R.; Sayes, C.M. The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations. *Nanotoxicology* 2009, *3*, 276–283. [CrossRef]
- 35. Usman, M.S.; El Zowalaty, M.E.; Shameli, K.; Zainuddin, N.; Salama, M.; Ibrahim, N.A. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 4467. [CrossRef]
- Mendes, C.R.; Dilarri, G.; Forsan, C.F.; de Moraes Ruy Sapata, V.; Lopes, P.R.M.; de Moraes, P.B.; Montagnolli, R.N.; Ferreira, H.; Bidoia, E.D. Antibacterial action and target mechanisms of zinc oxide nanoparticles against bacterial pathogens. *Sci. Rep.* 2022, 12, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
- Długosz, O.; Szostak, K.; Staroń, A.; Pulit-Prociak, J.; Banach, M. Methods for Reducing the Toxicity of Metal and Metal Oxide NPs as Biomedicine. *Materials* 2020, 13, 279. [CrossRef] [PubMed]
- 38. Di Giulio, M.; Zappacosta, R.; Di Lodovico, S.; Di Campli, E.; Siani, G.; Fontana, A.; Cellini, L. Antimicrobial and Antibiofilm Efficacy of Graphene Oxide against Chronic Wound Microorganisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, 62. [CrossRef]
- Ferreyra Maillard, A.P.V.; Espeche, J.C.; Maturana, P.; Cutro, A.C.; Hollmann, A. Zeta potential beyond materials science: Applications to bacterial systems and to the development of novel antimicrobials. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2021, 1863, 183597. [CrossRef]
- Lall, N.; Henley-Smith, C.J.; De Canha, M.N.; Oosthuizen, C.B.; Berrington, D. Viability Reagent, PrestoBlue, in Comparison with Other Available Reagents, Utilized in Cytotoxicity and Antimicrobial Assays. *Int. J. Microbiol.* 2013, 2013. [CrossRef]

- Breznan, D.; Das, D.; MacKinnon-Roy, C.; Simard, B.; Kumarathasan, P.; Vincent, R. Non-specific interaction of carbon nanotubes with the resazurin assay reagent: Impact on in vitro assessment of nanoparticle cytotoxicity. *Toxicol. Vitr.* 2015, 29, 142–147. [CrossRef]
- 42. Linklater, D.P.; Baulin, V.A.; Juodkazis, S.; Ivanova, E.P. Mechano-bactericidal mechanism of graphene nanomaterials. Interface Focus 2018, 8. [CrossRef]
- Ayala-Torres, C.; Hernández, N.; Galeano, A.; Novoa-Aponte, L.; Soto, C.Y. Zeta potential as a measure of the surface charge of mycobacterial cells. *Ann. Microbiol.* 2014, 64, 1189–1195. [CrossRef]
- 44. Zhang, T.; Tremblay, P.L. Graphene: An Antibacterial Agent or a Promoter of Bacterial Proliferation? *iScience* 2020, 23, 101787. [CrossRef] [PubMed]
- Lange, A.; Sawosz, E.; Wierzbicki, M.; Kutwin, M.; Daniluk, K.; Strojny, B.; Ostrowska, A.; Wójcik, B.; Łojkowski, M.; Gołębiewski, M.; et al. Nanocomposites of Graphene Oxide—Silver Nanoparticles for Enhanced Antibacterial Activity: Mechanism of Action and Medical Textiles Coating. *Materials* 2022, 15, 3122. [CrossRef]
- Slavin, Y.N.; Asnis, J.; Häfeli, U.O.; Bach, H. Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. J. Nanobiotechnology 2017, 15, 1–20. [CrossRef]
- 47. Gold, K.; Slay, B.; Knackstedt, M.; Gaharwar, A.K. Antimicrobial Activity of Metal and Metal-Oxide Based Nanoparticles. *Adv. Ther.* **2018**, *1*, 1700033. [CrossRef]
- Vogel, S.J.; Tank, M.; Goodyear, N. Variation in detection limits between bacterial growth phases and precision of an ATP bioluminescence system. *Lett. Appl. Microbiol.* 2014, *58*, 370–375. [CrossRef]
- Skowron, K.; Grudlewska-Buda, K.; Wiktorczyk-Kapischke, N.; Wałecka-Zacharska, E.; Kraszewska, Z.; Bernaciak, Z.; Kotlarek, A.; Budzyńska, A.; Gospodarek-Komkowska, E. Effect of intimate hygiene fluids on the number of Listeria monocytogenes isolated from women. *Med. Res. J.* 2022, *7*, 24–31. [CrossRef]
- 50. Halbus, A.F.; Horozov, T.S.; Paunov, V.N. Controlling the Antimicrobial Action of Surface Modified Magnesium Hydroxide Nanoparticles. *Biomimetics* **2019**, *4*, 41. [CrossRef]
- Siddiqi, K.S.; Ur Rahman, A.; Tajuddin; Husen, A. Properties of Zinc Oxide Nanoparticles and Their Activity Against Microbes. Nanoscale Res. Lett. 2018, 13, 1–13. [CrossRef]
- 52. Ren, E.; Zhang, C.; Li, D.; Pang, X.; Liu, G. Leveraging metal oxide nanoparticles for bacteria tracing and eradicating. *View* 2020, *1*, 20200052. [CrossRef]
- Jaworski, S.; Wierzbicki, M.; Sawosz, E.; Jung, A.; Gielerak, G.; Biernat, J.; Jaremek, H.; Łojkowski, W.; Woźniak, B.; Wojnarowicz, J.; et al. Graphene Oxide-Based Nanocomposites Decorated with Silver Nanoparticles as an Antibacterial Agent. *Nanoscale Res. Lett.* 2018, 13, 116. [CrossRef] [PubMed]
- Matharu, R.K.; Ciric, L.; Edirisinghe, M. Nanocomposites: Suitable alternatives as antimicrobial agents. *Nanotechnology* 2018, 29, 282001. [CrossRef] [PubMed]
- Fontecha-Umaña, F.; Ríos-Castillo, A.G.; Ripolles-Avila, C.; Rodríguez-Jerez, J.J. Antimicrobial Activity and Prevention of Bacterial Biofilm Formation of Silver and Zinc Oxide Nanoparticle-Containing Polyester Surfaces at Various Concentrations for Use. *Foods* 2020, 9, 442. [CrossRef] [PubMed]
- 56. Bankier, C.; Cheong, Y.; Mahalingam, S.; Edirisinghe, M.; Ren, G.; Cloutman-Green, E.; Ciric, L. A comparison of methods to assess the antimicrobial activity of nanoparticle combinations on bacterial cells. *PLoS ONE* **2018**, *13*. [CrossRef] [PubMed]
- Panda, S.; Rout, T.K.; Prusty, A.D.; Ajayan, P.M.; Nayak, S. Electron Transfer Directed Antibacterial Properties of Graphene Oxide on Metals. *Adv. Mater.* 2018, 30. [CrossRef]
- 58. Radhi, A.; Mohamad, D.; Abdul Rahman, F.S.; Abdullah, A.M.; Hasan, H. Mechanism and factors influence of graphene-based nanomaterials antimicrobial activities and application in dentistry. *J. Mater. Res. Technol.* **2021**, *11*, 1290–1307. [CrossRef]
- 59. Halder, S.; Yadav, K.K.; Sarkar, R.; Mukherjee, S.; Saha, P.; Haldar, S.; Karmakar, S.; Sen, T. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: A study with cationic agents. *Springerplus* **2015**, *4*, 672. [CrossRef]
- 60. Salton, M.R.J.; Kim, K.-S. Structure. In *Medical Microbiology*, 4th ed.; University of Texas Medical Branch at Galveston: Galveston, TX, USA, 1996.
- 61. Hochvaldová, L.; Večeřová, R.; Kolář, M.; Prucek, R.; Kvítek, L.; Lapčík, L.; Panáček, A. Antibacterial nanomaterials: Upcoming hope to overcome antibiotic resistance crisis. *Nanotechnol. Rev.* **2022**, *11*, 1115–1142. [CrossRef]
- 62. Bancalari, E.; Bernini, V.; Bottari, B.; Neviani, E.; Gatti, M. Application of Impedance Microbiology for Evaluating Potential Acidifying Performances of Starter Lactic Acid Bacteria to Employ in Milk Transformation. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*. [CrossRef]
- 63. Slonczewski, J.L.; Fujisawa, M.; Dopson, M.; Krulwich, T.A. Cytoplasmic pH Measurement and Homeostasis in Bacteria and Archaea. *Adv. Microb. Physiol.* 2009, 55. [CrossRef]
- 64. Gaines, S.; James, T.C.; Folan, M.; Baird, A.W.; O'Farrelly, C. A novel spectrofluorometric microassay for Streptococcus mutans adherence to hydroxylapatite. *J. Microbiol. Methods* **2003**, *54*, 315–323. [CrossRef]
- 65. Dive, C.; Cox, H.; Watson, J.V.; Workman, P. Polar fluorescein derivatives as improved substrate probes for flow cytoenzymological assay of cellular esterases. *Mol. Cell. Probes* **1988**, 2, 131–145. [CrossRef]
- 66. Han, J.; Burgess, K. Fluorescent indicators for intracellular pH. Chem. Rev. 2010, 110, 2709–2728. [CrossRef]
- 67. Aono, R.; Ito, M.; Horikoshi, K. Measurement of cytoplasmic pH of the alkaliphile Bacillus lentus C-125 with a fluorescent pH probe. *Microbiology* **1997**, *143*, 2531–2536. [CrossRef] [PubMed]

- 68. Sadowska, J.; Grajek, W. Analiza stanu fizjologicznego pojedynczych komórek bakterii za pomoc barwienia fluorescencyjnego. Biotechnologia **2009**, *4*, 102–114.
- Farha, M.A.; Verschoor, C.P.; Bowdish, D.; Brown, E.D. Article Collapsing the Proton Motive Force to Identify Synergistic Combinations against Staphylococcus aureus. *Chem. Biol.* 2013, 20, 1168–1178. [CrossRef]
- Markowska, K.; Grudniak, A.M.; Milczarek, B.; Wolska, K.I. The Effect of Silver Nanoparticles on Listeria monocytogenes PCM2191 Peptidoglycan Metabolism and Cell Permeability. *Polish J. Microbiol.* 2018, 67, 315. [CrossRef]
- Wallecha, A.; Wood, L.; Pan, Z.K.; Maciag, P.C.; Shahabi, V.; Paterson, Y. Listeria monocytogenes-Derived Listeriolysin O Has Pathogen-Associated Molecular Pattern-Like Properties Independent of Its Hemolytic Ability. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013, 20, 77. [CrossRef]
- 72. Jamshidi, A.; Zeinali, T. Significance and Characteristics of Listeria monocytogenes in Poultry Products. *Int. J. Food Sci.* **2019**, 2019. [CrossRef]
- 73. Cheng, C.; Yang, Y.; Dong, Z.; Wang, X.; Fang, C.; Yang, M.; Sun, J.; Xiao, L.; Fang, W.; Song, H. Listeria monocytogenes varies among strains to maintain intracellular pH homeostasis under stresses by different acids as analyzed by a high-throughput microplate-based fluorometr. *Front. Microbiol.* 2015, *6*, 15. [CrossRef]
- 74. Mubeen, B.; Nayab Ansar, A.; Rasool, R.; Ullah, I.; Sarim Imam, S.; Ghoneim, M.M.; Alzarea, S.I.; Nadeem, M.S.; Kazmi, I. Nanotechnology as a Novel Approach in Combating Microbes Providing an Alternative to Antibiotics. *Antibiotics* 2021, 10, 1473. [CrossRef] [PubMed]
- Nastulyavichus, A.; Tolordava, E.; Rudenko, A.; Zazymkina, D.; Shakhov, P.; Busleev, N.; Romanova, Y.; Ionin, A.; Kudryashov, S. In Vitro Destruction of Pathogenic Bacterial Biofilms by Bactericidal Metallic Nanoparticles via Laser-Induced Forward Transfer. Nanomaterials 2020, 10, 2259. [CrossRef] [PubMed]
- 76. Ozdal, M.; Gurkok, S. Recent advances in nanoparticles as antibacterial agent. ADMET DMPK 2022, 10, 115. [CrossRef] [PubMed]
- 77. Joo, K.J. Role of Clusterin and Tumor Necrosis Factor Receptors on the Apoptosis of Prostate Cancer Cells. *Korean J. Androl.* 2011, 29, 43–52. [CrossRef]
- 78. Ness, T.L.; Hogaboam, C.M.; Kunkel, S.L. CHEMOKINES, CC | TARC (CCL17). Encycl. Respir. Med. Four-Volume Set 2006, 380–385. [CrossRef]
- 79. Wang, B.; Hendricks, D.T.; Wamunyokoli, F.; Parker, M.I. A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer. *Cancer Res.* 2006, *66*, 3071–3077. [CrossRef]





Supplementary Materials

# Bacterial Surface Disturbances Affecting Cell Function during Exposure to Three-Compound Nanocomposites Based on Graphene Materials

Agata Lange <sup>1,\*</sup>, Ewa Sawosz <sup>1</sup>, Karolina Daniluk <sup>1</sup>, Mateusz Wierzbicki <sup>1</sup>, Artur Małolepszy <sup>2</sup>, Marcin Gołębiewski <sup>3</sup> and Sławomir Jaworski <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, 02-786 Warsaw, Poland
- <sup>2</sup> Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, 00-654 Warsaw, Poland
  - <sup>2</sup> Department of Animal Breeding, Institute of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences, 02-786 Warsaw, Poland
  - \* Correspondence: agata\_lange@sggw.edu.pl (A.L.); slawomir\_jaworski@sggw.edu.pl (S.J.); Tel.: +48-225936675 (S.J.)

#### Analysis of zeta potential dependence on pH

Zeta potential was measured by electrophoretic light scattering (ELS) using the Zeta Sizer Nano-ZS90 analyzer (Malvern Instruments, Malvern, UK) at room temperature for all nanomaterials, preceded by sonication at 500 W and 20 kHz for 2 min, and in case of nanocomposites, they were left for 15 min for self-combination. Each nanosuspension was measured in 3 different pH values (4, 7 and 10).



**Figure S1.** Zeta potential of nanomaterials tested in different pH values. Each measurement was performed in triplicate.

#### pH analysis of nanoparticles in culture medium

The pH measurements of nanomaterials in Mueller–Hinton broth medium (Biomaxima, Lublin, Poland) were measured with the use of the pH meter SI Analytics HandyLab 100 (Xylem Water Solutions, Washington, WA, USA). Each measurement was conducted in two time points: immediately after added nanoparticles into medium (0h) and after 24 hours of incubation (24h). The analysis was performed in triplicate at the room temperature.

Citation: Lange, A.; Sawosz, E.; Daniluk, K.; Wierzbicki, M.; Małolepszy, A.; Gołębiewski, M.; Jaworski, S. Bacterial Surface Disturbances Affecting Cell Function during Exposure to Three-Compound Nanocomposites Based on Graphene Materials. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 3058. https://doi.org/10.3390/ nano12173058

Academic Editors: Maria Letizia Manca and Heyou Han

Received: 26 July 2022 Accepted: 30 August 2022 Published: 2 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 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/license s/by/4.0/).

Nanomaterials	0h	24h
С	$\textbf{7.29} \pm 0.11$	$\textbf{7.29} \pm 0.01$
GN	$7.28\pm0.02$	$7.28\pm0.01$
GO	$7.28\pm0.03$	$7.28\pm0.01$
ZnO	$7.33\pm0.02$	$7.36\pm0.01$
Cu	$7.29\pm0.02$	$7.30\pm0.01$
GNZnOCu	$7.32\pm0.02$	$7.31\pm0.01$
GOZnOCu	$7.31\pm0.02$	$7.31\pm0.01$

**Table S1.** pH values of nanomaterials tested in culture medium in two time points (0h and 24h). Results are presented as a mean values ± standard deviation. C is control medium without nanoparticles.

Warszawa, 18.09.2024r.

mgr inż. Agata Lange agata langel@sggw.edu.pl

> Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Agata Lange, Ewa Sawosz, Karolina Daniluk, Mateusz Wierzbicki, Artur Małolepszy, Marcin Gołębiewski, Sławomir Jaworski. 2022; Bacterial Surface Disturbances Affecting Cell Function during Exposure to Three-Compound Nanocomposites Based on Graphene Materials. *Nanomaterials* 12(17): 3058." mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: zaplanowaniu wykonywanych badań oraz opracowaniu metodyki i analizie formalnej uzyskanych wyników, wykonaniu analiz (analizy fizykochemiczne: pomiar potencjału zeta i średnicy hydrodynamicznej przygotowanic prób do analizy za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej; analizy biologiczne: analiza żywotności, liczby jednostek tworzących kolonie, integralności błony komórkowej, zawartości ATP, analiza ekspresji cytokin prozapalnych z użyciem membran antygenowych) oraz opracowaniu uzyskanych danych przedstawionych w manuskrypcie oraz suplemencie i ich wizualizacji, a także na przygotowaniu i redakcji manuskryptu.

Agate Lange

Podpis

prof. dr hab. Ewa Sawosz Chwalibóg ewa\_sawosz@sggw.edu.pl

> Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Agata Lange, Ewa Sawosz, Karolina Daniluk, Mateusz Wierzbicki, Artur Małolepszy, Marcin Gołębiewski, Sławomir Jaworski. 2022; Bacterial Surface Disturbances Affecting Cell Function during Exposure to Three-Compound Nanocomposites Based on Graphene Materials. *Nanomaterials* 12(17): 3058." mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: zarządzaniu projektem, zapewnieniu materiałów do prowadzonych badań oraz sprawdzaniu poprawności uzyskanych danych.

Podpis

Warszawa, 18.09.2024r.

dr hab. Mateusz Wierzbicki, prof. SGGW mateusz wierzbicki@sggw.edu.pl

> Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Agata Lange, Ewa Sawosz, Karolina Daniluk, Mateusz Wierzbicki, Artur Małolepszy, Marcin Gołębiewski, Sławomir Jaworski. 2022; Bacterial Surface Disturbances Affecting Cell Function during Exposure to Three-Compound Nanocomposites Based on Graphene Materials. Nanomaterials 12(17): 3058." mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: przeprowadzaniu analiz oraz sprawdzaniu poprawności uzyskanych danych.

Men Wahy. Podpis

Warszawa, 18.09.2024r.

dr hab. Marcin Gołębiewski, prof. SGGW marcin golebiewski@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Agata Lange, Ewa Sawosz, Karolina Daniluk, Mateusz Wierzbicki, Artur Małolepszy, Marcin Gołębiewski, Sławomir Jaworski. 2022; Bacterial Surface Disturbances Affecting Cell Function during Exposure to Three-Compound Nanocomposites Based on Graphene Materials. *Nanomaterials* 12(17): 3058." mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: przeprowadzaniu analiz oraz zapewnieniu finansowania przeprowadzonych analiz i procesu wydawniczego.

soll Podpis

dr hab. Sławomir Jaworski, prof. SGGW slawomir\_jaworski@sggw.edu.pl

> Rada Dyscypliny Nauki **Biologiczne**

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

#### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Agata Lange, Ewa Sawosz, Karolina Daniluk, Mateusz Wierzbicki, Artur Małolepszy, Marcin Gołębiewski, Sławomir Jaworski. 2022; Bacterial Surface Disturbances Affecting Cell Function during Exposure to Three-Compound Nanocomposites Based on Graphene Materials. Nanomaterials 12(17): 3058." mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: zaplanowaniu wykonywanych badań oraz opracowaniu metodyki, pomocy w wykonywaniu analiz, nadzorze przeprowadzonych analiz oraz redakcji manuskryptu.

Podpis Yoursel Fransmire

ORIGINAL RESEARCH

# Impaired Biofilm Development on Graphene Oxide-Metal Nanoparticle Composites

Agata Lange<sup>1</sup>, Marta Kutwin<sup>1</sup>, Katarzyna Zawadzka<sup>1</sup>, Agnieszka Ostrowska<sup>1</sup>, Barbara Strojny-Cieślak<sup>1</sup>, Barbara Nasiłowska<sup>2</sup>, Aneta Bombalska<sup>3</sup>, Sławomir Jaworski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Poland; <sup>2</sup>Center for Biomedical Engineering, Institute of Optoelectronics, Military University of Technology, Warsaw, Poland; <sup>3</sup>Department of Optoelectronic Technologies, Institute of Optoelectronics, Military University of Technology, Warsaw, Poland

Correspondence: Agata Lange, Department of Nanobiotechnology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, Ciszewskiego 8, Warsaw, 02-786, Poland, Tel +48 22 593 66 69, Email agata\_lange@sggw.edu.pl

**Purpose:** Biofilms are one of the main threats related to bacteria. Owing to their complex structure, in which bacteria are embedded in the extracellular matrix, they are extremely challenging to eradicate, especially since they can inhabit both biotic and abiotic surfaces. This study aimed to create an effective antibiofilm nanofilm based on graphene oxide-metal nanoparticles (GOM-NPs).

**Methods:** To create nanofilms, physicochemical analysis was performed, including zeta potential (Zp) (and the nanocomposites stability in time) and size distribution measurements, scanning transmission electron microscopy (STEM), energy dispersive X-ray analysis (EDX), and atomic force microscopy (AFM) of the nanofilm surfaces. During biological analysis, reactive oxygen species (ROS) and antioxidant capacity were measured in planktonic cells treated with the nanocomposites. Thereafter, biofilm formation was checked via crystal violet staining, biofilm thickness was assessed by confocal microscopy using double fluorescent staining, and biofilm structure was analyzed by scanning electron microscopy.

**Results:** The results showed that two of the three nanocomposites were effective in reducing biofilm formation (GOAg and GOZnO), although the nanofilms were characterized by the roughest surface, indicating that high surface roughness is unfavorable for biofilm formation by the tested bacterial species (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica* (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)).

**Conclusion:** The performed analysis indicated that graphene oxide may be a platform for metal nanoparticles that enhances their properties (eg colloidal stability, which is maintained over time). Nanocomposites based on graphene oxide with silver nanoparticles and other types of nanocomposites with zinc oxide were effective against biofilms, contributing to changes throughout the biofilm structure, causing a significant reduction in the thickness of the structure, and affecting cell distribution. A nanocomposite consisting of graphene oxide with copper nanoparticles inhibited the biofilm, but to a lesser extent.

Keywords: biofilm, graphene oxide, metal nanoparticles, nanocomposites, nanofilms

## Introduction

Bacterial cells living in liquid medium have enabled us to discover basic life functions, including metabolic aspects and genetic features connected with microorganisms. However, in nature, bacteria mostly exist in the form of complicated multicellular communities known as biofilms.<sup>1</sup> Biofilm-forming bacteria are embedded in self-produced extracellular polymeric substances (EPSs), which constitute a matrix for a specific cellular community.<sup>2</sup> EPS consists mostly of water due to highly hydrated biopolymers, which consequently allows water to be retained in the matrix.<sup>3</sup> Because of the formation of a spatial structure consisting of many components (polysaccharides, lipids, proteins, and extracellular DNA), EPS has a protective function against adverse environmental factors while at the same time creating a distinct habitat for bacteria anchored in the biofilm. However, bacteria embedded in a biofilm structure exhibit different properties than planktonic forms, especially when considering the lower parts of the structure, where cells exhibit lower metabolic activity, which increases to enhance resistance to both unfavorable environmental conditions and

by not incorporate the Creative Commons Attribution – Non Commercial (unported, v3.0) License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/). By accessing the work you hereby accept the Terms. Non-commercial uses of the work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of our Terms (https://www.dovepress.com/terms.php).

#### **Graphical Abstract**



antibiotics.<sup>4</sup> The National Institutes of Health (NIH) announced that more than 80% of bacterial diseases are caused by biofilms. Most bacteria may create a biofilm structure on both biotic and abiotic surfaces, including medical or indwelling devices as well as the urinary and respiratory tracts and skin. In this state, bacterial cells are not even fought by the immune system's cells.<sup>5</sup> Bacteria that form biofilms on the surface of medical devices often belong to species such as Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli, or Pseudomonas aeruginosa.<sup>6</sup> As the vast majority of bacteria species can create biofilms, biofilms are also frequently multispecies. Biofilms produced by S. aureus are the etiological agent of many recurrent infections. These include infection of the bone knowns as osteomyelitis, but also periodontitis and peri-implantitis, chronic wound infection, chronic rhinosinusitis, endocarditis, ocular infection and indwelling medical device infection. The latter includes biofilm formed on orthopedic implants including prosthetic joints, wires, pins, external fixators, plates, screws, nails and mini-large fragment implants, on which biofilm formed by S. aureus is a major problem and cause of failure of the mentioned implants.<sup>7</sup> P. aeruginosa is a well-known biofilm former, which makes it an excellent candidate model to examine biofilm formation. The biofilm formed by P. aeruginosa is found in the polymicrobial environment of cystic fibrosis in the lungs. Similar to the previous bacterium mentioned, P. aeruginosa colonizes various medical surfaces, including (urinary catheters, implants, contact lenses, as well as food industry equipment (mixing tanks, vats and tubing).<sup>8</sup> Nontyphoidal biofilms produced by Salmonella, which is an enteric pathogen, pose a particular threat in the food processing and packaging industry. Such biofilms have been shown to adhere to abiotic materials used in the industry, including stainless steel, polystyrene or glass. Despite disinfection practices in the food industry, biofilms are much more resistant than planktonic forms, rendering commonly used practices ineffective.9

Therefore, biofilms are responsible for most diseases, especially chronic antibiotic-resistant infections, implying that they cannot be cured with conventional antibiotics. The difficulty of combating biofilms is not only based on the multidimensionality of their structure but also on the several stages of development that biofilms exhibit. Therefore, it is recommended that agents with antibiofilm properties have more than one impact point, which may include inhibition of the quorum-sensing pathway, degradation of EPS, disruption of single bacterial cells, or decomposition and disorganization of biofilm structure.<sup>10</sup>

Bacteria in biofilms are 10–1000 times more resistant to antibiotics than are free-floating cells. Nevertheless, some strategies have been developed to help destroy biofilm structures and bacterial cells. These include, among others, photodynamic and photothermal therapies, antimicrobial peptides, nanoparticles (NPs) and plant extracts.<sup>11,12</sup> Due to the high reactivity of nanoparticles, they may interact with a biofilm's extracellular matrix (ECM), which contains multiple polymeric molecules with different charges. Most bacteria have a negatively charged ECM owing to the presence of chemical compounds, such as uronic acid and metal-bound pyruvate, which allows the creation of electrostatic forces with positively charged metal ions and organic compounds.<sup>13</sup> Antimicrobials may be transported within the biofilm structure. However, this was affected by the presence of sufficiently wide water channels that allowed the substance to reach the deeper layers. Unfortunately, due to the complex structure and continuous rearrangement of the structure, in the lower layers, there are often pores filled with water instead of the mentioned channels, resulting in dilution of the concentration of antimicrobial agents.<sup>14</sup> For this reason, not only an active strategy (which involves applying antimicrobial agents directly) is used but also a passive one, which involves the production of coatings disrupting the first step of biofilm formation, which is attachment and surface biofouling.<sup>15</sup> Coating implants and devices with agents exhibiting antibacterial/antibiofilm properties is a promising approach for infection prevention, and research is currently underway on strategies that could have an impact in this way.<sup>6</sup>

In general, nanoparticles' effect on biofilms may be two-folds: on the one hand, nanoparticles can prevent the formation of a biofilm structure before it emerges; on the other hand, they can destroy a well-formed biofilm structure.<sup>16</sup> Nanoparticles may be able to harm cells at several levels, indicating that they have non-specific effects. Metal nanoparticles may not only damage cell structures, such as walls and membranes, proteins, enzymes, DNA, and ribosomes, but also interfere with processes and pathways essential to the cell's proper functioning, as well as contribute to reactive oxygen species (ROS) production.<sup>17</sup> The main nanoparticles used as antibacterial agents are silver, gold, copper and zinc nanoparticles. Silver nanoparticles exhibit remarkable antibacterial properties, both against planktonic forms and the biofilm structure due to their penetration of the biofilm matrix. Gold nanoparticles are also characterized by their ability to destroy biofilm structure and impair bacterial metabolic activity, but their high price means they are usually not chosen as a first choice agent.<sup>18</sup> Copper nanoparticles, on the other hand, release toxic ions that bind to bacterial cell membranes and increase their permeability by entering the cell interior, where they bind to large molecules containing sulfhydryl and phosphate residues destroying protein and DNA structure. Copper nanoparticles can also be effective against multidrug-resistant microorganisms.<sup>19</sup> Zinc oxide nanoparticles show strong antibacterial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria also due to ion release but also generation of reactive oxygen species. However, a common problem with metal oxide nanoparticles is their oxidation under sunlight.<sup>18</sup>

The physicochemical properties of NPs are particularly crucial because of their potential toxicity. Nanoparticle agglomeration influences their uptake and distribution, and consequently impacts their toxicity,<sup>20</sup> often changing their intended properties. However, the unique properties of nanoparticles can be maintained and even enhanced by the synergistic effect they can display when combined with materials, such as graphene or graphene oxide. The benefits of combining the two materials are significantly advantageous compared to the use of single materials, thereby significantly increasing their application potential.<sup>21</sup> Graphene materials have a flake structure with a large specific surface area, making them suitable structures for decoration with metal nanoparticles.<sup>22</sup> What is more, combining graphene materials with metal nanoparticles improves the functional properties of the components.<sup>23</sup> Despite the possibility of combining GO with other substances, GO itself can result in an antibacterial effect, in which several mechanisms are highlighted. One of them is mechanical damage to the structures of the outer layers of cells due to the sharp edges that GO has. In addition to this, in the planktonic form of bacteria, the predominant antibacterial effect of GO is the wrapping of cells, which causes a reduction in the availability of nutrients, but also contributes to the perturbation of membranes resulting in complete cell degradation. Cell degradation and release of intracellular contents also occur due to generation of ROS, due to Van der Waals interactions between GO functional groups and cell membranes.<sup>24,25</sup>

Given the above facts, we hypothesize that graphene oxide provides a platform for the controlled distribution of metal nanoparticles in the proposed nanofilms, which, owing to their antibacterial properties, will harm bacterial cells by

generating ROS, which will hinder the formation of a biofilm and change its overall structure. This study aimed to create a nanofilms based on graphene oxide and silver, copper, and zinc oxide nanoparticles to prevent biofilm formation by *S. aureus, S. enterica*, and *P. aeruginosa*.

# **Material and Methods**

# Nanoparticles

Silver nanoparticles (Ag) and copper nanoparticles (Cu) were obtained from Nano-Tech (Warsaw, Poland), zinc oxide nanoparticles (ZnO; purity 99.5%) from SkySpring Nanomaterials (Houston, TX, USA), and graphene oxide (GO) from Advanced Graphene Products (Zielona Góra, Poland). Nanoparticles were diluted in ultrapure Milli-Q water (GO 5  $\mu$ g/mL, Ag 25  $\mu$ g/mL, Cu 12.5  $\mu$ g/mL, ZnO 50  $\mu$ g/mL) and sonicated at 500 W and 20 kHz for 2 min using a VC 505 Ultrasonic Liquid Processor with a cup horn (Sonics & Materials, Newtown, CT, USA); nanocomposites were left for 15 min for self-combination (physical adsorption). Thereafter, nanocomposites were centrifuged (12,000 rpm, 10 min), supernatant was discarded, and the pellets were suspended in sterile ultrapure water. Nanofilms were prepared as described above from single nanomaterials and nanocomposites (Ag 25  $\mu$ g/mL + GO 5  $\mu$ g/mL, Cu 12.5  $\mu$ g/mL + GO 5  $\mu$ g/mL) by total evaporation under sterile conditions. Similar method for nanofilms preparation was used by Pruchniewski et al 2023.<sup>26</sup>

## Characterization of Nanomaterials

Size distribution and zeta potential were assessed for selected concentrations of nanomaterials. The nanomaterials were prepared using ultrapure water. Size distribution was evaluated by dynamic light scattering (DLS) and zeta potential by electrophoretic light scattering (ELS) with Smoluchowski approximation using a Zeta Sizer Nano-ZS90 analyzer (Malvern Instruments, Malvern, UK), in triplicate for size distribution and quadruplicate for zeta potential, at room temperature (<u>Supplementary Materials</u>). Both DLS and ELS are recommended methods for measuring size distribution and zeta potential, respectively.<sup>27</sup>

## Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) Analysis of Nanoparticles

A drop of the suspension (approximately 5  $\mu$ L) was applied to a TEM mesh made of copper foil. Then, to remove excess solution, the mesh was placed in a rotary coater chamber (POLOS Spin 150 i-NNP by SPS Semiconductor Production Systems). Thus, a thin even layer of the applied substance on the TEM mesh was obtained. The following coating parameters were used: 2000 rpm for 60s at 21°C.

After removing the mesh from the rotary coater chamber, the TEM mesh was placed in the SEM stage holder located in the scanning electron microscope chamber (Quanta 250 FEG SEM, FEI, Hillsboro, OR, USA) coupled to the scanning transmission electron microscopy detector (STEM, FEI, Hillsboro, OR, USA).<sup>28</sup>

## Scanning Electron Microscope with Energy Dispersive X-Ray (SEM-EDX) Analysis of Nanoparticles

To perform chemical analysis of the nanocomposites using a Quanta 250 FEG FEI scanning electron microscope with an energy dispersive X-ray (SEM-EDX) detector,<sup>28</sup> the nanoparticle hydrocolloids were centrifuged using an MPW Centrifuge MPW-352R (10,000 rpm, 20 min) (<u>Supplementary Materials</u>). Then, the droplets (0.05–0.1  $\mu$ L) of hydrocolloids were placed 10x on the SEM tables and dried successively in a vacuum-dried Vacucell 55 (MMM Group) at 30°C. The following parameters were used: spot 4.5, 20 kV.

## Characterization of Nanofilms

The morphology and roughness of samples (GO and GO metal nanoparticles) were examined by atomic force microscopy (AFM) (NT-MDT Spectrum Instruments, Moscow, Russia). The measurements were carried out under ambient conditions in the semi-contact mode using a silicon AFM probe (NSG10/Au, NT-MDT Spectrum Instruments, Moscow, Russia) featuring a tetrahedral tip with a curvature radius of ~10 nm. The cantilever of the probe was characterized by a force constant range from 3.1 to 37.6 N/m and a resonant frequency range of 265–410 kHz. The scan size of the collected topographies was 20  $\mu$ m × 20  $\mu$ m with a resolution of 256 points per line. The average surface roughness (Sa) was calculated using the Gwyddion 2.62 software (<u>http://gwyddion.net</u>). Similar method was performed by Olkowicz et al.<sup>29</sup>

## **Bacterial Cultures**

*S. aureus* (ATCC 25923), *S. enterica* (ATCC 13076), and *P. aeruginosa* (ATCC 27853) were obtained from the LGC Standards (Teddington, GB). The bacterial strains were defrosted and washed three times with distilled water to purify glycerol. Thereafter, the bacteria were cultured in trypticase soy agar (TSA) (Biomaxima, Lublin, Poland) for *S. aureus* and *P. aeruginosa* and brain heart agar (BHA) (Biomaxima, Lublin, Poland) for *S. enterica* in a microbiological incubator at 37°C for 24 h.

#### Reactive Oxygen Species Production

The DCFDA Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK) was used to measure intracellular ROS production in the bacterial cells. Fifty microliters of bacterial culture (0.5 on the McFarland scale) with DCFDA reagent (1 $\mu$ L/mL) were added to a 96-well plate, 50  $\mu$ L of nanoparticles was added (GO 5  $\mu$ g/mL, Ag 25  $\mu$ g/mL, Cu 12.5  $\mu$ g/mL, ZnO 50  $\mu$ g/mL; nanocomplexes GO 5  $\mu$ g/mL + Ag 25  $\mu$ g/mL, GO 5  $\mu$ g/mL + Cu 12.5  $\mu$ g/mL, GO 5  $\mu$ g/mL), and the plates were incubated at 37°C protected from the light. Fluorescence was measured at excitation and emission wavelengths of 485 and 535 nm, respectively, using an ELISA reader (Infinite M200; Tecan, Durham, NC, USA). The results were expressed as the ratio between two time points: 0 and 45 min.<sup>30</sup>

#### Antioxidant Capacity

To determine antioxidant capacity, Trolox was measured using an OxiSelect<sup>TM</sup> Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assay Kit (ABTS) (Cell Biolabs Inc., San Diego, California, USA). Cell lysates were prepared according to the manufacturer's instructions. Bacterial strains were cultured in TSA for *S. aureus* and *P. aeruginosa* and in BHA for *S. enterica* at 37°C for 24 h. Thereafter, bacteria were placed in distilled saline buffer (control samples) and in nanoparticle solutions (concentrations prepared in distilled saline buffer; final concentrations: GO 5 µg/mL, Ag 25 µg/mL, Cu 12.5 µg/mL, ZnO 50 µg/mL; nanocomplexes GO 5 µg/mL + Ag 25 µg/mL, GO 5 µg/mL + Cu 12.5 µg/mL, GO 5 µg/mL + ZnO 50 µg/mL) at 37°C for 8 h. All samples were then centrifuged at 5000 g for 10 min, and the supernatant was collected. The test procedure was performed according to the manufacturer's instructions using standard curve dilutions. The absorbance was measured at 410 nm. The results were expressed based on a standard curve in accordance with the manual.

#### **Biofilm Formation**

#### Bacterial Biofilm Formation

Crystal violet staining and confocal microscopy analyses were performed to characterize the biofilm formation on the nanofilm surfaces. Crystal violet staining allowed the selection of the concentrations from which the composites were formed. Crystal violet staining is one of the basic methods for evaluation biofilm formation.<sup>31</sup>

For crystal violet staining, 96-well plates were covered with GO at concentrations of 2.5, 5, 10, 25, 50, and 100  $\mu$ g/mL and nanoparticles (Ag, Cu, and ZnO) at concentrations of 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100  $\mu$ g/mL. Wells covered with water were used as control wells. The plates were left to completely dry under sterile conditions. Thereafter, bacterial suspensions (0.5 on the McFarland scale) were added to each well and incubated for 48 h at 37°C. After incubation, the suspensions were removed, washed 3 times with phosphate buffer saline (PBS, pH = 7.4) and fixed with methanol for 15 min. After fixation, each well was washed with PBS 3 times, and crystal violet staining was performed for 15 min. The plates were then washed five times with PBS and ethanol was added for 30 min. After the final incubation, absorbance was measured at a wavelength of 584 nm. The results are expressed as a percentage of the control sample.

For confocal microscopy analysis, nanofilms were prepared in  $\mu$ -Slide 8 Well (Ibidi GmbH) in a volume of 300  $\mu$ L and left for total evaporation under sterile conditions. Thereafter, 300  $\mu$ L of liquid medium (tryptic soy broth for *S. aureus* and *P. aeruginosa*, brain heart infusion broth for *S. enterica*) and 10  $\mu$ L of bacterial suspension (0.5 on the McFarland scale) were added into each well and incubated at 37°C for 48 h. After incubation, the medium containing the

bacteria was removed, washed three times with sterile saline buffer (pH = 7.0), fixed with methanol for 30 min, and washed with sterile saline buffer three times. To avoid non-specific staining of the biofilm structure, two dyes for nucleic acids were used. DAPI staining solution (10  $\mu$ L/mL, Sigma Aldrich, Hamburg, Germany) and SYTO9 staining solution (1  $\mu$ L/mL, Thermo Fisher Scientific) were added at a volume of 300  $\mu$ L to each well and incubated for 30 min at room temperature protected from the light. After the staining step, the staining solutions were removed, each well was washed three times with buffer saline, and samples were placed in 90% glycerol. Each sample was analyzed using a confocal microscope (FV-1000; Olympus Corporation, Tokyo, Japan) and imaged using 60× objective lasers at 405 nm for DAPI and 488 nm for SYTO9. All images were obtained using the same laser parameters, and each sample was imaged as horizontal sample slices (Z-stack) in five fields of view. Images were analyzed using Gimp 2.10.18 software by measuring the thickness of the captured biofilm structure at five points from at least three pictures. The results are presented as the mean  $\pm$  standard deviation. Examination of biofilm by confocal microscopy is a valuable tool in visualizing 3D architecture.<sup>32</sup>

#### SEM—Bacterial Biofilm Structure

Biofilm structures were analyzed by scanning electron microscopy (SEM type FEI, Quanta 200, Hillsboro, OR, USA) in low-vacuum mode at an accelerating voltage of 20 kV. Only the nanocomposites were chosen for further analysis. Nanofilms were prepared by adding 1 mL onto sterile coverslips until total evaporation under sterile conditions. Liquid medium in a volume of 1 mL and 10  $\mu$ L bacterial suspension (0.5 on the McFarland scale) was placed on each coverslip and incubated at 37°C for 48 h. Thereafter, the medium with bacteria was removed, and after washing three times with sterile buffer saline, they were fixed with 2.5% glutaraldehyde for 30 min. The samples were washed three times with buffer saline, post-fixed with 1% OsO<sub>4</sub> in dH<sub>2</sub>O for 30 min, and washed three times with buffer saline. Subsequently, the samples were dehydrated using a series of ethanol solutions of increasing concentrations (25% EtOH for 5 min, 50% EtOH for 5 min, 75% EtOH for 5 min, 95% EtOH for 5 min, and 100% anhydrous EtOH for 10 min). Each sample was imaged at least five times at 5000× magnification.

## Statistical Analysis

All measurements are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with a post-hoc Tukey's test using GraphPad Prism 9 software (version 9.2.0, San Diego, CA, USA). Differences were considered statistically significant at *p*-value  $\leq 0.05$ .

# Results

## Characterization of Nanomaterials and Nanofilms

Electrophoretic light scattering was used to evaluate the colloidal stability of the nanomaterials. The zeta potential values of all the samples, except ZnO, were negative (Figure 1). Metal/metal oxide nanoparticles, when combined with GO, exhibited a more negative zeta potential, even for ZnO, which reached a negative value from being initially positive. GOAg showed the most negative zeta potential value (-41.7 mV), followed by GOCu (-24.8 mV) and GOZnO (-12.2 mV). The zeta potential of the nanocomposites up to 48 h in all cases was at a constant level or became slightly more negative. Only the zeta potential of GOAg decreased to a value of -38 mV after 4 h, but began to return to its initial value after 8 h and then increased to a value of -50 mV in the following hours. The other types of nanocomposites showed more negative zeta potential values over time (Figure S1).

The size distribution of each nanomaterial exceeded 100 nm owing to the presence of GO flakes, which were visible in STEM analysis. Metal/metal oxide nanoparticles were associated with the surface of the GO flakes. Ag was evenly distributed over the surface, unlike Cu and ZnO, which formed large agglomerates that covered the entire surface of the GO flakes. The large coverage of flakes by Cu and ZnO is also evident during DLS analysis, in which those two samples showed the largest average size (437.0 nm for GOCu and 3079.7 nm for GOZnO), larger than the GO flakes themselves. A topographical analysis of the nanofilm surfaces was conducted using AFM. The addition of metal/metal oxide nanoparticles to the GO flakes caused the formed nanofilms to be characterized by increased roughness and varying



Figure I Zeta potentials of nanomaterials used. All measurements were performed four times. Zp is the mean value of each sample's zeta potential.

heights (Figure 2), especially when observing GOAg (Sa = 134 nm) and GOZnO (Sa = 195 nm). Interestingly, these two nanocomplexes were the most and least colloidally stable, as indicated by zeta potential analysis (Figure 1).

EDX analysis of GO and the nanocomposites showed that the spectrum of all nanomaterials consisted of signals from C and O atoms (Figure 3). The nanocomposites contained atoms typical of nanoparticles on the surface of GO. GOAg exhibited an absorption band peak for Ag at approximately 3 keV. In GOCu, the band peak corresponding to Cu was around 0.5 keV, and in GOZnO, the peak of Zn was around 1 keV. The content of the various elements found in the hydrocolloids after centrifugation is shown in <u>Table S1</u>. In all cases, the content of metals bound to GO was more than 99%, and residual amounts were present in the supernatant as unbound particles.

## ROS Generation and Total Antioxidant Capacity

All the metal nanoparticles and nanocomposites contributed to the generation of ROS (Figure 4). For *S. aureus*, the highest level of ROS was observed in the group treated with GOAg, whereas for Gram-negative species (*S. enterica* and *P. aeruginosa*), the factor that generated the most ROS was ZnO. Antioxidant capacity was lowest in the samples treated with nanocomposites compared to the control (untreated) samples for each bacterial strain. For *S. aureus*, but no other species of bacteria tested, GO caused this value to be heightened.

## **Biofilm Formation**

To determine the concentrations of the nanocomposites, biofilm formation from individual nanoparticles on the nanofilms was evaluated (Figure 5). The only significant concentration of GO was 5  $\mu$ g/mL; however, GO was not highly toxic to the three tested bacterial species. In all species, Ag were the factor, which caused limited biofilm formation in dose-depended manner (except the lower concentration 3.125  $\mu$ g/mL for *S. aureus* and *S. enterica*). Ag concentrations exceeding 25  $\mu$ g/mL caused biofilm formation to a greater extent than 50%. Cu inhibited biofilm formation at similar level in the concentrations of 100  $\mu$ g/mL (except *P. aeruginosa*), 50, 25, 12.5  $\mu$ g/mL. Only two of the highest concentrations of ZnO (100 and 50  $\mu$ g/mL) significantly reduced biofilm formation in bacteria tested.

The thickness was significantly reduced in all samples compared with that of the control probe (Figure 6). The smallest thicknesses were observed for GOAg among the three tested bacterial strains; however, the other



Figure 2 Physicochemical analysis of nanofilms using scanning transmission electron microscopy (STEM), atomic force microscopy (AFM), and size distribution. Sa is average surface roughness; Sd is average sample size (nm).

nanocomposites also caused a reduction in thickness and a change in the distribution of cells, which were much more loosely arranged without forming a compact layer. *P. aeruginosa* forms a biofilm with a large number of single cells that do not adhere directly to the lower layers and are located in the upper part of the biofilm. Z-stack images from which 3D views were created are shown in the Figure S2.

Visualization of the cells in the biofilm showed that the nanofilm was not favorable for creating a biofilm structure (Figure 7). *S. aureus* in the control sample (non-treated) created a spatial structure of compact cells clumped together. Many cells were observed in the GOCu and GOZnO groups although they formed significantly smaller clusters. In contrast, only a few individual cells were observed in the case of *S. aureus* and *P. aeruginosa*. *S. enterica* on the GOAg nanofilm formed a biofilm that was similar to that of the GOZnO group. Non-treated *P. aeruginosa* created a very thick and heterogeneous structure full of ECM, in which the cells were embedded, which was not observed in the test samples. The cells of all species in the control group showed proper morphology, whereas in the test groups, individual cells showed collapses in cell structure, appearing flatter, and even shrunken.



Figure 3 EDX analysis of GO and nanocomposites: GOAg, GOZnO. Graphs are representative pictures. Ranges in the tables are values from at least seven spots.

## Discussion

Graphene oxide is known for its electrical, optical, thermal, and mechanical properties, and metal nanomaterials exhibit special physical and chemical properties. Therefore, they can be used in a wide range of applications, from nanomedicine to optics. The decoration of GO with metal nanoparticles may provide outstanding performance in the proposed solutions, which is based on the synergistic effect these materials can demonstrate.<sup>33</sup> Currently, although there is research involving nanocomposites consisting of graphene oxide with metal nanoparticles, the lack of an exact mechanism of action of such nanocomposites is still highlighted, even among the latest studies.<sup>34</sup> The mutual change in the properties of the materials used has been demonstrated in the research presented, which is noticeable during the zeta potential analysis, in which nanocomposites were characterized by higher negative zeta potential values than the metal nanoparticles alone (Figure 1). This demonstrates the mutual stability of the two materials (GO and metal/metal oxide nanoparticles) because the zeta potential is considered a parameter indicating colloidal stability when it approaches the border value of  $\pm 30$  mV. Combining materials that had negative zeta potentials with GO (-39.6 mV) increased the negative values: Ag from -34.4



Figure 4 Generation of reactive oxygen species (ROS) (A) and the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) (B) in S. aureus, S. enterica, and P. aeruginosa after treatment with nanostructures. All results are presented as mean value  $\pm$  standard deviation. \*: statistically significant differences ( $p \le 0.05$ ) in relation to control.



Figure 5 Biofilm formation (%) by S. aureus, S. enterica, and P. aeruginosa on the nanofilms composed of GO, Ag, Cu, and ZnO at different concentrations ( $\mu$ g/mL). \*: statistically significant differences at  $p \le 0.05$  compared to the control samples.



Figure 6 Confocal microscopy visualization of biofilm structure of S. aureus, S. enterica, and P. aeruginosa created on the surface of nanofilms. At is average thickness of biofilms  $\pm$  standard deviation. \*: statistically significant differences ( $p \le 0.05$ ) from the control.

mV to GOAg -41.7 mV and Cu from -18.8 mV to GOCu (-24.8 mV). The only nanoparticles with a positive zeta potential were ZnO (10.8 mV), although with GO, the value was also negative and amounted to -12.2 mV. Interestingly, the produced nanocomposites showed similar and even slightly higher stability over time up to 48h (Figure S1). These results are consistent with those obtained by Iravani et al, in which the GO nanocomposites also stabilized over time, increasing the zeta potential values toward higher colloidal stability.<sup>35</sup> The mutual action of both nanomaterials was also



Figure 7 The biofilm structure of S. aureus, S. enterica, and P. aeruginosa created on the nanofilms using scanning electron microscopy with 5000× magnification. The red frames show enlarged sections. The blue arrows indicate the ECM fragments.

visible in the shape of the nanocomposite, in which GO was observed as a platform for the metal/metal oxide nanoparticles arranged on its surface (Figure 2). As GO exhibited the largest size (>400 nm) and was in the form of flakes, its nanocomposites also exhibited larger sizes owing to the arrangement of metal nanoparticles on the GO surface. Moreover, the GOZnO nanocomposite was characterized by the largest size; however, because ZnO is the least stable nanomaterial, it may have created agglomerates on GO. The formation of agglomerates (weakly bound nanoparticles) by nanoparticles with a zeta potential close to zero was also confirmed in our previous research.<sup>36,37</sup> This is because of the small size of individual nanoparticles, which have a high surface energy.<sup>38</sup> Agglomerates are relatively easy structures to overcome because the forces of interaction that occur in them are mainly electrostatic, van der Waals, solvation, or capillary effects.<sup>39</sup> Moreover, there are reports that larger agglomerates do not cause lower toxicity than smaller ones, which allows for further studies of even larger structures, as they may exhibit equally effective properties.<sup>20</sup> For this reason, the nanocomposites are larger than single nanoparticles typically exceeding 100 nm. This size of nanocomposites is consistent with the results obtained by other researchers.<sup>28,30</sup>

Each nanocomposite showed high carbon and oxygen contents in the samples with graphene oxide components (Figure 3). The high oxygen content of the GO group is associated with the presence of numerous oxygen-containing groups like hydroxyl, carbonyl, and epoxy groups, which are placed on the flakes made of carbon with carboxyl groups on the periphery.<sup>40</sup> Interestingly, GOZnO had the lowest oxygen content compared to other nanowires that were not oxides but metals themselves, yet these results are consistent with other studies that have proven that ZnO located on GO sheets can cause oxygen defects in their structure.<sup>41</sup> An optical absorption band peak around 3 keV is typical for Ag nanocrystallites.<sup>42</sup> Similar peaks around <1 keV and around 8 keV for Cu were observed by Guzman et al.<sup>43</sup> The metal element content of the supernatant-to-pellet comparison (nanocomposites produced) showed that all types of metal nanoparticles bound to graphene oxide at a minimum of 99% (Table S1).

It was previously demonstrated that metal nanoparticles are uniformly distributed over the surface of graphene materials, which avoids the re-deposition of graphene.<sup>44</sup> This phenomenon also explains the surface roughness of the nanocomposites. The surfaces of the nanocomposites were characterized by a greater surface roughness than that of bare GO (Figure 2). The surface roughness of GOZnO was 195 nm; however, as mentioned before, it was the least stable nanocomposite forming agglomerates. GOAg had the second-highest surface roughness, with an average value of 134 nm. This is consistent with the results obtained by Ahmad et al, in which silver nanoparticles were shown to decorate wrinkled graphene oxide sheets on the basis of AFM and SEM analysis.<sup>45</sup> However, rough surfaces are more suitable for bacterial adhesion than smooth surfaces because of the increased surface area and protection against external forces.<sup>46</sup> Depending on the stimuli provided by the environment, bacterial cells promote the transcription of genes responsible for the transition from planktonic forms to cells adjacent to the surface. Interactions of cells with each other as well as cells with the surface therefore play an important role in biofilm formation. In a study conducted by Yadav et al it has been shown that its presence can interfere with any of these processes, helping to reduce biofilm formation.<sup>47</sup> In our study, all types of nanocomposites contained GO, albeit they were doped with metal nanoparticles, which further affected their properties.

All nanocomposites caused generation of reactive oxygen species (statistically significant) (Figure 4). For *S. aureus*, GOAg was the causative agent of ROS formation to the greatest extent, while for Gram-negative bacteria it was ZnO. However, the antibacterial properties of ZnO are mainly attributed to membrane disruption or generation of intracellular ROS. It is also believed that zinc oxide nanoparticles' morphology affects their interaction with bacterial cells.<sup>48</sup> In our studies, ZnO was one of the least colloidally stable nanoparticles; thus, these nanoparticles created agglomerates which restricted direct contact with the bacterial surface. In general, ROS generation is one of the main cytotoxic factors during in vitro studies following exposure to NPs. Therefore, it is believed that metal-based nanoparticles act on the bacterial membrane by releasing ions, and this is proposed as a main antibacterial mechanism.<sup>49</sup> The generation of oxidative stress in bacteria may result from the disruption of the electron transport chain due to the high affinity of silver nanoparticles for the cell membrane.<sup>50</sup> In our study, nanocomposites interact with cell membrane (which is evident in SEM analysis in our study due to the presence of cells with changed structures). Cell membrane is responsible for electron chain transfer. Molecular oxygen produces O2•, which is the primary ROS by one-electron reduction catalyzed by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase. Further reduction of molecular oxygen may lead to forming either H2O2 or

OH•, via dismutation and metal-catalyzed Fenton reaction via dismutation and metal-catalyzed Fenton reaction. Nevertheless, the exact mechanism of ROS-mediated antibacterial action of nanoparticles (eg AgNPs) is not fully clear.<sup>51</sup> Gram-negative cell structures are characterized by an outer membrane (OM) and thin cell wall. As the cell membrane is the cover and barrier between the cell interior and external environment, it represents the first point of direct contact between nanoparticles and bacterial cells. In contrast to typical biological membranes, OM is permeable to small, water-soluble molecules.<sup>52</sup> As shown by Yusof et al,<sup>53</sup> zinc oxide nanoparticles realize zinc ions in parallel with incubation time. ZnO generates ROS because of its electronic band structure. GOCu contributed similar levels of ROS to other nanocomposites, which suggests an effective action; however, this was not observed in the biofilm analysis (Figures 6 and 7), where GOCu appeared to be the least toxic. Similarly, the biofilm formed on its base was the thickest and had the highest number of cells, which indicates that GOCu is effective for planktonic forms, but not for biofilms. One of the proposed mechanisms of copper nanoparticles is the release of ions that, among other things, interact with cells by inhibiting the production of enzymes and proteins but also have a high affinity for amines and carboxyl groups found on the surface of cells, allowing direct binding to cells.<sup>54</sup> This could explain the results obtained, since the cells in the biofilm are nested in an ECM. Even if some materials do not show a reduction in biofilm formation in crystal violet staining (such as bare GO, ZnO, and some concentrations of Cu and Ag) (Figure 5), there are some ways to overcome this and improve their toxicity. For example, the antibacterial efficiency of ZnO nanoparticles toward both Gram-positive and Gram-negative species can be increased by combining them with carbon materials, particularly GO. Thus, it is possible to increase the efficiency by up to two times compared with single nanoparticles.<sup>55</sup>

Antioxidant capacity is the ability to scavenge free radicals.<sup>56</sup> If the nanocomposites produce ROS, this capacity is reduced, as can be seen in the present study (Figure 4). Interestingly, in Gram-negative bacteria, all metal nanoparticles and nanocomposites caused an increase in ROS and a decrease in antioxidant capacity, whereas in Gram-positive bacteria such as *S. aureus*, similar results were observed in the extent of ROS production, but no similar relationship was observed when analyzing antioxidant capacity. Although these results do not show a clear relationship in all groups, according to Metryka et al, nanoparticles' antioxidant capacity may be connected with down-regulation of the genes encoding antioxidants, which are, in turn, related to increased regulation of genes involved in repairing bacterial outer layers, nucleic acids, and other genes responsible for cell homeostasis.<sup>57</sup> Such a mechanism seems probable, especially as in our studies, the bacterial cells had defects in their outer layers, which is visible in SEM analysis. Moreover, metal nanoparticles may inhibit antioxidant enzymes (eg SO, CAT) because of altering their secondary structure, which in consequence cannot function properly. Antioxidant capacity is the summary activity of cells' components, which protect from oxidative stress and free radicals produced.<sup>58</sup> It means that during exposure to metal nanoparticles, antioxidant enzymes lower in case of nanocomposites than in the control sample (not treated with nanocomposite/nanoparticles), meaning that total antioxidant activity was lowered than properly functioning cells (control group).

The changes caused by the nanocomposite base also contributed to a reduction in the thickness of the resulting biofilm (Figure 6), which indicates not only the degradation of individual cells but also the destruction of the entire structure. However, only cells were stained during biofilm analysis, with no separate staining of the extracellular matrix. In the control groups, the interconnected cells formed a multilayer structure, as shown in z-stack images in Figure S2. The transport of nanoparticles within the biofilm structure may be affected by the presence of water channels, which makes it possible for nanoparticles to reach deeper layers. Such a phenomenon is desirable because it ensures not only the degradation of cells in the upper layers but also the destruction of the structure from within, where the cells exhibit other metabolic properties. In the present study, this may have been the case with nanocomposites decorated with metal nanoparticles, which was partially confirmed by confocal microscopy analysis (Figure 6), where the entire biofilm structure was degraded, and the cells were arranged in a thinner layer. In addition, their arrangement changed when treated with nanocomposites, especially GOAg, forming a much less layered structure (Figure S2). However, the migration of nanoparticles is desirable when their transport occurs through channels, whereas in the biofilm structure, there are structures called pores. Antibacterial agents are diluted within the pores, which can weaken their effect.<sup>14</sup> The test results do not indicate the accumulation of nanoparticles in the pores. However, because of the constant reorganization of the biofilm structure, this cannot be excluded during prolonged exposure.

Nevertheless, the obtained results were confirmed by SEM analysis (Figure 7), in which the cells were further apart, and EPS was partially degraded, although small fragments of the matrix were visible in the treated groups. The lowest cell density was observed for the GOAg and GOZnO groups. Interestingly, the two types of films exhibited the highest average surface roughness values. These results are consistent with other research findings by Wu et al, which indicated that rough surfaces reduced the number of viable bacterial cells (*S. aureus* and *P. aeruginosa* were used as bacterial models) after only 4 h in the early stages of biofilm formation.<sup>59</sup> In other research, rougher surfaces of ZnO contributed to less metabolic activity and, consequently, to a decrease in bacterial viability in comparison to smooth surfaces.<sup>60</sup> These results suggest that even though rough surfaces are generally considered more attractive for bacterial cell adhesion, they are not conducive to biofilm formation, but only when planktonic forms settle on nanofilms. This may be related to the long distances between bacteria when they inhabit rough surfaces, making them unable to form a three-dimensional structure through their inability to communicate via quorum sensing based on chemical signals, which informs them about population density, transfer of genetic material, or synthesis of secondary metabolites.<sup>61</sup>

GOAg despite its rough surface, was the most limiting factor for biofilm formation by all species tested, which was visible during biofilm analysis (Figures 6 and 7). Silver nanoparticles are well known for their antibacterial properties owing to ion realization, which, among other things, can adhere to cell walls and membranes and interrupt envelope structures.<sup>62</sup> This may also explain why the bacterial cells were deformed when exposed to the nanocomposites, as was evident from the SEM analysis (Figure 7). Jang et al also demonstrated the great potential of the GOAg nanocomposite, which significantly inhibited Gram-positive bacteria exemplified by *S. epidermidis* and to a lesser extent Gram-negative bacteria *P. aeruginosa*.<sup>63</sup> Codita et al<sup>64</sup> documented that nanofilms composed of silver and copper had strong antibacterial properties against both Gram-positive and Gram-negative species, although this depended on the physicochemical properties of these nanofilms.

Summarizing the effect of the nanocomposites, GOAg was the most effective against all three bacterial strains (*S. aureus, S. enterica* and *P. aeruginosa*). It was the agent with the highest colloidal stability (zeta potential of -41.7 mV), and thus the lowest tendency to agglomerate, which can also be seen in the expressed hydrodynamic diameter of 214.4 nm. The nanocomposites had a high average surface roughness (Sa = 134 nm), but due to their high toxicity, this was not a parameter promoting biofilm formation. For Gram-positive bacteria, using *S. aureus* as an example, this was the factor generating the highest amount of ROS formation, as well as reducing the total antioxidant capacity of the bacteria to the greatest extent. Exposure of all three tested bacterial species to GOAg resulted in the greatest reduction in biofilm thickness based on cell alignment. A significantly degraded biofilm structure is also observed during SEM analysis, in which *S. aureus* and *P. aeruginosa* were characterized by the presence of only a few cells.

The GOCu nanocomposite had medium colloidal stability, with a zeta potential of -24.8 mV. The nanocomposites had the lowest surface roughness among the types of nanocomposites analyzed (Sa = 60 nm) and a larger hydrodynamic diameter than GOAg (437.0 nm). The nanocomposite caused ROS generation at a similar level to GOZnO in *S. aureus*, and for the other two bacterial species at a similar level to all nanocomposites used, although these results are statistically significant. GOCu also inhibited biofilm structure for two bacterial species (*S. aureus* and *P. aeruginosa*), although a lower number of *S. enterica* cells were apparent on SEM analysis compared to the control group (results not statistically significant on analysis by confocal microscopy).

GOZnO nanocomposites were characterized by the lowest colloidal stability (zeta potential equal to -12.2 mV), and thus the highest hydrodynamic diameter and the highest surface roughness, due to the formation of agglomerates. Nevertheless, it was a factor that statistically significantly caused ROS generation and reduced total antioxidant capacity in all tested bacterial species. In addition, it significantly reduced the cell content of the biofilm, although to the greatest extent in *P. aeruginosa*.

## Conclusion

These results make it possible to select an effective antimicrobial agent that can reduce biofilm formation. The combination of metal nanoparticles with graphene oxide, which constitutes a platform and improves the physicochemical properties of metal nanoparticles, is effective as a film that limits biofilm formation, resulting in changes in both the biofilm architecture and the thickness of the overall structure. This is particularly important, as biofilms are a real threat

to public health; however, owing to their complex structure, they are difficult to eradicate and can persist despite the use of conventional antibacterial agents.

In conclusion, the nanocomposites prepared as presented resulted in significant binding of metal nanoparticles to graphene oxide. In addition, all nanocomposites remained stable after 48h, which is particularly important for long-term applications such as coating materials associated with medical-related fields or food packaging, among others. These results therefore contribute to the possibility of developing coating technologies for such surfaces that will reduce biofilm formation in a controlled manner.

# Acknowledgments

The manuscript is part of the Ph.D. thesis of Agata Lange.

# Funding

The publication was financed by Science development fund of the Warsaw University of Life Sciences - SGGW.

# Disclosure

The author(s) report no conflicts of interest in this work.

# References

- 1. Berlanga M, Guerrero R. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microb Cell Fact.* 2016;15 (1):1–11. doi:10.1186/S12934-016-0569-5/FIGURES/3
- Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y, Nomura N. Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2016;80(1):7–12. doi:10.1080/09168451.2015.1058701
- 3. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "House of Biofilm Cells. J Bacteriol. 2007;189(22):7945-7947. doi:10.1128/JB.00858-07
- Pinto RM, Soares FA, Reis S, Nunes C, Van Dijck P. Innovative Strategies Toward the Disassembly of the EPS Matrix in Bacterial Biofilms. Front Microbiol. 2020;11(May):1–20. doi:10.3389/fmicb.2020.00952
- 5. Mirzaei R, Mohammadzadeh R, Alikhani MY, et al. The biofilm-associated bacterial infections unrelated to indwelling devices. *IUBMB Life*. 2020;72(7):1271–1285. doi:10.1002/IUB.2266
- Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah TF, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*. 2018;4(12):e01067. doi:10.1016/J.HELIYON.2018.E01067
- 7. Archer NK, Mazaitis MJ, William Costerton J, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation and roles in human disease. *Virulence*. 2011;2(5):445. doi:10.4161/VIRU.2.5.17724
- 8. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. Pseudomonas aeruginosa Biofilms. Int J Mol Sci. 2020;21(22):8671. doi:10.3390/IJMS21228671
- 9. Harrell JE, Hahn MM, D'Souza SJ, et al. Salmonella Biofilm Formation, Chronic Infection, and Immunity Within the Intestine and Hepatobiliary Tract. Front Cell Infect Microbiol. 2021;10:624622. doi:10.3389/FCIMB.2020.624622
- 10. Subhadra B, Gondil VS. E D I to R I a L Open Access Biofilms and Their Role on Diseases. doi:10.1186/s12866-023-02954-2
- 11. Lin YK, Yang SC, Hsu CY, Sung JT, Fang JY. The Antibiofilm Nanosystems for Improved Infection Inhibition of Microbes in Skin. *Molecules*. 2021;26(21):6392. doi:10.3390/MOLECULES26216392
- Gomaa HH, Amin DY, Ahmed AR, Ismail NA, El Dougdoug KA, Abd-Elhalim BT. Antimicrobial, antibiofilm, and antiviral investigations using Egyptian Phoenix dactylifera L. pits extract. AMB Express. 2024;14(1):1–11. doi:10.1186/S13568-024-01695-3/FIGURES/3
- Shkodenko L, Kassirov I, Koshel E. Metal Oxide Nanoparticles Against Bacterial Biofilms: perspectives and Limitations. *Microorganisms*. 2020;8 (10):1545. doi:10.3390/microorganisms8101545
- 14. Quan K, Hou J, Zhang Z, et al. Water in bacterial biofilms: pores and channels, storage and transport functions. *Crit Rev Microbiol*. 2022;48 (3):283–302. doi:10.1080/1040841X.2021.1962802
- Balaure PC, Grumezescu AM. Recent Advances in Surface Nanoengineering for Biofilm Prevention and Control. Part I: molecular Basis of Biofilm Recalcitrance. Passive Anti-Biofouling Nanocoatings. *Nanomaterials*. 2020;10(6):1–30. doi:10.3390/NANO10061230
- Hosnedlova B, Kabanov D, Kepinska M, et al. Effect of Biosynthesized Silver Nanoparticles on Bacterial Biofilm Changes in S aureus and E. coli. Nanomaterials. 2022;12(13):2183. doi:10.3390/NANO12132183
- Franco D, Calabrese G, Guglielmino SPP, Conoci S. Metal-Based Nanoparticles: antibacterial Mechanisms and Biomedical Application. *Microorganisms*. 2022;10(9):1778. doi:10.3390/MICROORGANISMS10091778
- Li H, Yang Z, Khan SA, Walsh LJ, Seneviratne CJ, Ziora ZM. Characteristics of Metallic Nanoparticles (Especially Silver Nanoparticles) as Anti-Biofilm Agents. *Antibiotics*. 2024;13(9):819. doi:10.3390/ANTIBIOTICS13090819
- 19. Abdelhai MF, Shabaan RH, Kamal NM, Elemary EA, Abd-Elhalim BT, Hassan EA. Copper nanoparticles biosynthesis by Stevia rebaudiana extract: biocompatibility and antimicrobial application. *AMB Express*. 2024;14(1):1–15. doi:10.1186/S13568-024-01707-2/TABLES/4
- 20. Zhang N, Xiong G, Liu Z. Toxicity of metal-based nanoparticles: challenges in the nano era. Front Bioeng Biotechnol. 2022;10:1001572. doi:10.3389/FBIOE.2022.1001572/BIBTEX
- 21. Yin PT, Shah S, Chhowalla M, Lee KB. Design, synthesis, and characterization of graphene-nanoparticle hybrid materials for bioapplications. *Chem Rev.* 2015;115(7):2483–2531. doi:10.1021/CR500537T

- Kumar B, Kumar B. Graphene- and Graphene Oxide-Bounded Metal Nanocomposite for Remediation of Organic Pollutants. Carbon-Based Mater Environ Protect Remediat. 2020. doi:10.5772/INTECHOPEN.92992
- Parnianchi F, Nazari M, Maleki J, Mohebi M. Combination of graphene and graphene oxide with metal and metal oxide nanoparticles in fabrication of electrochemical enzymatic biosensors. Int Nano Lett. 2018;8(4):229–239. doi:10.1007/S40089-018-0253-3
- Saeed SI, Vivian L, CWSCW Z, et al. Antimicrobial activities of graphene oxide against biofilm and intracellular Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis. BMC Vet Res. 2023;19(1):1–11. doi:10.1186/S12917-022-03560-6/FIGURES/8
- Ravikumar V, Mijakovic I, Pandit S. Antimicrobial Activity of Graphene Oxide Contributes to Alteration of Key Stress-Related and Membrane Bound Proteins. Int J Nanomed. 2022;17:6707. doi:10.2147/IJN.S387590
- 26. Pruchniewski M, Sawosz E, Sosnowska-Ławnicka M, et al. Nanostructured graphene oxide enriched with metallic nanoparticles as a biointerface to enhance cell adhesion through mechanosensory modifications. *Nanoscale*. 2023;15(46):18639–18659. doi:10.1039/D3NR03581F
- 27. Garg S, Patel P, Gupta GD, Kurmi BD. Pharmaceutical Applications and Advances with Zetasizer: an Essential Analytical Tool for Size and Zeta Potential Analysis. *Micro Nanosyst.* 2024;16(3):139–154. doi:10.2174/0118764029301470240603051432
- Zielińska-Górska M, Sosnowska-ławnicka M, Jaworski S, et al. Silver Nanoparticles and Graphene Oxide Complex as an Anti-Inflammatory Biocompatible Liquid Nano-Dressing for Skin Infected with Staphylococcus aureus. J Inflamm Res. 2023;16:5477. doi:10.2147/JIR.S431565
- Olkowicz K, Kowalczyk K, Buczko Z, Czwartos J, Nasiłowska B. Durability and Additional Properties of Anodized Aluminum-Based Coatings with Different Wettability under Natural Conditions. *Materials*. 2023;16(10):3729. doi:10.3390/MA16103729/S1
- 30. Jaworski S, Wierzbicki M, Sawosz E, et al. Graphene oxide-based nanocomposites decorated with silver nanoparticles as an antibacterial agent. Nanoscale Res Lett. 2018;13(1):1–17. doi:10.1186/S11671-018-2533-2/FIGURES/13
- 31. Borowicz M, Krzyżanowska DM, Jafra S. Crystal violet-based assay for the assessment of bacterial biofilm formation in medical tubing. *J Microbiol Methods*. 2023;204:106656. doi:10.1016/J.MIMET.2022.106656
- Mountcastle SE, Vyas N, Villapun VM, et al. Biofilm viability checker: an open-source tool for automated biofilm viability analysis from confocal microscopy images. npj Biofilms Microb. 2021;7(1):1–12. doi:10.1038/s41522-021-00214-7
- Iordache M, Oubraham A, Sorlei IS, et al. Noble Metals Functionalized on Graphene Oxide Obtained by Different Methods—New Catalytic Materials. *Nanomaterials*. 2023;13(4):783. doi:10.3390/NANO13040783
- 34. Badoni A, Prakash J. Noble metal nanoparticles and graphene oxide based hybrid nanostructures for antibacterial applications: recent advances, synergistic antibacterial activities, and mechanistic approaches. *Micro Nano Eng.* 2024;22:100239. doi:10.1016/J.MNE.2024.100239
- 35. Iravani M, Simjoo M, Chahardowli M, Moghaddam AR. Experimental insights into the stability of graphene oxide nanosheet and polymer hybrid coupled by ANOVA statistical analysis. *Sci Rep.* 2024;14(1):1–18. doi:10.1038/s41598-024-68218-9
- 36. 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
- 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/S1
- Shrestha S, Wang B, Dutta P. Nanoparticle processing: understanding and controlling aggregation. Adv Colloid Interface Sci. 2020;279:102162. doi:10.1016/j.cis.2020.102162
- 39. Endres SC, Ciacchi LC, Mädler L. A review of contact force models between nanoparticles in agglomerates, aggregates, and films. *J Aerosol Sci.* 2021;153:105719. doi:10.1016/J.JAEROSCI.2020.105719
- 40. Uflyand IE, Naumkina VN, Zhinzhilo VA. Nanocomposites of Graphene Oxide and Metal-Organic Frameworks. *Russ J Appl Chem.* 2021;94 (11):1453–1468. doi:10.1134/S107042722111001X/FIGURES/9
- TDH L, Tuan HNA, Trinh KS, Van KT. Enhanced antibacterial property of zinc oxide nanoparticles by incorporation of graphene oxide. J Sol-Gel Sci Technol. 2022;104(1):246–257. doi:10.1007/S10971-022-05923-9
- 42. Safaepour M, Shahverdi AR, Shahverdi HR, Khorramizadeh MR, Gohari AR. Green Synthesis of Small Silver Nanoparticles Using Geraniol and Its Cytotoxicity against Fibrosarcoma-Wehi 164. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2009;1(2):111–115.
- 43. Guzman M, Arcos M, Dille J, Godet S, Rousse C. Effect of the concentration of NaBH4 and N2H4 as reductant agent on the synthesis of copper oxide nanoparticles and its potential antimicrobial applications. *Nano Biomed Eng.* 2018;10(4):392–405. doi:10.5101/NBE.V1014.P392-405
- 44. Moafi A, Heidari O, Soltannia B, Wlodarski W, Shahi F, Parvin P. Reduction of metal nanoparticle decorated flexible graphene oxide by laser at various temperatures and under selected atmospheres. *Carbon Trends*. 2022;6:100140. doi:10.1016/J.CARTRE.2021.100140
- 45. Ahmad MA, Aslam S, Mustafa F, Arshad U. Synergistic antibacterial activity of surfactant free Ag–GO nanocomposites. *Sci Rep.* 2021;11(1):196. doi:10.1038/s41598-020-80013-w
- 46. Schubert A, Griesmüller C, Gersdorff N, Bürgers R, Wiechens B, Wassmann T. Antibacterial coating of orthodontic elastomeric ligatures with silver and bismuth nanofilms by magnetron sputtering: a feasibility study. *Clin Exp Dent Res.* 2024;10(2). doi:10.1002/CRE2.864
- 47. Yadav N, Dubey A, Shukla S, et al. Graphene Oxide-Coated Surface: inhibition of Bacterial Biofilm Formation due to Specific Surface-Interface Interactions. ACS Omega. 2017;2(7):3070–3082. doi:10.1021/ACSOMEGA.7B00371/SUPPL\_FILE/AO7B00371\_SI\_001.PDF
- Singh R, Cheng S, Singh S. Oxidative stress-mediated genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles on Deinococcus radiodurans. *3 Biotech*. 2020;10 (2):1–13. doi:10.1007/S13205-020-2054-4/TABLES/1
- 49. Alavi M, Rai M, Martinez F, et al. The efficiency of metal, metal oxide, and metalloid nanoparticles against cancer cells and bacterial pathogens: different mechanisms of action. *Cellular Molecular Biomed Rep.* 2022;2(1):10–21. doi:10.55705/cmbr.2022.147090.1023
- Quinteros MA, Cano Aristizábal V, Dalmasso PR, Paraje MG, Páez PL. Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicol in vitro*. 2016;36:216–223. doi:10.1016/J.TIV.2016.08.007
- 51. Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Front Microbiol*. 2016;7 (NOV):231711. doi:10.3389/FMICB.2016.01831/BIBTEX
- 52. Sun J, Rutherford ST, Silhavy TJ, Huang KC. Physical properties of the bacterial outer membrane. Nat Rev Microbiol. 2022;20(4):236. doi:10.1038/S41579-021-00638-0
- 53. Mohd Yusof H, Abdul Rahman N, Mohamad R, Hasanah Zaidan U, Samsudin AA. Antibacterial potential of biosynthesized zinc oxide nanoparticles against poultry-associated foodborne pathogens: an in vitro study. *Animals*. 2021;11(7):2093. doi:10.3390/ani11072093
- 54. Kim J, Kang SH, Choi Y, et al. Antibacterial and biofilm-inhibiting cotton fabrics decorated with copper nanoparticles grown on graphene nanosheets. *Sci Rep.* 2023;13(1):1–11. doi:10.1038/s41598-023-38723-4

- 55. Gudkov SV, Burmistrov DE, Serov DA, Rebezov MB, Semenova AA, Lisitsyn AB. A Mini Review of Antibacterial Properties of ZnO Nanoparticles. *Front Phys.* 2021;9:49. doi:10.3389/fphy.2021.641481
- 56. Bedlovičová Z, Strapáč I, Baláž M, Salayová A. A Brief Overview on Antioxidant Activity Determination of Silver Nanoparticles. *Molecules*. 2020;25(14):3191. doi:10.3390/MOLECULES25143191
- 57. Metryka O, Wasilkowski D, Mrozik A. Evaluation of the Effects of Ag, Cu, ZnO and TiO2 Nanoparticles on the Expression Level of Oxidative Stress-Related Genes and the Activity of Antioxidant Enzymes in Escherichia coli, Bacillus cereus and Staphylococcus epidermidis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9):4966. doi:10.3390/IJMS23094966/S1
- 58. Liu W, Worms I, Slaveykova VI. Interaction of silver nanoparticles with antioxidant enzymes. *Environ Sci Nano*. 2020;7(5):1507–1517. doi:10.1039/C9EN01284B
- Wu S, Altenried S, Zogg A, Zuber F, Maniura-Weber K, Ren Q. Role of the Surface Nanoscale Roughness of Stainless Steel on Bacterial Adhesion and Microcolony Formation. ACS Omega. 2018;3(6):6456–6464. doi:10.1021/ACSOMEGA.8B00769/SUPPL\_FILE/AO8B00769\_SI\_001.PDF
- 60. Xiang E, Moran CS, Ivanovski S, Abdal-hay A. Nanosurface Texturing for Enhancing the Antibacterial Effect of Biodegradable Metal Zinc: surface Modifications. *Nanomaterials*. 2023;13(13):2022. doi:10.3390/NANO13132022/S1
- 61. Preda VG, Săndulescu O. Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. *Discoveries*. 2019;7(3):e10. doi:10.15190/d.2019.13
- 62. IX Y, Zhang J, IS Z, Mei ML, Li Q, Chu CH. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int J Nanomed*. 2020;15:2555–2562. doi:10.2147/IJN.S246764
- 63. Jang J, Choi Y, Tanaka M, Choi J. Development of silver/graphene oxide nanocomposites for antibacterial and antibiofilm applications. *J Ind Eng Chem.* 2020;83:46–52. doi:10.1016/J.JIEC.2019.11.011
- 64. Codiță I, Caplan DM, Drăgulescu EC, et al. Antimicrobial activity of copper and silver nanofilms on nosocomial bacterial species. *Roum Arch Microbiol Immunol.* 2010;69(4):204–212.

Nanotechnology, Science and Applications

**Dove**press

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

# 1 Supplementary materials

## 2 Stability of Nanocomposites

- 3 The stability of nanocomposites were assessed by measurements of zeta potential by
- 4 electrophoretic light scattering (ELS) over time 0, 8, 12, 24 and 48h using a Zeta Sizer Nano-
- 5 ZS90 analyzer (Malvern Instruments, Malvern, UK) quadruplicate, at room temperature.



6

7 Figure S1 Zeta potentials of nanocomposites in time. All measurements were performed four

8 times. Zp is the mean value of each sample's zeta potential.

## 9 Chemical analysis of nanocomposites formed

10 Chemical analysis of nanocomposites was performed using a Quanta 250 FEG FEI scanning 11 electron microscope with an energy dispersive X-ray (SEM-EDX) detector. Nanocomposites were 12 centrifuged (12 000 rpm, 10 mins) and the supernatant was separated from the pellets. The 13 pellets were suspended in ultrapure water. Then, the droplets (0.05-0.1 µL) of hydrocolloids were 14 placed 10x on the Silicon Wafer (Siegert Wafer, Wafer Specialist) and dried successively in a 15 vacuum-dried Vacucell 55 (MMM Group) at 30°C. The following parameters were used: spot 4.5, 16 20 kV.

17

	20	Table S1	EDX anal	ysis of create	d nanocomp	osites:	GOAg,	GOCu,	GOZnO.
--	----	----------	----------	----------------	------------	---------	-------	-------	--------

GOAg							
supernatnat			pellet				
Element	Weight %	Atomic %	Element	Weight %	Atomic %		
СК	20.97	38.12	СК	8.62	16		
ОК	0.93	1.27	ОК	43.8	61.05		
SiK	77.89	60.56	SiK	22.33	17.73		
AgL	0.21	0.04	AgL	25.26	5.22		

GOCu							
supernatnat			pellet				
Element	Weight %	Atomic %	Element Weight Ator				
СК	22.01	39.23	СК	12.77	21.15		
ОК	2.73	3.65	ОК	38.02	47.29		
SiK	74.68	56.92	SiK	40.86	28.95		
CuK	0.58	0.19	CuK	8.35	2.62		

GOZnO							
supernatnat			pellet				
Element	Weight %	Atomic %	Element	Weight %	Atomic %		
СК	16.43	31.48	СК	22.34	40.26		
ОК	0.83	1.19	ОК	31.53	42.65		
SiK	81.75	66.98	SiK	4.16	3.2		
ZnK	0.99	0.35	ZnK	41.97	13.89		

# 24 Bacterial biofilm formation

25 Section completely described in the main manuscript.



- **Figure S2** Z-stack images (confocal microscopy visualization) of biofilm structure of *S. aureus*, *S.*
- *enterica*, and *P. aeruginosa* created on the surface of nanofilms.
mgr inż. Agata Lange agata\_lange1@sggw.edu.pl

> Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Agata Lange, Marta Kutwin, Katarzyna Zawadzka, Agnieszka Ostrowska, Barbara Strojny-Cieślak, Barbara Nasiłowska, Aneta Bombalska, Sławomir Jaworski. 2024; Impaired Biofilm Development on Graphene Oxide-Metal Nanoparticle Composites. *Nanotechnology, Science and Applications* 17: 303-320." mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: zaplanowaniu wykonywanych badań oraz opracowaniu metodyki i analizie uzyskanych wyników, wykonaniu analiz (analizy fizykochemiczne: pomiar potencjału zeta i średnicy hydrodynamicznej; analizy biologiczne: analiza indukcji reaktywnych form tlenu, analiza całkowitej zdolności przeciwutleniającej, analiza biofilmu: ilościowa za pomocą barwienia fioletem krystalicznym oraz ilościowa i jakościowa za pomocą mikroskopii konfokalnej, przygotowanie prób biofilmu do skaningowej mikroskopii elektronowej) oraz opracowaniu uzyskanych danych przedstawionych w manuskrypcie oraz suplemencie i ich wizualizacji, a także na przygotowaniu i redakcji manuskryptu.

Agaile Lange Podpis

Dr Marta Kutwin marta kutwin@sggw.edu.pl

> Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

## Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Agata Lange, Marta Kutwin, Katarzyna Zawadzka, Agnieszka Ostrowska, Barbara Strojny-Cieślak, Barbara Nasiłowska, Aneta Bombalska, Sławomir Jaworski. 2024; Impaired Biofilm Development on Graphene Oxide-Metal Nanoparticle Composites. *Nanotechnology, Science and Applications* 17: 303-320." mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w opracowaniu metodyki i wykonywaniu analiz fizykochemicznych oraz wsparciu w redakcji manuskryptu.

Marte Untur

Podpis

Mgr inż. Katarzyna Zawadzka katarzyna\_zawadzka1@sggw.edu.pl

> Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

# Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Agata Lange, Marta Kutwin, Katarzyna Zawadzka, Agnieszka Ostrowska, Barbara Strojny-Cieślak, Barbara Nasiłowska, Aneta Bombalska, Sławomir Jaworski. 2024; Impaired Biofilm Development on Graphene Oxide-Metal Nanoparticle Composites. *Nanotechnology, Science and Applications* 17: 303-320." mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w opracowaniu metodyki i wykonywaniu analiz z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej oraz wsparciu w redakcji manuskryptu.

Kalay Sacale Podpis

Dr inż. Agnieszka Ostrowska agnieszka ostrowska@sggw.edu.pl

> Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

## Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Agata Lange, Marta Kutwin, Katarzyna Zawadzka, Agnieszka Ostrowska, Barbara Strojny-Cieślak, Barbara Nasiłowska, Aneta Bombalska, Sławomir Jaworski. 2024; Impaired Biofilm Development on Graphene Oxide-Metal Nanoparticle Composites. *Nanotechnology, Science and Applications* 17: 303-320." mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w opracowaniu mętodyki i wykonywaniu analiz z użyciem skaningowej mikroskopii elektronowej oraz wsparciu w redakcji manuskryptu.

A. anowlen

Podpis

Dr hab. Sławomir Jaworski, prof. SGGW slawomir\_jaworski@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

## Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy "Agata Lange, Marta Kutwin, Katarzyna Zawadzka, Agnieszka Ostrowska, Barbara Strojny-Cieślak, Barbara Nasiłowska, Aneta Bombalska, Sławomir Jaworski. 2024; Impaired Biofilm Development on Graphene Oxide-Metal Nanoparticle Composites. *Nanotechnology, Science and Applications* 17: 303-320." mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: zaplanowaniu wykonywanych badań, pomocy w opracowaniu metodyki i wykonywaniu analiz, nadzorze przeprowadzonych analiz oraz redakcji manuskryptu.

Javoist

Podpis