

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій  
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**на тему**

«Зелений синтез наночасток срібла за допомогою *Saccharomyces cerevisiae* та дослідження їх біологічних властивостей»

Рівень вищої освіти: другий (магістерський)

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Біотехнологія високомолекулярних сполук

Виконала: студентка 2 групи МГБТ-22

Кудіна С.В.

Науковий керівник: к.б.н., доц. Шидловська О.А.

Рецензент: к.т.н., доц. Волошина І.М.

Київ 2023

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Рівень вищої освіти:	<u>другий (магістерський)</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія високомолекулярних сполук</u>

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри БШХ

\_\_\_\_\_ Олена МОКРОУСОВА  
« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 р.

**ЗАВДАННЯ  
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ  
Кудиній Софії Володимирівні**

1. Тема кваліфікаційної роботи: **Зелений синтез наночасток срібла за допомогою *Saccharomyces cerevisiae* та дослідження їх біологічних властивостей**

Науковий керівник роботи Шидловська Ольга Андріївна, к.б.н., доц.  
затверджені наказом КНУТД від «12» вересня 2023 року №210-уч.

2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу; наукова література щодо властивостей зелених наночасток срібла та використання дріжджів для її синтезу, експериментальні дані щодо синтезованих за допомогою *S. cerevisiae* наночасток срібла та їх фізико-хімічних та біологічних характеристик; матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.

3. Зміст кваліфікаційної роботи: вступ, огляд літератури, матеріали і методи дослідження, результати дослідження, висновки, список використаних джерел, додатки.

4. Дата видачі завдання 12.09.2023 р.

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапу кваліфікаційної роботи	Орієнтовний терміни виконання	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1 Огляд літератури		
3	Розділ 2 Матеріали і методи дослідження		
4	Розділ 3 Результати дослідження		
5	Висновки		
6	Оформлення кваліфікаційної роботи (чистовий варіант)		
7	Подача кваліфікаційної роботи науковому керівнику для відгуку (за 14 днів дозахисту)		
8	Подача кваліфікаційної роботи для рецензування (за 12 днів дозахисту)		
9	Перевірка кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		
10	Подання кваліфікаційної роботи на підпис завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

З завданням ознайомлений:

Студентка \_\_\_\_\_ Софія КУДІНА

Науковий керівник роботи \_\_\_\_\_ Ольга ШИДЛОВСЬКА

## АНОТАЦІЯ

Кудіна С.В. Зелений синтез наночасток срібла за допомогою *Saccharomyces cerevisiae* та дослідження їх біологічних властивостей. – Рукопис.

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2023 рік.

У кваліфікаційній роботі описано технологію зеленого синтезу наночастинок срібла за допомогою *Saccharomyces cerevisiae* Y-1995 та Y-530, досліджено їх властивості, антибактеріальна та антиадгезивна дія.

Експериментально доведено антибактеріальну дію з дріжджових лізатів та супернатантів *Saccharomyces cerevisiae* Y-1995 та *Saccharomyces cerevisiae* Y-530. Антибактеріальна та антиадгезивна дія перевірена на референтних штаммах умовно-патогенних *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* та представників нормофлори людини *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*.

Кваліфікаційна робота включає обговорення результатів та обґрунтування виявленої проблематики та способи попередження агрегації (агломерації), ураження наночастками срібла штамів нормофлори людини.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, наночастинки срібла, антибактеріальна дія, антиадгезивна дія, *Escherichia coli*, *Lactobacillus*.



## ABSTRACT

Kudina S.V. Green synthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae* and study of their biological properties. – Manuscript.

Qualification work in the specialty 162 - Biotechnology and bioengineering - Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2023.

The qualification work describes the technology of green synthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae* Y-1995 and Y-530, investigates their properties, antibacterial and antiadhesive effects.

The antibacterial effect of yeast lysates and supernatants of *Saccharomyces cerevisiae* Y-1995 and *Saccharomyces cerevisiae* Y-530 was experimentally proved. The antibacterial and antiadhesive effects were tested on reference strains of conditionally pathogenic *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and representatives of human normoflora *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*.

The qualification work includes a discussion of the results and justification of the identified problems and ways to prevent aggregation (agglomeration), damage by silver nanoparticles to human strains of normoflora.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, silver nanoparticles, antibacterial effect, antiadhesive effect, *Escherichia coli*, *Lactobacillus*.

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	8
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1 Теорія наноматеріалів. Синтез наночасток .....	11
1.2 Зелений синтез наночасток срібла з використанням бактерій .....	15
1.3 Біогенний синтез наночасток за допомогою рослин .....	17
1.4 Зелений синтез наночасток срібла з використанням дріжджів .....	19
1.5 Антибактеріальна дія .....	21
1.6 Протигрибкова дія.....	23
1.7 Антиоксидантна дія біогенних наночасток срібла .....	26
1.8 Протипухлинна дія.....	28
1.9 Антивірусна дія .....	31
Висновки до розділу 1 .....	32
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	34
2.1 Характеристика об'єктів дослідження.....	34
2.1.1 Загальний опис дріжджів <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	34
2.1.2 Фізіологічні та біохімічні властивості <i>S. cerevisiae</i> .....	36
2.2 Характеристика предмету дослідження .....	39
2.3 Методика синтезу наночасток срібла за допомогою <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y-1995 та Y-530.....	41
2.4 Методика визначення концентрації іонів срібла .....	41
2.5 УФ-спектрофотометричний метод дослідження наночасток .....	42
2.6 Характеристика синтезованих наночасток срібла.....	42
2.7 Дослідження антибактеріальної та антиадгезивної дії синтезованих наночастинок срібла .....	43
2.8 Статистичний аналіз результатів дослідження.....	44
Висновки до розділу 2 .....	45

	7
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	46
3.1 Результати визначення концентрації іонів срібла .....	46
3.2 Аналіз утворених наночастинок срібла за допомогою УФ- спектрофотометрії.....	47
3.3 Аналіз розмірів та форми наночастинок срібла.....	48
3.4 Антибактеріальна дія синтезованих наночастинок .....	55
3.5 Антиадгезивна дія наночастинок срібла на обрані штами бактерій.....	60
Висновки до розділу 3 .....	65
ВИСНОВКИ.....	67
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	68
ДОДАТКИ .....	81

## ВСТУП

**Актуальність теми дослідження.** Підвищення резистентності бактерій до антибіотиків визнано Всесвітньою організацією охорони здоров'я як глобальну загрозу у 2014 році. Часте та неконтрольоване застосування антибіотиків знижує їх ефективність та призводить до формування суперінфекцій, від яких може не бути ліків, тому можливе лише хірургічне втручання. Ця ситуація змусила людство шукати більш безпечні, менш токсичні альтернативи антибіотикам.

Такою альтернативою можуть бути металеві наночастинки. Вони добре вивчені і мають широкий спектр методів їх синтезу. Крім того, можуть бути використані відходи металургійної та хімічної промисловості у вигляді оксидів чи солей металів.

Серед перспективних металів для синтезу наночастинок слід відзначити срібло, що має антибактеріальні властивості, які були визначені ще з давніх часів.

**Мета дослідження** полягає у синтезі наночастинок срібла за допомогою зеленого методу з використанням *Saccharomyces cerevisiae* та дослідження їх біологічних властивостей.

Для досягнення поставленої мети, були сформувані **такі завдання:**

– провести зелений синтез наночастинок срібла з використанням лізату та супернатанту *Saccharomyces cerevisiae* та дослідити основні фізико-хімічні характеристики;

– дослідити антибактеріальні та антиадгезивні властивості отриманих наночастинок на *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii*

**Об'єкт дослідження** – синтез наночастинок срібла за допомогою зеленого синтезу з використанням *Saccharomyces cerevisiae*.

**Предмет дослідження** – біологічні властивості наночастинок срібла, отриманих зеленим синтезом з використанням *Saccharomyces cerevisiae*.

**Практичне значення.** Практичне значення роботи полягає в розробці дешевого та простого методу отримання наночасток срібла з використанням лізату або надосаду дріжджів *S. cerevisiae* для отримання ефективних агентів для антибактеріальної терапії.

**Наукова новизна.** Біогенний синтез наночасток є екологічно чистим методом. В даній роботі використали простий та доступний біологічний агент для синтезу та укупорки наночасток срібла – дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*. Наукова новизна полягає в тому, що нами було використано простий і дешевий спосіб отримання наночасток срібла, що володіють яскравими антибактеріальними та антиадгезивними властивостями. Більше того, нами було встановлено позитивні ефекти на розвиток мікрофлори людини, що більш глибого розкриває потенціал використання зелених наночасток срібла у медицині та фармцевтиці.

**Апробація** результатів дослідження відбулася в рамках науково-практичної міжнародної дистанційної конференції «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині» (м. Харків, 24 березня 2023 року). На конференції була представлена доповідь за темою «Дослідження біологічної дії наночасток срібла отриманих методом зеленого синтезу» (додатки А і Б).

#### **Публікації:**

– тези: Кудіна С. В., Шидловська О. А. Дослідження біологічної дії наночасток срібла отриманих методом зеленого синтезу. Науково-практична міжнародна дистанційна конференція «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині» (Харків, 24 березня 2023 року). Харків, Національний фармацевтичний університет, кафедра мікробіології, вірусології та імунології, 2023. С. 158-160 (додатки А і Б);

– стаття: Кудіна С.В. Шидловська О.А. Властивості наночастинок срібла синтезованих на грибах. Modernization of today's science: experience and trends: collection of scientific papers «SCIENTIA» with Proceedings of the IV International

Scientific and Theoretical Conference. Singapore, Republic of Singapore, 2023. P. 55-61  
(додатки В і Д).

**Структура та обсяг роботи.** Кваліфікаційна робота складається зі вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел (102 найменування) та додатків. Загальний обсяг магістерської роботи складає 66 сторінок комп'ютерного тексту.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1 Теорія наноматеріалів. Синтез наночасток

Прогрес сучасної медицини завдячує відкриттю антибіотиків, наприклад сальварсан (1910) та початок золотої епохи натуральних антибіотиків з пеніциліном (1928) [1]. Відтоді активне використання препаратів призвело до поширення проблеми антибіотикорезистентності. Проблема полягає в тому, що знижується громадське здоров'я у глобальному масштабі, тим самим привертаючи увагу міжнародних організацій. На фоні цього у 2014 році Всесвітня організація охорони здоров'я визнала це явище як глобальну загрозу здоров'ю [2]. За сучасними прогнозами спостерігається підвищення смертності від бактеріальних захворювань [3].

Було знайдено новий підхід до боротьби з стійкістю бактерій, а саме застосування наноматеріалів. НМ можуть діяти різними бактерицидними шляхами, зумовлюючи виклик для бактерій щоб вижити. Всі шляхи залежать від хімічного складу, форми та розміру НМ. Вони можуть бути у вигляді ліпосом, полімерів, оксидів металів срібла, цинку, золота, міді [4]. Існують екологічно безпечні НМ, що руйнують бактеріальну мембрану, тим самим відкривають шлях на використання методів боротьби як хімічна кон'югація, адсорбція або фізичний метод інкапсуляції. Однак варто зазначити що ці шляхи залежать від хімічного складу, розміру та форми наноматеріалів [5].

Наноматеріали класифікуються з різними ознаками:

- на основі функціоналізації: голі НЧ (оксиди металів), НЧ з покриттям (нанодроти, нанотрубки, нанострижні);
- на основі морфології поверхні: високе співвідношення сторін (нанодроти, нанотрубки, нанострижні), низьке співвідношення сторін (суспензія, колоїди, порошки);

- за хімічною природою: органічні (полімери, ліпосоми, міцели), неорганічні (композитні матеріали, сплави, напівметали, оксиди металів, оксиди напівметалів);
- за фізико-хімічними властивостями: на основі ліпідів, вуглецю, металеві НМ, полімерні НМ (наноккомпозити, нанокапсули, наносфери), керамічні НМ (оксид алюмінію, оксид цирконію);
- на підставі розмірності: нуль-вимірні фулеренові кластери, квантові точки, порожнисті сфери, одновимірні нанодроти, нанотрубки, нановолокна, нанострижні, двовимірні нанодиски, наноплівки, нанопшарика;
- за походженням: природні, антропогенно спроектовані, випадкові;
- на основі магнітних властивостей: парамагнітні (оксид заліза, сульфід кадмію), діамагнітні (оксид титану, ферит магнію);
- на основі кристалічності: аморфні НМ, кристалічні однорозширені структури, багатопротяжні доменні структури полікристалічних НМ [6].

Проникнення НМ невід'ємно пов'язане з властивостями мікробної мембрани. В основному бактерії класифікуються на грампозитивні та грамнегативні. Грампозитивні мають досить товстий шар пептидоглікану (15-100 нм) з включеними теохевими кислотами і цитоплазматичною мембраною під ним. Техоеві кислоти мають полімерну структуру з фосфатами у складі, що відповідають за негативний заряд та потрібні для зв'язування двовалентних катіонів. У той час як грамнегативні складаються з цитоплазматичної мембрани, тонкого шару пептидоглікану (20-50 нм) та додатково захищена подвійним гідрофобним шаром із ліпополісахаридів. Додатковий шар має властивість знижувати проникну здатність гідрофобних антибактеріальних агентів, наприклад миючих засобів [7]. Саме структура мембрани грає вирішальну роль щодо взаємодії НМ з бактеріями.

В ранніх дослідженнях було продемонстровано явище електростатичної взаємодії між позитивно зарядженим нанозолотом у стрижнях або наносферах та негативно зарядженими частинами теохевої кислоти бактерій. Дослід показав, що ці



наносфери рівномірно розподілились між грампозитивними *B. cereus* [8]. Це явище пояснюється електростатичною взаємодією між позитивно зарядженим наноматеріалом та негативно зарядженими техногенними кислотами на бактерії. Різноманітні дослідження показали, що специфічна дія НМ може утворити пухирці, каналці та інші пошкодження мембрани.

Антимікробний вплив НМ має своєрідний механізм у порівнянні з антибіотиками. Лікувальна дія більшості антибіотиків спрямована на пригнічення життєдіяльності клітини, на перешкоджання експресії білків та реплікації ДНК. Проте збудники можуть мати здатність подолати ці механізми. Наприклад, зміна структури рибосом надає стійкість до тетрацикліну [9]. Протилежним прикладом є *Chlamydophila pneumoniae*, яка зберігає свої компартменти всередині клітин-господарів, аби уникнути впливу антибіотиків, які переважно локалізуються поза клітиною [10].

Пізнші дослідження підтвердили вище вказані можливості НЧ. Частинки розміром менше 20 нм можуть проникати усередину клітини та шкодити біохімічним процесам, руйнуючи клітину зсередини [11]. Поєднання біогенних наночастинок з флавоноїдами природного походження пригнічують ферментативну активність генетичного апарату клітини деяких мікроорганізмів [12]. Окремі НЧ генерують активні форми кисню, що механічно пошкоджують клітинну стінку бактерій [13]. Економічність та екологічність підтвердилась можливістю повторно перероблювати НЧ та знову використовувати їх антимікробну дію [14]. Через наявність таких властивостей та різноманітності шляхів дії НЧ мікробам важче пристосуватись [15].

На жаль точний механізм дії наночастинок з металів та оксидів металів ще не ясний. Дослідження у цій сфері ще проводяться. На даний момент ясно, що основний удар від наночастинок вільного металу йде ззовні, виявляє токсичну дію на мембрану, розчиняючи, пошкоджуючи її зовнішні шари, а оксиди металів індукують окислювальний стрес активними формами кисню [16].

НЧ Ag створюють прогалини та ямки у поверхні мембран бактерій шляхом виділення іонів, які реагують з дисульфідними або сульфгідрильними групами ферментів, провокуючи переривання метаболічного шляху та загибель клітини [17]. Схожі принципи взаємодії властиві наночасткам ZnO, TiO<sub>2</sub> [17]

Цікавим є вплив аеробного та анаеробного середовища. Так НЧ срібла ефективніше протидіяли анаеробним клітинам *E. Coli* при достатній кількості доступного кисню. Протилежна ситуація, коли кисню було недостатньо і токсичність срібла була меншою. Відповідно дослідження показали, що мінімально інгібуюча концентрація була вищою для анаеробів, ніж для аеробів. Значення МІК для анаеробних *F. nucleatum*, *S. sanguis* і *S. mutans* становили 25, 50 і 50 мг/мл, а для аеробних бактеріальних штамів він становив 6 мг/мл [19]. Можемо зробити висновок, що доступність кисню є важливою запорукою контролю токсичності наночасток.

Синтез наночастинок може проводитись методами, що загалом поділяються на дві основні групи: підхід «знизу вгору» та підхід «зверху вниз».

Низхідний метод полягає в тому, що більші молекули розкладаються на менші одиниці, а потім повинні перейти до відповідних НЧ. До цього принципу належать методи подрібнення, фізичне осадження з парової фази, тощо [20]. Підхід подрібнення використовувався для синтезу наночасток з кокосової шкаралупи (КШ). Для цього використовувались сирі порошки КШ, які тонко подрібнювались протягом певні проміжків часу за допомогою керамічних куль та планетарного млина. Експеримент показав, що чим довше проводилось подрібнення, тим меншим був розмір наночастинок, згідно рівняння Шерера. Окрім того, стало зрозуміло як з кожною годиною інтенсивність коричневого забарвлення зменшувалась. Ці показники узгоджувались з рентгенівською картинкою, яка також показувала зменшення розміру НЧ [20].

Прикладами висхідного підходу синтезу наночасток є методи седиментації та відновлення. До них відносяться золь-гель, зелений синтез та біохімічний синтез [39].

Нас же цікавить саме висхідний зелений синтез. Він приваблює меншою токсичністю, економічною ефективністю та є безпечним для екології навколишнього середовища. Синтез НЧ проводиться завдяки біооб'єктам, таким як бактерії, рослинні екстракти, дріжджі, гриби, та навіть людські клітини.

## 1.2 Зелений синтез наночастинок срібла з використанням бактерій

Бактерії є окремим методом синтезу наночастинок. Синтез бактеріями відбувається позаклітинним та внутрішньоклітинним шляхом. Позаклітинним методом вважається більш простішим, оскільки не потребує додаткових маніпуляцій з вмістом клітин [22]. При умові зовнішнього синтезу, відбувається виділення ферментів. Бактерії мають фермент редуктазу, який активує відновлення іонів металів до наночастинок [23]. Внутрішньоклітинний метод починається, коли іони металів проходять через іонні канали, через активний транспорт або проникнення через мембрану, тобто складається з відлову, біоредукції та складання певних наночастинок, в залежності від мети [24].

Наведемо деякі приклади бактеріального синтезу в Таблиці 1.1:

Таблиця 1.1.

Загальна характеристика бактеріальних продуцентів наночастинок

Штам	Спосіб визначення	Розмір	Форма	Грам/Грам <sup>+</sup>	Посилання
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	UV-vis, TEM, FTIR, DLS	9.96–22.7 нм	Сфера	Грам <sup>+</sup>	[25]
<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ,	UV, TEM, EDS	28.2–122 нм	Не визначено	Грам <sup>+</sup> та Грам <sup>-</sup>	[26]
<i>Morganella morganii</i> RP42	UV, TEM, XRD, SAED	10–50 нм	Квазісфера	Грам <sup>-</sup>	[27]
<i>Escherichia coli</i>	UV, FTIR, XRD	В середньому 50 нм	Сфера	Грам <sup>-</sup>	[28]

<i>Pseudomonas antarctica</i> , <i>P. proteolytica</i> , <i>P. meridiana</i> , <i>Arthrobacter kerguelensis</i> , <i>Bacillus indicus</i> , <i>B. cecembensis</i>	UV, TEM, AFM	TEM (6.1±2.8 нм), AFM (4.6– 13.3 нм)	Сфера	Грам <sup>+</sup> та Грам <sup>-</sup>	[29]
<i>Staphylococcus aureus</i>	UV, AFM	160–180 нм	Неправильна	Грам <sup>+</sup>	[30]
<i>Bacillus brevis</i> (NCIM 2533)	UV-vis, SEM, FTIR, AFM, TLC	SEM (22–60nm, в серед. 41 nm), AFM (в середньому 68 nm)	Сфера	Грам <sup>+</sup>	[31]

Скорочення до Таблиці 1: UV-vis ультрафіолетово-видима (спектроскопія); TEM, просвічуюча електронна мікроскопія; SEM, скануюча електронна мікроскопія; FESEM, автоемісійний SEM; HRSEM, TEM високої роздільної здатності; XRD, рентген; FTIR, інфрачервоне перетворення Фур'є (спектроскопія); ACM, атомно-силова мікроскопія; HPLC, високоефективна рідинна хроматографія; DLS, динамічне розсіювання світла; EDX, енергодисперсійне рентгенівське випромінювання (спектроскопія); EDAX, ED X-ray аналіз; SAED, дифракція електронів вибраної області; TGA, термогравіметричний аналіз; TLC, тонкошарова хроматографія.

Бактерії вважаються перспективними кандидатами для екологічно чистого шляху синтезу. Компоненти клітинної стінки бактерій діють синергетично, щоб здійснити відновлення [32]. В одному з таких досліджень [33] 6 штамів *Enterococcus*, виділені з ферментованих харчових продуктів були використані для генерації наночастинок. Для цього приготували поживний бульйон, стерилізували та засіяли добовими ізолятами, культивували при 37°C протягом 72 годин. Після інкубації проводили центрифугування при 4 тис. об/хв при 10°C протягом 15 хвилин. Їх супернатанти використовували для синтезу НЧ Ag без подальшого очищення. Для синтезу 1 мл супернатанту було додано на 10 мл 1 мМ нітрату срібла (AgNO<sub>3</sub>).

Морфологію та розміри частинок досліджували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEM-1400 (JEOL, США) при 200 кВ. Антимікробну активність НЧ Ag проводили за допомогою методу дифузії в агарі, використовуючи клінічні ізоляти. Ці НЧ мали антимікробну активність проти мультирезистентних

видів, таких як *E. coli*, *K. pneumoniae*, та *P. vulgaris*. Крім того, ці НЧ показали синергетичну антимікробну активність з ампіциліном, ципрофлоксацином і цефуроксимом.

В іншому дослідженні синтезували НЧ Ag з використанням бактерії *Bacillus cereus*. Отримані наночастинки являли собою сферичні НЧ Ag з розміром 20–40 нм. Дослідження також продемонстрували, що синтезовані НЧ мають підвищену активність проти патогенних видів бактерій, таких як *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* [34].

Однак є кілька недоліків опосередкованого мікробного синтезу НЧ. Цей метод виглядає менш доцільним для промислового застосування, оскільки мікробні клітини потребують надзвичайно специфічного середовища для оптимального росту. Було також виявлено деяку резистентність мікроорганізмів до іонів Ag. Водночас цей недолік є й перевагою для синтезу, різний ступінь стійкості мікробів залежно від штаму. Така стійкість сприяє синтезу НЧ Ag у високій концентрації без знищення мікробних клітин. Як правило, зі збільшенням концентрації швидкість загибелі клітин збільшується [35].

### 1.3 Біогенний синтез наночасток за допомогою рослин

Синтез рослинами має перевагу у тому що, кількість отриманого продукту є більшою у порівнянні з бактеріальним способом. Рослини мають метаболіти, які можуть виступати як стабілізатори, так і відновники (наприклад, поліфеноли). Також такий синтез є більш стабільним, нетоксичним та екологічним у порівнянні з бактеріями та грибами [36]. Шляхи синтезу також буває внутрішньоклітинним, позаклітинним та завдяки фітохімічним сполукам. Внутрішньоклітинний синтез відбувається шляхом утилізації клітинних ферментів та розривом клітинної стінки рослини. Позаклітинний метод береться до уваги, коли рослинний екстракт використовується як сировина для НЧ [37]. Фітохімічний метод використовується рідко, він потребує конкретних знань про синтез стабільних наночастинок [38]. Таким

методом було синтезовано сферичні наночастки Ag з листя *A. indica*. Дослідження цих НЧ показало, що флавоноїди та фітохімічні речовини працювали як відновник та стабілізатор, а самі частки мали сильну антимікробну дію [39].

Для синтезу підходять різні частини рослин: листя, стебло, кора, коріння, плоди та квіти. Широкий спектр потрібних фіторечовин мають рослинні екстракти алое вера, екстракти плодів *Mangifera indica*, листя *Murraya koenigii*. Рослинна глюкоза також використовувалася для синтезу НЧ Ag разом з появою стабілізуючих агентів, таких як розчинний крохмаль, сахароза і мальтоза. Навіть шкаралупа арахісу була випробувана для синтезу наночастинок зеленого срібла. Спеції також використовуються, наприклад, екстракт листя перцю, експеримент був описаний в [40] як приклад зеленого синтезу наночастинок.

У Таблиці 1.2 наведені приклади використання рослинних матеріалів та фізичні властивості синтезованих наночастинок:

Таблиця 1.2.

Загальна таблиця рослин-продуцентів наночастинок

Назва рослини	Форма/розмір НЧ	Антимікробна дія визначена на:	Метод	Джерело
<i>Elephantopus scaber</i>	37 нм/сфера	<i>B. subtilis</i> , <i>L. lactis</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. penicillioides</i>	Метод дифузії в агарі	[41]
Green and black tea	10-20 нм/сфера	Метицилін- і ванкоміцин-резистентний <i>S. aureus</i>	Методи дискової дифузії та бульйонного розведення	[42]
<i>Piper nigrum</i>	4-50 нм/шестикутні та сферичні	Збудники хвороб рослин: <i>C. freundii</i> та <i>E. cacticida</i>	Метод дифузії в агарі	[43]
<i>Spirogyra varians</i>	35 нм/квазі-сфера	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. enterica typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Klebsiella</i>	Методи агарової дифузії та макророзведення бульйону	[44]

Для наочності розберемо експеримент з зеленим та чорним чаєм [42]. Наночастинки були синтезовані шляхом додавання екстрактів до 1 ммоль/л водного розчину  $\text{AgNO}_3$  з об'ємним співвідношенням 9:1. Ці суміші безперервно перемішували при кімнатній температурі і залишали на 24 години при кімнатній температурі в темряві, щоб уникнути фотоактивації  $\text{AgNO}_3$ , і розділяли за допомогою центрифугування при 10 тис. об/хв протягом 10 хвилин, промивали три рази деіонізатором води, видалити незв'язані біомолекули. Сушили при  $65^\circ\text{C}$  3 години.

Аналіз отриманих НЧ, а саме морфологію та розміри, проводили за допомогою аналізу SEM (електронна мікроскопія). Дослідження антимікробної та антигрибкової дії показало хорошу ефективність проти *Staphylococcus aureus* та *Aspergillus flavus*.

Значно вища безпека, стабільність та біосумісність, пояснюється тим що, синтезовані наночастки покриті нетоксичними біомолекулами. Вчені виявили, що поліфеноли, які можуть надати антиоксидантну дію [40]. Однак інші дослідження показали, що метаболіти рослинних екстрактів, білки та хлорофіл, діють як блокатори синтезованих НЧ Ag [45, 46, 47].

#### 1.4 Зелений синтез наночасток срібла з використанням дріжджів

Цей спосіб синтезу є маловивченим, однак він має перевагу у порівнянні з бактеріальним синтезом, а саме завдяки простішому набору біомаси, легким режимом культивування, високим синтезом метаболітів та толерантністю до металів, які легко зв'язуються з їх мембраною. Мікроскопічні гриби вважаються простим, стабільним методом.

Ферменти мають велику роль при синтезі наночасток. Наприклад, редуктаза з *Penicillium sp.*, нітратредуктаза та НАДФН-редуктази з *Fusarium oxysporum* разом з хінонами було виявлено, що редуктаза діяла внутрішньоклітинно, а НАДФН-редуктаза, залежна від нітратредуктази, і відповідає за перенесення електронів при синтезі НЧ [48]. Внутрішньоклітинне утворення металевих НЧ відбувається шляхом відновлення солей металів, яке може відбуватися в три етапи, тобто пасивна дифузія

солей металів, присутніх у водному розчині, видалення позаклітинних солей з подальшим відновленням, опосередкованим транспортом відновлювальних реагентів у клітини [49].

Дріжджові клітини можуть індукувати біомінералізацію, яка є основним механізмом утворення НЧ [50]. Через сильні нуклеофільні та окисно-відновні властивості хінони також можуть відновлювати іони металів, перетворюючи їх на НЧ [51].

Також однією з переваг використання дріжджових клітин – це простий механізм інкапсуляції. Дріжджові клітини є біомакромолекулярними мікрочастинками, що мають оболонку, що складається з хітину, глікопротеїнів і  $\beta$ -глюканів, а з іншого боку, вони є мікрокапсулами з плазматичною мембраною, яка допомагає в інкапсуляції НЧ [52].

Основною метою біосинтезу НЧ є усунення токсичності НЧ за допомогою механізмів клітинного захисту за допомогою таких сполук, як фітохелатини (ФХ) і глутатіон, які можуть не тільки зв'язувати іони металів, але й виявляти унікальні окисно-відновні та нуклеофільні властивості, необхідні для біовідновлення металу іони [53]. Також поверхня дріжджів містить аспаргінову та глутамінову амінокислоти, які при дії світла відновлюють іони срібла до металевого срібла при достатній кількості світла (фотовідновлення) [54].

*Saccharomyces cerevisiae*, відомі як «пекарські дріжджі», можуть проживати у різноманітних екологічних нішах, вони поширені по всьому світі. *S. cerevisiae* є одними з найкраще вивчених видів дріжджів. Вони застосовуються для бродіння хліба, вина, квасу або пива. Широке застосування, легкий контроль, нетоксичність, просте поживне середовище робить їх привабливими для синтезу наночасток.

При огляді наукових статей було знайдено дослідження з даним видом дріжджів. У експерименті [55] використано три штами дріжджових грибів, а саме *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula glutinis* і *Geotrichum candidum* для позаклітинного біосинтезу НЧ Ag (2,5–20 нм) шляхом прямого впливу розчину



AgNO<sub>3</sub>. Синтезовані НЧ сферичної форми виявилися з високою протигрибковою дією проти деяких штамів *Candida albicans*.

Варто згадати макрогриби як один із способів синтезу. Вони мають у своєму складі важливі для синтезу НЧ вторинні метаболіти. AgNPs синтезували за допомогою екстракту гриба рейши (*Ganoderma lucidum*). До грибного екстракту додавали дистильовану воду, а згодом нітрат срібла і залишили з магнітною для відновлення іонів Ag<sup>+</sup> до Ag<sup>0</sup>. Відновлення іонів ідентифікували за зміною забарвлення від прозорого до коричневого. Зображення TEM показали, що утворені НЧ сферичні з діаметром 15–22 нм [57]. Також гриби володіють групою фітохелатинових сполук, що часто зустрічаються саме у грибів та можуть відновлювати іони срібла в металеве срібло [58]. Показовим став експеримент з культуральним середовищем з супернатантом *Coriolus versicolor*. Дослід показав, що гідроксильні група в міцелії гриба віддала електрони іонам срібла, завдяки чому утворились НЧ. Також довів присутність аліфатичних та ароматичних амінів, що були у ролі стабілізаторів НЧ через амідний зв'язок [59]. А ще ранній дослід (2002) повідомив про присутність білка з функціональною групою SH, які приймають участь у стабілізації НЧ Ag [60]. Не так давно встановили, що гриби здібні синтезувати НЧ внутрішньоклітинно під впливом AgNO<sub>3</sub>, у кислому середовищі (рН 5,5–6) [61].

### 1.5 Антибактеріальна дія

Антибактеріальна дія наночасток срібла була неодноразово підтверджена в різноманітних дослідженнях. Одним з таких став експеримент польських та українських вчених. Штам *Saccharomyces cerevisiae* 10,058/69, як продуцент синтезу НЧ, був взятий з ротової порожнини пацієнта стоматологічного відділення. Для визначення антибактеріальної дії використовували *Staphylococcus aureus* ATCC 25 923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27 853, *Escherichia coli* РСМ 2209. Синтез НЧ проводився на лізованих, стерильною дистильованою водою, залишках дріжджових клітин.

Антимікробну активність синтезованих Ag НЧ через зону інгібування перевіряли проти вище згаданих патогенів. Протокол перевірки полягав в пробиванні лунок діаметром 5 мм у живильному агарі замість використання змоченого диска. 100 мкл нічної культури суспензій штамів наносили на чашки з агаром. Після висушування 50 мкл Ag НЧ 1 мМ і Ag НЧ 3 мМ асептично переносили в окремі лунки. Планшети інкубували при 37°C протягом 24 годин для відповідно. Зони інгібування, що оточують лунки, були визнані як здатність НЧ інгібувати ріст клітин. Результат показав, що 50 мкл Ag НЧ достатньо щоб пригнічувати ріст усіх даних бактеріальних штамів.

Для подальшого аналізу було обрано штами *P. aeruginosa* та *E. coli*, щоб оцінити вплив AgNP на здатність бактерій створювати біоплівку у присутності наночастинок. Експеримент ґрунтувався на результатах контролю клітин без обробки НЧ та з ними. Для штаму *E. coli* найкраще зниження було досягнуто при найвищій концентрації 2 мг/мл, що спричиняє зниженню утворення біоплівки. У той час як *P. aeruginosa* демонструє зниження оптичної щільності біоплівки концентрацією 2 мг/мл Ag НЧ 1 мМ [62]. Таким чином, припускають, що Ag НЧ можуть стати протимікробним засібом для полірезистентних штамів, що є постійною проблемою в медицині [63].

Цікавим є метод інкапсуляції синтезованих НЧ для підвищення їх ефективності проти патогенних бактерій. Для дослідження цього методу як продуцент НЧ використовували ендofітний нитчастий гриб *Diaporthe sp.*, що є збудником хвороб рослин. Для перевірки брали, знову ж таки, всім відомі *Staphylococcus aureus* (ATCC 13150), *Salmonella typhi enterica* (ATCC14028) та *Escherichia coli* (ATCC35150) і *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853).

Для порівняння синтез проводився двома шляхами. Звичайний синтез, схожий на попередній дослід, коли AgNO<sub>3</sub> змішували з грибним екстрактом та інкубували при кімнатній температурі в темному місці. Для інкапсуляції крохмалем спочатку готували розчин крохмалю шляхом розчинення кукурудзяного крохмалю (0,5 г) у 10 мл NaOH (0,4 М) при постійному перемішуванні при 60°C. Після розчинення

крохмалю, частину попередніх НЧ суспендували в розчині, що дозволило зв'язатись та інкапсулюватись при постійному перемішуванні об/хв при  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  протягом 12 годин. Інкапсуляція крохмалю було підтверджено шляхом аналізу абсорбції від 200 до 700 нм за допомогою УФ-видимого спектрофотометра.

Щоб визначити форму синтезованих наночастинок було визначено поверхневий плазмонний резонанс (ППР). Згідно літературного джерела пік для НЧ срібла визначається у проміжку 420–450 нм [64]. Неінкапсульовані НЧ показали пік на 420 нм, що вказує на неагрегатну та сферичну форму. Пік крохмалю був на 260 нм, а інкапсульовані крохмалем НЧ виявились на 420 нм. Це вказує на те, що крохмаль не змінив оптичних властивостей НЧ.

Антибактеріальна активність була підтверджена у обох зразків, однак інкапсульовані НЧ краще знищували бактеріальні клітини та їх мінімальна інгібуєча концентрація була нижчою [65]. Стабілізація наночастинок таким сином, сприяє кращому поглинанню клітиною та вивільненню в цитоплазму завдяки ферменту амілаза. Звичайно, у різних бактерій різна кількість амілази, тому і вивільнення НЧ буде неоднакове [66].

## 1.6 Протигрибкова дія

Як виявилось, окрім антибактеріальної активності, наночастки срібла мають виражену протигрибкову дію. Розглянемо окремі доказові експерименти, що проводились на різноманітних штаммах грибів.

Штами *Candida* поширені будь-де у світі, тому боротьба з ними триває по наш час, проте НЧ срібла можуть використовуватись у цій справі. Було зазначено раніше який вплив має стабілізація синтезованих НЧ біополімерами для антибактеріальної дії, подібне дослідження є і протигрибкової дії. Дослідження [67]. виконувалось з НЧ срібла синтезованих на мікоендофіті *Colletotrichum gloeosporioides* (KX881911), виділений з лікарської рослини *Withania somnifera*. А протигрибкова дія перевірялась з НЧ+хітозан та без нього. Хітозан був взятий у креветок *Penaeus monodon*.

Противгрибкова активність проводиться методами лункової дифузії та бульйонного розведення з патогенними грибами, такі як *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata* та *Candida krusei*.

При аналізі дифузії лунки всі протестовані *Candida spp.* показали фунгіцидну дію при 25 мкг/мл концентрація чистих НЧ срібла, а НЧ+ хітозан при концентрації 25 мкг/мл зони інгібування не спостерігалось. При аналізі 2,3,5-трифенілтетразолію хлориду (ТТС) НЧ+хітозан показали значний біоцидний ефект проти всіх *Candida spp.* і є більш ефективними, ніж просто НЧ срібла, де МІК визначається як 50 мкг/мл для НЧ+хітозан, але у випадку некон'югованого НЧ срібла МІК становить 60 мкг/мл і вище. Полікатионна активність хітозану сприяє зв'язуванню з клітинами грибів, а НЧ Ag і хітозан разом спричиняють пошкодження мембрани шляхом руйнування мембраностабілізуючих білків, зв'язування з сірковмісними групами та їх осадження [68]. Цей процес є основною причиною противгрибкової активності; що викликає серйозні пошкодження клітини. У мембрані клітин гриба відбуваються незворотні зміни, які далі призводять клітину до витоку та смерті.

Для аналізу антиплівкового ефекту взяли два клінічно-значущі штами *Candida albicans* і *Candida krusei*. Дослідження чітко показало посилену противгрибкову активність НЧ+хітозан, який показав 76,08% інгібування біоплівки при самій концентрації 25 мкг/мл, тоді як НЧ срібла продемонстрували лише 47,01% пригнічення *Candida albicans*. А на *Candida krusei* рівень інгібування становив 75,26% і 48,05% для НЧ+хітозан і НЧ срібла відповідно при 25 мкг/мл.

Проте не лише самі наночастинки можуть мати противгрибкову дію, а також у поєднанні з антибіотиками. Яскравим прикладом став експеримент застосування флуконазолу з НЧ срібла [69]. В цьому випадку НЧ синтезували за допомогою *Fusarium oxysporum*, а противгрибкові та антиплівкові властивості перевірялись на *Candida albicans*.

Вплив чистих НЧ срібла на планктонні клітини *C. albicans* виявилися залежними від часу та фунгіцидними на відміну від фунгістатичної дії НЧ+флуконазол. У

поєднанні з флуконазолом спостерігалось значне зниження кількості КУО спостерігалось через 2 години, а через 4 години не було виявлено КУО. При застосуванні лише НЧ срібла повна загибель клітин спостерігалася через 24 години. НЧ срібла не змогли інгібувати зрілу біоплівку дріжджів в досліджуваних тут концентраціях, але їх поєднання з флуконазолом знижувало життєздатність біоплівки залежно від дози, однак вплив НЧ був більший при початкових стадіях утворення біоплівки *C. albicans*. Вчені припускають, що НЧ срібла допомагали кращій проникності клітинної мембрани, полегшуючи введення флуконазолу всередину.

Інші вчені виявили цікаву властивість дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, які не інгібувались при синтезі НЧ срібла, а самі НЧ мали протигрибкову дію на *Candida albicans* [70]. Для порівняння використовували НЧ розміром 5 нм і 100 нм в різних концентраціях. Важливо зазначити, що наночастинки були стабілізовані та покриті полівінілпіролідом (PVP). Експеримент показав, що НЧ 5 нм могли однаково сильно інгібувати обидва штами дріжджів, а 100 нм не змогли вплинути. Окрім інгібування загалом, проявилось погіршення засвоєння глюкози у *Candida albicans* та *Saccharomyces cerevisiae*, хоча так і не було визначено чи є зміна в поглинанні глюкози, причиною або наслідком дії індукованих НЧ срібла затримки клітинного циклу G1, а для порівняння інші зразки культивували в присутності агента, що блокує клітинний цикл, нокодазолу, з кінцевою концентрацією 15 мкг/мл. Додатково, 5 нм НЧ індукували виділення активних форм кисню у *Candida albicans*, але не у *Saccharomyces cerevisiae*. Далі вчені задалися питанням чи може відновитись клітинний цикл G1, якщо додати поглинач АФК, НАС (N-ацетилцистеїн). Так і виявилось та стало зрозуміло, що інгібування дійсно залежить від засвоєння глюкози. Оскільки обробка 5 нм AgNPs зменшила поглинання глюкози як у *Candida albicans*, так і в *Saccharomyces cerevisiae*, вони досліджували чи посилюється пригнічення споживання глюкози 5 нм Ag-опосередкована смерть клітин у *C. albicans* і *S. cerevisiae*. Обробка інгібітором гліколізу BrPA (бромпіруват) сам по собі не посилював загибель клітин *C. albicans* або *S. cerevisiae* порівняно з необробленим

контролем. Очікувалося, що обробка 200 мкМ ВrРА з 2 або 20 мкг/мл 5 нМ Аg значно збільшила загибель клітин у *C. albicans* на 6 та 24 годині культивування. У *C. albicans*, оброблених 80 мкМ ВrРА, частота загибелі клітин була значно підвищеною в присутності 20 мкг/мл 5 нМ Аg НЧ, але не в присутності 2 мкг/мл, що вказує на те, що обробка ВrРА посилювала загибель клітин, спричинену НЧ срібла *C. albicans* залежно від дози. Однак, синергічний цитотоксичний ефект ВrРА та 5 нМ НЧ срібла не спостерігався у *S. cerevisiae*. Взяті разом, ці результати показують, що 5 нМ Аg НЧ диференційовано регулюють ріст і виживання *C. albicans* і *S. cerevisiae*.

Як висновок, можемо сказати, що НЧ срібла можуть бути як окремим інгібуючим агентом та із допомогою стабілізуючих речовин або антибіотиків.

### 1.7 Антиоксидантна дія біогенних наночасток срібла

Антиоксидантна дія найкраще була досліджена на рослинних екстрактах, які по своїй природі мають у складі речовини з такою властивістю. Існує дослідження поєднання синтезованих НЧ срібла на пивних дріжджах *Saccharomyces pastorianus* та *Saccharomyces carlsbergensis* та екстракту троянди *Rosa damascena* [71]. Проведено «зелений» синтез НЧ срібла шляхом змішування 0,01М АgNO<sub>3</sub>, води, екстракту троянди дамаської та пивних дріжджів. Антиоксидантна активність визначалась за DPPH. Цей метод являє собою аналіз етанольного екстракту відходів троянд, до якого додають DPPH (2,2-дифеніл-1-пікрілгідразил), залишають на 15 хвилин для реакції та вимірюють на спектрофотометрі при 515 нм.

Результати дослідження показали, що обидва штами пивних дріжджів бідні на поліфенольні речовини, це відображається на спостережуваній антиоксидантній активності. Водний екстракт відходів *Rosa damascena* був багатий на поліфенольні сполуки:  $133,70 \pm 0,11$  мкмоль ГКЕ/100 г відходів, що підтверджує спостереження Славова та інших [72], що чим вища концентрація поліфенолів, тим вища антиоксидантна активність. Метод DPPH показав  $8550 \pm 0,98$  мкмоль ТЕ/100 г відходів троянди, а дріжджі  $2.05 \pm 0.13$  і  $12.00 \pm 0.21$  мкмоль ГКЕ/100 г відповідно.

Отже, для кращої антиоксидантної дії НЧ срібла їх варто поєднувати з екстрактами доступних рослин або синтезувати одразу на них. Наприклад, етаноловий екстракт листя *Aloe barbadensis*, DPPH якого становить 108.0 мкМ ТЕ [73]. Екстракт виготовлявся таким чином: зразки були ліофільно висушені, а потім подрібнені в дрібний порошок, 50 мл 80% етанолу додавали до 1 г ліофілізованого порошку в круглій колбі, зразок обробляли ультразвуком протягом 15 хвилин і фільтрували за допомогою фільтрувального паперу. Залишок двічі промивали 10 мл етанолу. Фільтрати сушили при 50°C, використовуючи роторний випарник. Масу твердих речовин у різних екстрактах реєстрували, а залишок повторно суспендували у 80% етанолі до кінцевої концентрації 100 мг/л безпосередньо перед аналізом.

Аналіз активності поглинання радикалів DPPH. 2 мл зразка поміщали в кювету і додавали 2 мл  $1,0 \times 10^{-4}$  моль/л приготованого розчину DPPH в етанолі. Вимірювання абсорбції проводили при 517 нм за допомогою спектрофотометра. Результати виражали як еквіваленти тролокса (ТЕАС) з використанням калібрувальної кривої для розчинів тролокса в 70 % етанолі.

Прикладом синтезу наночасток срібла з високою антиоксидантною дією є експеримент з *Pulicaria vulgaris* (Блошниця звичайна), яка є поширеною рослиною на території України [74]. Рослинний екстракт готували з 2,5 г висушеного та подрібненого рослинного матеріалу, його наземна частина, та 50 мл етанолу (98%) протягом 24 годин при кімнатній температурі на магнітній мішалці. Отриману суміш фільтрували через фільтрувальний папір.

Для синтезу НЧ AgCl до 1 ммоль/л розчинів AgNO<sub>3</sub> (додавали рослинний екстракт таким чином, щоб його кінцева концентрація в отриманих сумішах становила 1%, 2%, 4% і 6%). Ці суміші залишали для реакції при кімнатній температурі протягом 210 хв. Після цього отримані НЧ AgCl збирали за допомогою центрифугування (18 тис. об/хв, 20 хв). Утворені частинки тричі промивали стерильною дистильованою водою, а потім висушували при кімнатній температурі.

Для визначення DPPH готували метанольні розчини НЧ AgCl різної концентрації (20, 40, 60, 80, 100 і 120 мкг/мл). Метанольні розчини бутильованого гідрокситолуолу (ВНТ) у тих же концентраціях також готували і використовували як стандарти. Один мілілітр аліквот вищезазначених розчинів додавали до 2 мл метанольного розчину DPPH (1 ммоль/л) і ретельно перемішували. Отримані суміші інкубували в темряві протягом 30 хв при кімнатній температурі. Після цього значення поглинання кожної суміші вимірювали при 517 нм. Результати визначались за *Формулою 1*: активність поглинання радикалів:

$$\text{DPPH (\%)} = 100 \times (\text{A}_c - \text{A}_s) / \text{A}_c \text{ (Формула 2.1)}$$

де  $\text{A}_c$  — це поглинання контролю (що містить розчинник і DPPH),  $\text{A}_s$  — поглинання, виміряне для розчинів НЧ AgCl або ВНТ. При низьких концентраціях НЧ (20-80) відсоткове значення DPPH складало 10-40% у порівнянні з контролем ВНТ  $\pm 26-46\%$ , при високих концентраціях (100, 120) значення експерименту та контролю були рівні 50% і 54%.

З даного аналізу літератури приходимо до висновку, що варто підбирати метод синтезу в залежності від кінцевої потреби та наявності доступних матеріалів.

## 1.8 Протипухлинна дія

Властивості срібла мають широкий масштаб і не обмежуються тільки антимікробною та протигрибковою дією, їх можна використовувати як допоміжний препарат протипухлинної дії.

Існують доказові експерименти застосування НЧ срібла у цій сфері. *Piriformospora indica* була відкрита відносно недавно, це ендоефітний гриб, що живе на кореневій системі орхідейних рослин в Індії [75]. На екстракті цього гриба синтезували наночастинки срібла розміром 5-25 нм та гранецентрованою кубічною формою. Даний дослід проводився на різних лініях ракових клітин, таких як людська молочна залоза аденокарцинома (MCF-7), карцинома шийки матки людини (HeLa),



гепатоцелюлярна печінка людини клітинні лінії карциноми (HepG2) і лінії клітин ембріональної нирки (HEK-293) як нормальні клітинні лінії.

Аналіз життєздатності клітин проводили за допомогою описаної методики колориметричного аналізу для вимірювання росту клітин, який перетворює тетразолієвий жовтий барвник, званий МТТ, на нерозчинний фіолетовий формазан за допомогою ферменту мітохондріальної дегідрогенази живих клітин. Поглинання вимірювали при довжині хвилі 570 нм. Цитотоксичний потенціал НЧ Ag визначали дозозалежним способом. Клітини висівали в 96-лунковий планшет, культивують протягом 24 години при 37°C. Були приготовлені вихідні розчини НЧ срібла у суміші 1:1 ДМСО (диметилсульфоксид) і ТГФ (тетрагідрофуран), разом з клітинами інкубували протягом 48 год а проліферацію клітин розраховували шляхом додавання 20 мкл барвника МТТ. Далі планшети поміщали на 4 години при 37°C у зволожену камеру, що містить 5% CO<sub>2</sub>. Завдяки відновленню барвника тетразолію, кристалів формазану, утворених життєздатними клітинами в кожній лунці розчиняють у 150 мкл ДМСО і показник поглинання вимірю при 570 нм. Значення поглинання були виражені як життєздатність клітин (%), за даними контрольної групи як 100%. А доксорубіцин (Doxo) і 5-фторурацил (5-Fu) використовувалися як стандартні препарати. Необхідна концентрація для 50% інгібування життєздатності клітин (IC<sub>50</sub>) розраховували за допомогою програмного забезпечення «Призма 3.0».

Результат був однозначний для всіх типів клітин, НЧ срібла мати хорошу цитотоксичність проти ракових клітин і для нормальних, але для других у значно меншій мірі (IC<sub>50</sub> 13.94 ± 1.31). Значення IC<sub>50</sub> 1,07 ± 0,19 мкг/мл (MCF7), 1,87 ± 1,31 мкг/мл (HeLa) і 2,45 ± 0,62 мкг/мл (HepG2) у всіх лініях ракових клітин.

Протипухлинна активність виявлена й у НЧ іншого гриба, тільки їх дія була перевірена на тканині карциноми легенів людини, лінія клітин A549 [76]. Синтез НЧ срібла виконувався на ендofітному грибі *Talaromyces purpureogenus*, який був знайдений на японській сосні *Pinus densiflora*. Синтез НЧ та інкубування проводилось за подібним протоколом як у попередньому досліді. Середній розмір наночасток

становив близько 25 нм, а різні піки аналізу вказували на сферичну, трикутну та інші. Вважається, що висока цитотоксичність НЧ пов'язана перш за все з розміром меншим за 50 нм, також проявляючи протиракову активність.

Аналіз протиракової активності проводився на клітинах карциноми легенів людини, а перевірка цитотоксичності для нормальних клітин NIH3T3 (тканина ембріона миші-альбіноса). IC<sub>50</sub> для НЧ Ag становило 376,24 мкг/мл. Згідно з результатами клітинного проточного цитометра, 5,92% клітинного апоптозу було індуковано НЧ Ag. Вони не були цитотоксичними для нормальних клітин NIH3T3. Крім того, НЧ виявляли сильну активність загоєння клітинних ран. До того ж НЧ срібла (2 мкг/мл<sup>-1</sup>) показали сильний антипроліфераційний ефект у A549.

Дріжджі також можуть синтезувати НЧ срібла з протипухлинною дією. На найбільш відомих та поширених *Saccharomyces cerevisiae* синтезували НЧ срібла, які знайшлися на аналізі спектру плазмонного резонансу на хвилі 415 нм [77]. *S. cerevisiae* інкубували при 30°C протягом 48 годин при 220 об/хв. Після періоду інкубації культуру центрифугували 15 хв. Супернатант використовували для синтезу наночастинок срібла. Скануюча електронна мікроскопія (SEM) показує, що НЧ мали сферичну форму діаметром 63 нм.

За основу перевірки гіпотези взяли відому лінію MCF-7. Ці клітини зветься MCF-7 ATCC HTB 22 (лінія клітин аденокарциноми молочної залози людини) були отримані від ATCC. Для клітин MCF-7 середовище містило: 10% розчин модифікованого середовища Дульбекко Ігла (DMEM), інактивовану фетальну бичачу сироватку, додаткову суміш антибіотиків і L-глутамін. У цьому дослідженні використовували легко інактивовану сироватку. Додатково використовувалась; суміш антибіотика 100, що містить 10 000 одиниць пеніциліну та 10 000 мкг стрептоміцину в 1 мл, використовували після розведення стерильною водою. А статистичний розрахунок проводився за допомогою програми ANOVA. Діапазон ідентифікації статистики різницю вказували як  $p < 0,05$ . Результати вказують на те що, при

концентраціях 100 та 50 мкг/мл приблизно 83% летальної активності проти клітини MCF-7.

Дані дослідження чітко вказують на те що, НЧ срібла можуть використовуватись для клінічного лікування або для підтримуючої терапії у боротьбі з раковими пухлинами.

## 1.9 Антивірусна дія

Найменш вивчена сфера впливу наночастинок срібла це їх антивірусна дія. Однак дослідження, що вже існують цікавлять успішністю протидії вірусам: ВІЛ-1, вірус гепатиту В, вірус віспи мавп, вірус Тасарібе, вірус простого герпесу та респіраторно-синцитіальний вірус. Наприклад, НЧ срібла мають дозозалежну антиретровірусну активність і виявляють високу ефективність при 50 мМ (98%) для інгібування реплікації ВІЛ-1. Ag (5 мМ) зменшили відсоток апоптичних клітин Nut/CCR5 з 49 до 35%, пригнічуючи реплікацію вірусу. Було також продемонстровано, що наночастинок AgNP взаємодіють із ВІЛ-1 залежно від розміру, і наночастинок виключно в діапазоні 1–10 нм можуть прикріплюватися до вірусу. Бачимо залежність, що для клітин бактерій та ракових клітин потрібні НЧ більшого розміру.

НЧ можуть проявляти активність проти ВІЛ на ранній стадії реплікації вірусу, швидше за все, як віруліцидний агент або як інгібітор проникнення вірусу. Крім того, наночастинок інгібували пост-вхідні стадії життєвого циклу ВІЛ-1. Завдяки активності проти ВІЛ був розроблений поліуретановий презерватив (PUC), покритий наночастинками срібла. PUC, покритий ними, здатний до інактивації широкого спектру мікробних інфекцій, включаючи ВІЛ1 і ВПГ-1/2.

Окрім зазначеного, експерименти показують високу антивірусну дію наночастинок синтезованих грибами, а не хімічним шляхом. Відомий *Aspergillus spp.*, на основі якого синтезували НЧ срібла, показали інгібіторну активність щодо вірусних штамів бактеріофагів залежно від концентрації в діапазоні 30–210 ppm, внаслідок чого

кількість бляшок зменшується до 2 бляшкоутворюючих одиниць (БОЄ) і повне пригнічення вірусу при зростанні концентрації наночастинок до 210–240 ppm. Малі AgNPs (3–10 нм), синтезовані *Aspergillus niger*, також показали чудову противірусну активність при 8–12 ppm, і повне пригнічення росту вірусу в бактеріальному штамі господаря *E. coli* [78].

### **Висновки до розділу 1**

Поширене використання антибіотиків призвело до проблеми антибіотикорезистентності. Ця проблема стала загрозою для громадського здоров'я на глобальному рівні. Використання наноматеріалів може бути новим підходом для подолання антибіотикорезистентності бактерій. Наноматеріали можуть взаємодіяти з бактеріями різними способами, залежно від їхнього хімічного складу, форми та розміру. Позитивно заряджені наноматеріали можуть взаємодіяти з негативно зарядженими частинами тейхоєвої кислоти бактерій через електростатичну взаємодію. Серед інших механізмів дії наноматеріалів як антимікробних агентів можна виділити руйнування мембран, створення пухирців та каналців, а також генерацію активних форм кисню, які пошкоджують клітинну стінку бактерій. Використання наноматеріалів як антимікробних агентів має ряд переваг, такі як економічність, екологічність та здатність до повторної переробки. Існує два основних підходи до синтезу наночастинок - "знизу вгору" і "зверху вниз". Інтерес до методу "зеленого синтезу" наночастинок надзвичайно високий, оскільки відзначається меншою токсичністю, економічною ефективністю та безпечністю для навколишнього середовища. Цей метод передбачає використання біооб'єктів, таких як бактерії, рослинні екстракти, дріжджі, гриби та людські клітини, для синтезу наночастинок.

В роботі виділяється зелений синтез наночастинок срібла за допомогою дріжджів: Такий метод має переваги, такі як просте накопичення біомаси та нетоксичність. При використанні дріжджів як агентів для синтезу важливу роль відіграють ферменти, зокрема редуктази та НАДФН-редуктази, у синтезі

наночастинок срібла і процес внутрішньоклітинного утворення металевих наночастинок. Найдослідженим типом дріжджів, що використовується для синтезу наночастинок срібла є *Saccharomyces cerevisiae*.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В роботі використовували штами дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Y-1995 та Y-530, а саме їх лізати і супернатанти. Також, використовували штами бактерій *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*. Джерелом для синтезу наночасток срібла виступила сіль  $\text{AgNO}_3$ . В роботі проведено: синтез наночасток срібла, дослідження їх піків поглинання та розмірів, антибактеріальні та антиадгезивні властивості. В роботі використали методи, які перераховані та описані нижче. До них належить УФ-спектроскопія, метод динамічного розсіювання світла, методи дослідження антибактеріальної та антиадгезивної дії.

#### 2.1 Характеристика об'єктів дослідження

Штами дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Y-1995 та Y-530 були взяті з музею культур інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Окрім того, для перевірки біологічних властивостей синтезованих наночасток були взяті штами культур *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*. Якщо бактерії роду *Bacillus*, *Escherichia* були застосовані для виявлення антибактеріальних властивостей наночасток, то бактерії *Lactobacillus* для з'ясування впливу НЧ на нормальну мікрофлору людини.

##### 2.1.1 Загальний опис дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* – це вид одноклітинних грибів (дріжджів), розмір яких варіюється від 2,5 до 10 мкм. Форма клітин округла, сферична, еліпсоїдна[79]. Вид займає положення відповідно з таксономією:

Надцарство: Еукаріоти (*Eukaryota*)

Царство: Гриби (*Mycota*)

Відділ: Аскоміцети (*Ascomycota*)

Клас: Сахароміцети (*Saccharomycetes*)

Родина: Сахароміцетові (*Saccharomycetaceae*)

Рід: Сахароміцес (*Saccharomyces*)

Вид: *Saccharomyces cerevisiae*

Здавна штами цього виду використовують у харчовій промисловості (пекарство, виробництво вина, квасу, пива), окрім того сучасне використання включає: синтез спирту, нарощення біомаси для комбикормів та біологічно активних сполук.

Для дріжджів характерний вегетативний спосіб розмноження (брунькування). Також існує статевий процес з утворенням аскоспор, коли клітина подвоює свій набір хромосом і шляхом мейозу створює аск з чотирма аскоспорами, які мають один набір хромосом і один набір генів. Вони бувають двох типів:  $\alpha$  і  $a$ . Спарювання цих гаплоїдних клітин утворює звичайну диплоїдну клітину  $\alpha/a$ , проте можлива аномалія у вигляді  $\alpha/\alpha$  і  $a/a$ . Такі аномальні клітини можуть розмножуватись тільки вегетативним способом [80]. Загальновідомо морфологічні ознаки штаму залежать від умов навколишнього середовища.

Щоб повноцінно рости і розвиватись цим дріжджам достатньо простих цукровмісних середовищ, наприклад: відходи цукрової промисловості (цукрові буряки, цукрова тростина), меляса, сусло, продукти сільсько-господарського виробництва, що містять крохмаль (силос, картопля, рис). Для досліджень використовують стандартизовані середовища: сусло-агар (типовий склад (г/літр) солодовий екстракт - 15,0; універсальний пептон 0,75; мальтоза - 12,75; декстрин - 2,75; гліцерин - 2,35; калій фосфорнокислий однозаміщений - 0,4; хлорид амонію - 1,0; агар-агар - 20,0), середовище Сабуро агаризоване (декстроза 40 г/л; бактеріологічний агар 15 г/л; суміш пептичного перевару тканин тварин та підшлункової залози гідролізат казеїну (1:1) 10 г/л), картопляно-декстрозний агар, середовище Чапека (сахароза 30 г/л, нітрат натрію 2 г/л, калій гідро фосфат 1 г/л, магній сульфат 1 г/л, калій хлорид 0,5 г/л, сульфат заліза 0,01 г/л, агар-агар 15 г/л) [81].

Температурний режим для дріжджів коливається 25-30°C, вони є мезофілами. Він впливає на синтез вторинних метаболітів та на загальний стан клітини. При низьких температурах бродіння та розмноження зупиняється, а при 45°C і вище клітина почне руйнуватись.

Значення рН є не менш важливим. Для культури зазвичай оптимальне середовище з рН від 4,5 до 6 [82]. А несприятливий показник рН може змістити внутрішній баланс іонів  $H^+$  і  $OH^-$ , що призведе до виходу з ладу функцій ферментів та транспорт речовин через мембрану клітини.

### 2.1.2 Фізіологічні та біохімічні властивості *S. cerevisiae*

За способом життя *S. cerevisiae* є факультативними анаеробами, їм притаманна здатність пристосовуватись до навколишніх умов. За наявності кисню вони використовують його як акцептор при диханні. За відсутності кисню, перемикаються на анаеробні процеси, а саме бродіння.

Бродіння – це анаеробний метаболічний розклад доступних молекул, у нашому випадку декстрози. *Saccharomyces* же здатні до спиртового бродіння, коли глюкоза і фруктоза перетворюються у етанол та вуглекислий газ. Загальна реакція має вигляд (Формула 3.1):



Спиртове бродіння починається при утворенні пірувату, що є продуктом гліколізу. На Рис.3.1 зображений схематичний процес гліколізу.



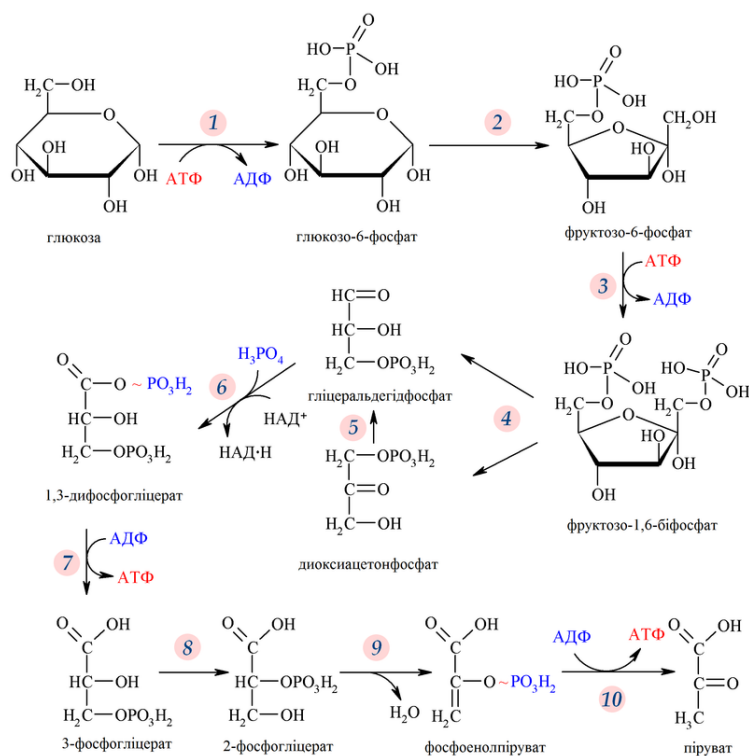


Рисунок 3.1. Гліколіз

Бродіння (Рис.3.2) починається з пірувату, що декарбоксилюється в етаналь піруватдекарбоксилазою. Цей фермент потребує магній та пірофосфат тіаміну як кофакторів. Після цього алкогольдегідрогеназа відновлює етаналь до етанолу, рециркулюючи НАДН до НАД<sup>+</sup>. Існує три ізоферменти алкогольдегідрогенази *Saccharomyces cerevisiae*, але ізофермент I головним чином відповідає за перетворення етанолу в етанол.

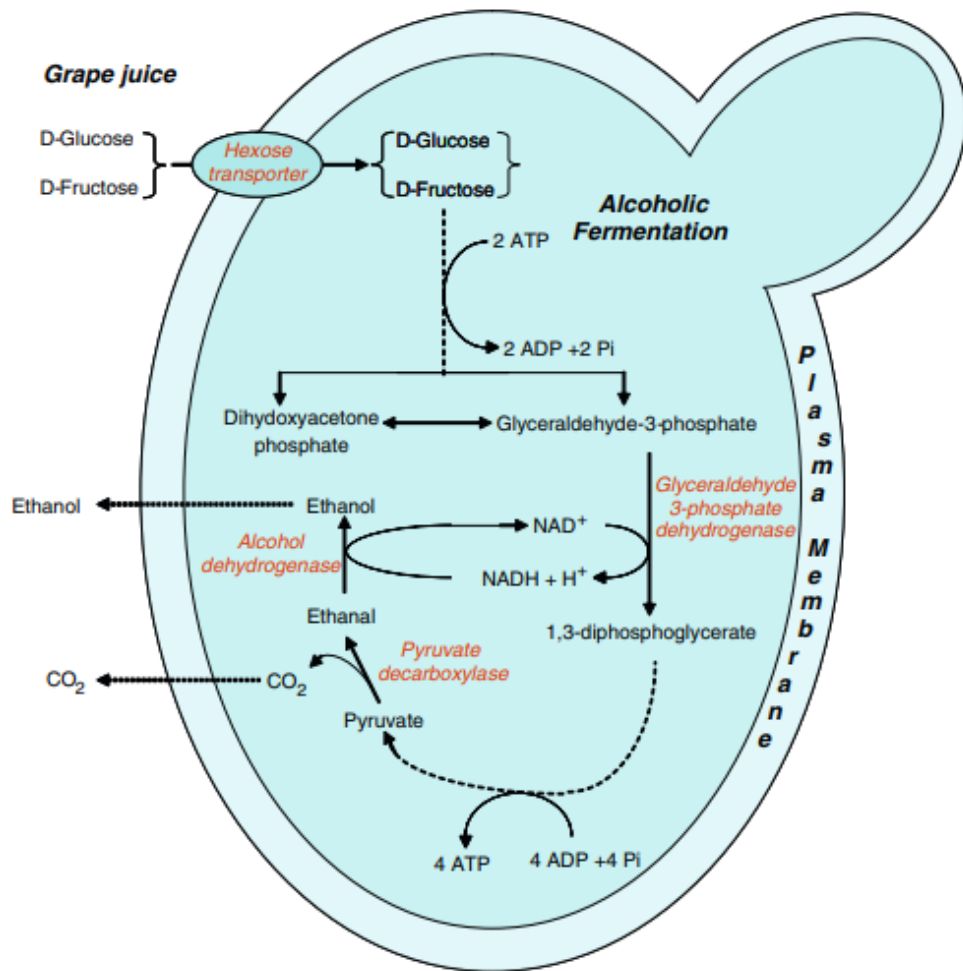


Рисунок 3.2. Спиртове бродіння

У той час алкогольдегідрогеназа використовує цинк як кофактор. Кінцеві продукти цього типу бродіння транспортуються поза межі клітини шляхом простої дифузії [82].

Отже кінцевими продуктами спиртового бродіння на одну молекулу глюкози є дві молекули етилового спирту, дві молекули CO<sub>2</sub>, та дві молекули АТФ. В підсумку не відбувається ні окиснення ні відновлення глюкози (співвідношення С:Н однакове для вихідних речовин (глюкоза) і продуктів (етанол + вуглекислий газ) і становить 1:2).

## 2.2 Характеристика предмету дослідження

Предметом дослідження є антибактеріальна дія наночасток срібла синтезованим «зеленим» шляхом. Щоб оцінити дане твердження були взяті референтні штами умовно-патогенних *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* та представників нормофлори людини *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*.

Зазвичай людський організм страждає від власних бактерій, які почали активно розмножуватись, що й приводять до хворобливого стану. Зниження імунітету стає провокатором подібних ситуацій [83]. Ознаками умовно-патогенних мікроорганізмів є:

В організмі людини вони представники нормофлори;

- Здатні деякий час виживати в навколишньому середовищі;
- Їм притаманна висока мінливість, різна чутливість до антибіотиків, засобів дезінфекції тощо;
- Можуть швидко набувати стійкість до подразників;
- Не властива тропність (специфічність) до органів та тканин людини, один і той же представник здатен уражати ледь не всі важливі системи; водночас різні представники можуть викликати однакові хвороби
- Здатні наносити шкоду організму тільки при зниженню імунної дії та при обширному ураженні певних органів чи тканин [84].

Однак варто зауважити, *Bacillus subtilis* вважається не шкідливим мікроорганізмом для людини, проте він живе у навколишньому середовищі, наприклад ґрунт, вода, повітря, як наслідок оселяється на продуктах (овочі, фрукти, тощо). У процесі життєдіяльності бактерія розкладає поживне середовище, може виділяти токсини, які призводять до розладів травлення при вживанні таких продуктів. У сучасній біотехнології чиста культура *Bacillus subtilis* має широке застосування як пробіотика для людини, так і для сільсько-господарської промисловості, а активні ферменти та інші біологічно активні речовини використовуються в медицині.

А от *Escherichia coli* є типовим збудником поширених хвороб людини. Штами кишкової палички можуть бути як умовно-патогенними, у своїй меншості, так і взагалі не шкідливими, у більшості випадків. При обширному ураженні паличка призводить до серйозних захворювань: сепсису, дисбактеріозу, інтоксикації організму [85].

Для повного розуміння антибактеріальної дії наночастинок, важливо вивчити їх вплив на нормальну мікрофлору людини, ймовірний цитотоксичний вплив. Ми звернули увагу на *Lactobacillus acidophilus* та *Lactobacillus delbrueckii*. Ці маленькі помічники є пробіотиками, а отже, антагоністами патогенним та умовно-патогенним штамам. Ознаками пробіотиків є:

- Пригнічення росту патогенних культур;
- Адгезивні властивості клітин та їх здатність до колонізації(прикріплення);
- Висока стійкість до несприятливих умов, стресів. Якщо штам здатен витримувати дію протеолітичних ферментів, середовище ШКТ(підвищена кислотність або лужність);
- Нешкідливість для тканин та органів хазяїна, а саме генетична віддаленість від патогенів та їх фізіолого-біохімічні властивості(відсутність вірулентності, токсичності, неінвазивності);
- Антибіотикостійкість;
- Здатність до зниження адгезивності патогенів [86].

Враховуючи вище написане, важливо зберегти їх життєздатність при дії наночасток срібла, для цього ми також дослідимо адгезивні властивості НЧ.

*Lactobacillus acidophilus* (ацидофільна паличка) представник нормофлори людини, також використовується для виготовлення ацидофільного молока. *Lactobacillus delbrueckii* (болгарська паличка) зазвичай використовують як пробіотик і для заквасок кисломолочної продукції.

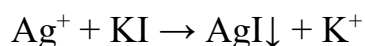
### 2.3 Методика синтезу наночастинок срібла за допомогою *Saccharomyces cerevisiae* Y-1995 та Y-530

Для синтезу наночастинок срібла спочатку було вирощено культури дріжджів на середовищі Сабуро протягом 48 годин при 28°C у шейкері 130 об/хв. Накопичення біомаси перевіряли спектрофотометричним методом до досягнення 20 грамів дріжджових клітин у колбах об'ємом 200 мл. Далі необхідно відділити біомасу від поживного середовища центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 15 хвилин. Супернатанти та преципітати мали чітке візуальне розділення, тому були перелиті в окремі стерильні колби. У преципітат додали 100 мМ розчин нітрату срібла AgNO<sub>3</sub> розчинений у дистильованій воді. Дистильованою водою ми спровокувати лізис клітин (руйнування мембрани завдяки зміні осмотичного тиску), у супернатанті розчинили суху сіль нітрату срібла. Зелений синтез НЧ відбувався протягом 5 діб в роторній мішалці в умовах: 26°C та 130 об/хв. Знову центрифугували при 3000 об/хв протягом 15 хвилин, адже частини клітин (дебрис) та великі агрегати могли залишитись у зависі. Потім проводили холодну стерилізацію, фільтруючи через фільтр розміром пор 0,22 мкм

Розчини НЧ з супернатанту та лізату застосовували в подальших аналізах.

### 2.4 Методика визначення концентрації іонів срібла

Для визначення концентрації іонів срібла в досліджуваних зразках проводили реакцію із калій йодидом (утворюється жовтий забарвлений осад):



Аналіз проводили в 96-лункові платі. У лунки вносили по 50 мкл одного із досліджуваних розчинів наночастинок срібла і 50 мкл KI. Паралельно вносили сіль AgNO<sub>3</sub> у відомих концентраціях для побудови калібрувальної кривої. Для визначення оптичної густини зразків використовували планшетний рідер. Визначення оптичних густин проводили при довжині хвилі 620 нм. За отриманими результатами будували

калібрувальну криву, розраховували рівняння залежності оптичної густини від концентрації та проводили розрахунок концентрації іонів міді в дослідних зразках.

## **2.5 УФ-спектрофотометричний метод дослідження наночастинок**

Для ідентифікації отриманих НЧ срібла використовується значення плазмонного резонансу, який за літературними джерелами знаходиться в діапазоні 400-450 нм. Вибраний нами діапазон дослідження від 340 нм до 520 нм, з кроком у 20 нм. Контрольним розчином була 20%-ова глюкоза.

Дослідження проводилось за допомогою УФ-спектрофотометру. Перед роботою проведено автокалібрування. Дотримано правила експлуатації. Аналіз проведений під наглядом наукового керівника.

## **2.6 Характеристика синтезованих наночастинок срібла**

У нашому експерименті ми припускаємо, що змогли синтезувати саме наночастки срібла. Для підтвердження даної думки використовували різні доступні методи дослідження. Перш за все наночастинки ідентифікуються розміром. У цьому нам допоміг Аналізатор розміру та форми частинок Bettersizer Цей прилад може аналізувати розмір та форму методом лазерної дифракції з рідинним диспергування. Технологія включає в себе ультразвуковий гомогенізатор та мішалку для забезпечення високої гомогенізації і як наслідок у поле зору лазерів потрапляють майже всі частинки. Важливою характеристикою є показник переломлення, який є індивідуальним для кожного зразка, а саме для кожної частинки. Прилад використовує для аналізу два лазерні промені, що аналізують усі частки, які їм зустрічаються. Таким чином він збирає інформацію про розмір та форму, вираховуючи середній показник даних значень для формування відсотку концентрації часток певного розміру.

## 2.7 Дослідження антибактеріальної та антиадгезивної дії синтезованих наночастинок срібла

Для аналізу антибактеріальної дії НЧ срібла використали штами *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*. Всі вони були вирощені на рідких середовищах СПА та MRS. Добові культури даних штамів вносили у 96-лункову плашку у порядку (Рис. 3.3):

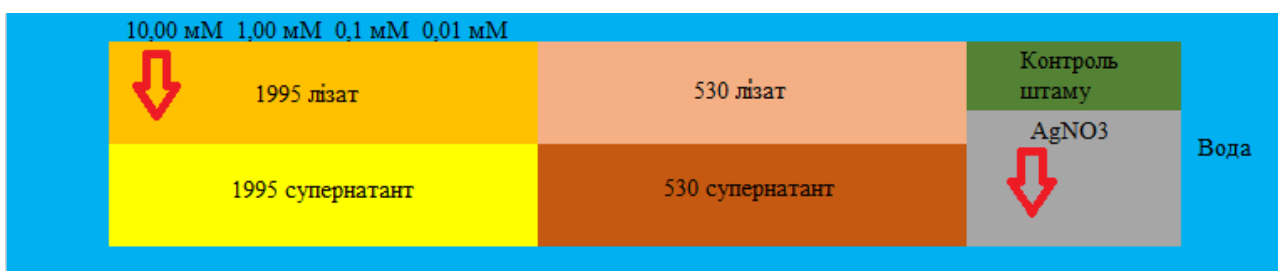


Рисунок 3.3. Схема дослідження антибактеріальної та антиадгезивної дії

На кожній платі окремо було перевірено дію НЧ на штами бактерій. У якості контролю вносили чисту культуру без домішок, а в сусідні лунки бактерії та розчин  $\text{AgNO}_3$ . Інкубували при  $37^\circ\text{C}$  добу.

Наступним етапом було визначення антибактеріальної дії, де використовували барвник-індикатор резазурин. Цей метод допомагає визначити життєздатність клітин. Процес індикації (Рис. 3.4) до перевірки на спектрофотометрі, виглядає таким чином, що активні живі клітини, що виділяють метаболіти, викликають відновлення резазурину (фіолетово-синього) до резорурфіну (рожево-безбарвного) [87].

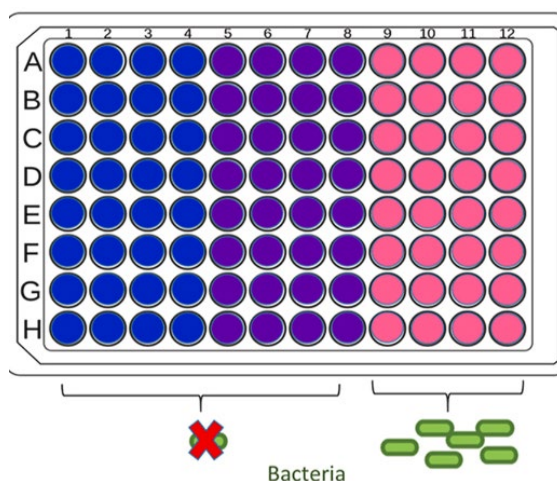


Рисунок 3.4. Візуалізація процесу відновлення резазурину

У кожен лунку плашки ми накапали по 50 мкл резазурину. Поставили інкубуватись у термостат при 30°C приблизно на годину (допоки контроль клітин без НЧ не змінив колір на рожевий). Провели аналіз на пляшковому спектрофтометрі на хвилях 568 нм та 620 нм. Вирахували значення живих клітин зі зразками НЧ відносно клітин у контрольному зразку.

Для визначення антиадгезивної дії використовується 30% спиртовий розчин кристалічного фіолетового або генціан фіолетовий. Вміст плашки обережно вилили у дезінфікуючий розчин. В кожен лунку додали по 50 мкл кристалічного фіолетового та інкубували 20 хвилин. Барвник потім забрали та 70% розчином етанолу розчиняли залишки, що адсорбувались на адгезованих клітинах.

Вимірювання проводилось на хвили 568 нм. Результати було представлено у вигляді відсоткового розрахунку живих клітин відносно контролю.

Всі значення були усереднені за допомогою медіани, похибки порашовані методом інтерквартильного розкиду.

## 2.8 Статистичний аналіз результатів дослідження

Результати були розраховані на програмному забезпеченні пакету Microsoft Office (Exel) та програмі STATISTICA. Щоб оцінити нульову гіпотезу застосовували



непараметричні методи статистичного аналізу. За основу взята нульова гіпотеза для тесту Вілкоксона, яка стверджує, що немає послідовної, систематичної різниці між двома методами/умовами. Для малих вибірок значень застосовано метод порівняння залежних пар Вілкоксона.

## **Висновки до розділу 2**

В роботі використані штами дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Y-1995, *Saccharomyces cerevisiae* Y-530 надані для наукових досліджень Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Штами належать до Української колекції мікроорганізмів.

*S. cerevisiae* одноклітинні гриби, розмір яких коливається від 2,5 до 10 мкм. Форма клітин округла, сферична, еліпсоїдна. Ростуть на рідких та твердих середовищах, наприклад сусло-агар, середовище Сабуро агаризоване, картопляно-декстрозний агар, середовище Чапека. Антибактеріальну дію визначали на умовно-патогенних *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* та представників нормофлори людини *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*.

Для синтезу наночасток срібла потрібні культури дріжджів виростили на середовищі Сабуро. Зелений синтез відбувався за допомогою супернатантів та дріжджових лізатів. Для дослідження плазмонному резонансу срібла використали УФ-спектрофотометрію. Антибактеріальний та антиадгезивну вплив наночасток срібла визначали стандартними мікробіологічними методами.

Всі дослідження проводилися з використанням сучасних, відомих та робочих методів та згідно перевірки статистичних гіпотез р-значення ( $p < 0,05$ ), тому результати є достовірними.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В роботі отримували до досліджували властивості наночасток срібла, отриманих від дріжджів. В залежності від способу отримання та штаму дріжджів можна поділити досліджувані зразки на чотири групи: супернатант штаму *Saccharomyces cerevisiae* Y-1995; супернатант штаму *Saccharomyces cerevisiae* Y-530; лізат штаму *Saccharomyces cerevisiae* Y-1995; лізат штаму *Saccharomyces cerevisiae* Y-530. Кожний вид наночасток досліджувався окремо, а їх біологічні властивості порівнювались.

#### 3.1 Результати визначення концентрації іонів срібла

В роботі було визначено концентрацію іонів срібла в досліджуваних зразках. Результати представлені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

Концентрація іонів міді в досліджуваних зразках

Назва зразку	Медіана концентрації іонів срібла, мМ	Інтерквартильний розкид значення концентрації іонів срібла, мМ
<i>S. cerevisiae</i> Y-1995 супернатант	75,9	75,3-77,8
<i>S. cerevisiae</i> Y-1995 лізат	76,8	74,8-79,0
<i>S. cerevisiae</i> Y-530 супернатант	72,4	71,7-72,9
<i>S. cerevisiae</i> Y-530 лізат	71,3	71,0-71,6

Важливо відмітити тенденцію, що зразки наночасток, отримані від супернатанту та лізату *S. cerevisiae* Y-1995 мають менші втрати іонів срібла (23,2-24,1 мМ) в порівнянні зі зразками, отриманими від супернатанту та лізату *S. cerevisiae* Y-530 (27,6-28,7 мМ). Загалом, найбільша концентрація іонів срібла спостерігається в зразку лізату *S. cerevisiae* Y-1995 – 76,8 мМ, а найменша концентрація (71,3 мМ) – в зразку лізату *S. cerevisiae* Y-530.

### 3.2 Аналіз утворених наночастинок срібла за допомогою УФ-спектрофотометрії

За літературними даними спектр поглинання НЧ срібла знаходиться у межах 400-450 нм [88], а можливості лабораторного спектрофотометра дозволяють нам розширити вибірку для кращого розуміння піку поглинання наших зразків (від 280 нм до 600 нм, з кроком у 20 нм).

Пік поглинання для супернатантів та лізатів є однаковим, приблизно корелюється біля значення 440 нм, отже ми можемо стверджувати про наявність наночастинок срібла (Рис 3.1).

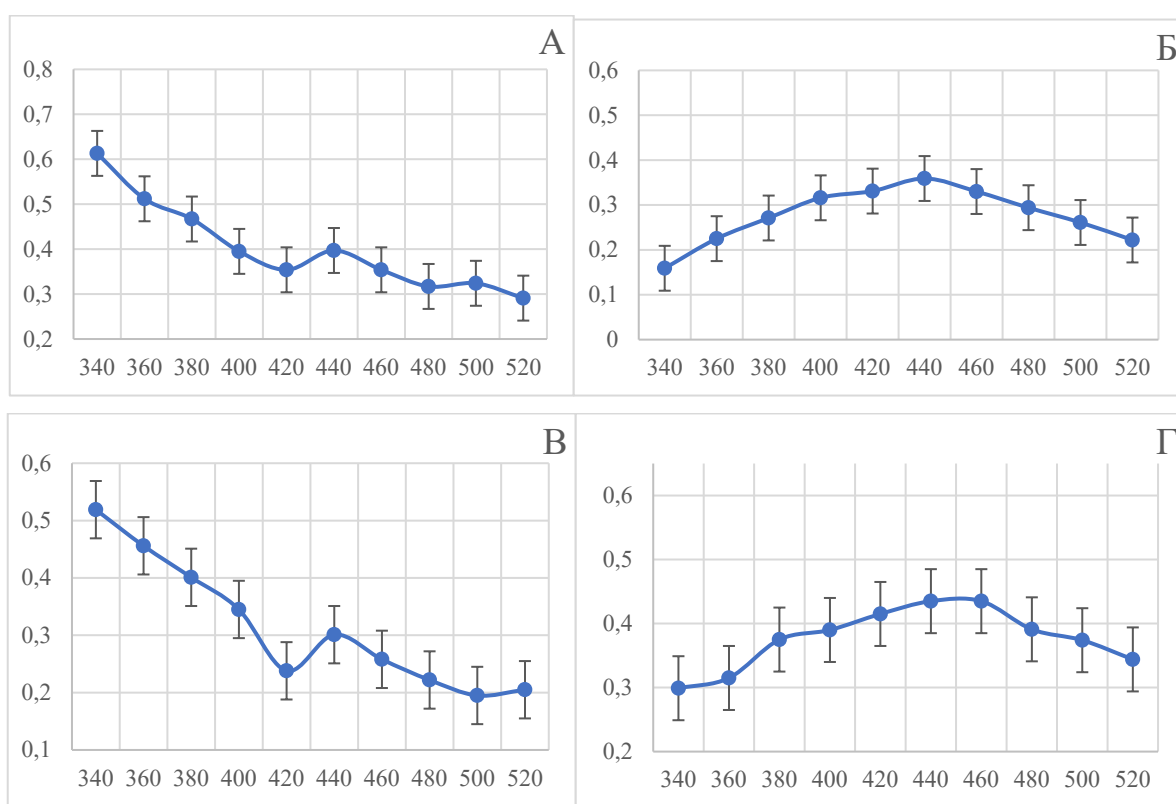


Рисунок 3.1 Спектр поглинання зразків супернатанту (А) та лізату (Б) штаму дріжджів Y-1995 та супернатанту (В) та лізату (Г) штаму дріжджів Y-530

Пік поглинання для зразку супернатанту Y-1995 складає 440 нм, а для зразку лізату – 440 нм. Проте, варто зазначити, що в зразку супернатанту є інший пік поглинання, інтенсивніший за 440 нм. Це може бути пояснено формуванням ароматичних сполук та білкових агрегатів. Тобто, у зразках лізату формується більше наночасток, ніж супровідних агрегатів.

Поглинання у зразків штаму Y-530 має значення 440 нм для супернатанту, у порівнянні з супернатантом Y-1995 [0,613; 0,291], оптична густина є дещо меншою [0,159; 0,222], що може свідчити про менші наночастки срібла. Лізат штаму Y-530 має пік плазмонного резонансу у межах 440-460 нм. Зазначені межі можна пояснити утворенням маси наночасток різного розміру.

Отримані результати мають закономірність, де крива поглинання супернатантів і лізатів обох штамів дріжджів є схожою між ними. Однак у лізатів пік поглинання є більш чітким, що підтверджується подальшими дослідженнями, про властивості часток.

### **3.3 Аналіз розмірів та форми наночасток срібла**

Результати аналізу наших зразків, саме наночасток лізату та супернатанту штамів Y-1995 та Y-530 показані у загальній таблиці (Табл. 3.2).

Позначення Пік 1 включає в себе зафіксовані частки найменшого розміру, Пік 2 і Пік 3 означають частки середньої та найбільшої величини. Розподіл – відсоткове значення концентрації часток певного розміру. Стандартна похибка позначає поняття стандартного відхилення.

Для більш ґрунтовного розуміння отриманих результатів аналізували значення індексу полідисперсності (Pdl), що є мірою розподілу часток у зразку. Чим менша полідисперсність, тим одноріднішим є розчин за розміром часток та їх формою [89]. Полідисперсність є низькою, коли її значення менше або дорівнює до 0,3 [90].

## Результати аналізу зразків наночасток штамів дріжджів Y-1995 та Y-530

№	Пік 1, нм	Розподіл, %	Стандартна похибка, нм	Пік 2, нм	Розподіл, %	Стандартна похибка, нм	Пік 3, нм	Розподіл, %	Стандартна похибка, нм
зразок Ag супернатант									
1995	277,5	100,0	98,7	0	0	0	0	0	0
530	353,2	94,6	106,2	11992,9	5,4	1160,3	0	0	0
зразок Ag лізат									
1995	174,9	91,8	63,7	12240,8	8,2	965,3	0	0	0
530	168,6	87,6	55,0	9,2	3,7	2,5	12405,3	8,5	784,7

Форму часток приблизно можна зрозуміти за показником *Z-average* (середній розмір). Вважається, що чим ближче це число до числа Пік, тим ближче форма частки до сферичної. Якщо ж вони взагалі не близькі, то частка скоріш за все має форму палички або це агрегат. Окрім того, було виявлено залежність концентрації та *Z-average*, де підвищення концентрації часток призводить до утворення агрегатів. Агрегати можна роз'єднати ультразвуком, проте до певної концентрації [91].

Отже, за результатами даного аналізу ми бачимо найменші наночастки у зразка Ag лізат 530 [9,16 нм], проте їх концентрація є низькою [3,68%], а полідисперсність є найбільшою у експерименті. Найбільш стабільні частки розміром [277,49 нм] виявились у Ag супернатант 530 з 100% концентрацією (табл.3.3).

На супернатантах обох штамів дріжджів синтезувались наночастки загалом з найнижчими значеннями полідисперсності, а залежності *Z-average* та Пік 1 схиляють до твердження, що форма близька до сферичності у всіх зразках.

У той час лізати мають неоднозначні результати, надвеликі частинки [12240,78; 12405,31] можуть сигналізувати як про агрегацію, так і про залишки поживного середовища або частини дріжджових клітин.

Виходячи з числових значень прослідковується закономірність, що штам 1995 синтезує більш однорідні частинки, розмір яких в основному коливається в межах

174,85-277,49 нм. А 530 синтезує ще більші НЧ у супернатанті, на лізаті ж одержуємо при концентрації 87,85% НЧ величиною 168,55 нм.

Таблиця 3.3

## Показники Z-average та індексу полідисперсності

	Z-ave, нм	PdI
Ag супернатант		
1995	255,5	0,2
530	379,0	0,1
Ag лізат		
1995	173,6	0,4
530	175,6	0,4

Таким чином супернатанти обох штамів надають більші часточки з меншою полідисперсністю, а лізати менші НЧ, проте з більшою полідисперсністю.

В залежності від цілей застосування даних НЧ можна вибрати очікувані характеристики розміру, форми та концентрації.

Літературні джерела зазначають, що розмір НЧ коливається у проміжку 1-100 нм [93]. При аналізі синтезованих нами наночастинок срібла за допомогою доступного аналізатора часток розміри їх виявились більшими (близько 168-353 нм), водночас було зафіксовано НЧ розміром близько 9 нм.

Оскільки наночастинки є високоактивними та дуже реакційноздатними, ми робимо припущення, що наночастинки могли з'єднатись у агломерати чи агрегати. Агломерати вважаються слабо зв'язаними сукупностями наночастинок, агрегати ж стійка та тісна структура, яку важко роз'єднати механічним шляхом. Можливі причини за яких могла статись агрегація:

- рН середовища наночастинок [94];
- температура суспензії НЧ [95];
- вплив світла (ультрафіолетового випромінювання).

Вплив рН середовища НЧ був яскраво показаний у дослідженні властивостей утворених агрегатів. Так, при більш кислому середовищі малі наночастинки (10 нм)

з'єднувались у агрегати розміром близько 200 нм (Рис. 3.2). Варто зазначити, що процес утворення саме цих агрегатів тривав протягом 16 днів.

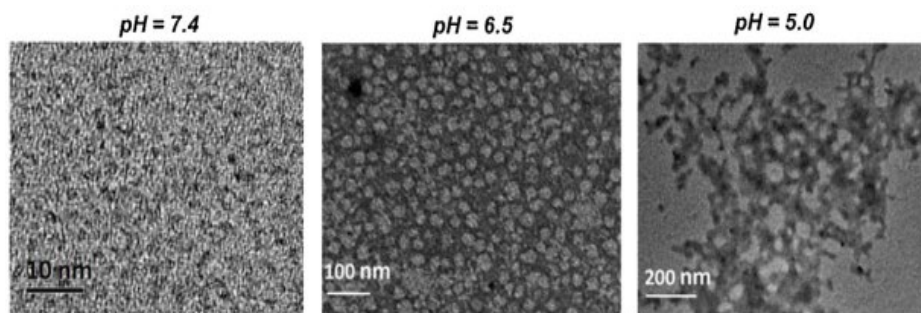


Рисунок 3.2. Градієнт впливу рН на середовище наночасток

Зв'язок температури на утворення агрегатів пояснюється Броунівським рухом, де підвищення температури призводить до збільшення інтенсивності даного явища. Тобто вірогідність стикнутися НЧ у середовищі значно більша, проте водночас хаотичний рух НЧ може покращити дисперсність суспензії [96].

Агломерати згадувались у дослідженні синтезованих наночасток срібла за допомогою рослини Нім (Азадірахта індійська), середній розмір їх НЧ становив 96,0–170,9 нм при дослідженні методом Динамічного розсіювання світла (DLS). Коментувався даний результат слабким зв'язком між колоїдними частинками [97].

Наночастинки легко агломерують або агрегують через ефект дозрівання Оствальда, наприклад у водній фазі. Ця нездатність природним чином підтримувати такі властивості ускладнює перевірку токсичності наноматеріалів в організмах

Проблема агломерації у тому що, наночастки у своїй більшості втрачають або послаблюються для антимікробної дії, також ускладнюється перевірка НЧ на цитотоксичність. Дана проблематика описана у дослідженні цитотоксичності наночастинок срібла на ембріонах Японської оризії (лат. *Oryzias latipes*).

Збільшення TEM-зображень показало (Рис. 3.3), що наночастки срібла (30-150 нм) були агломеровані або агреговані (рис. 2; a1-a3, b1-b4) або осідають як одна частинка.

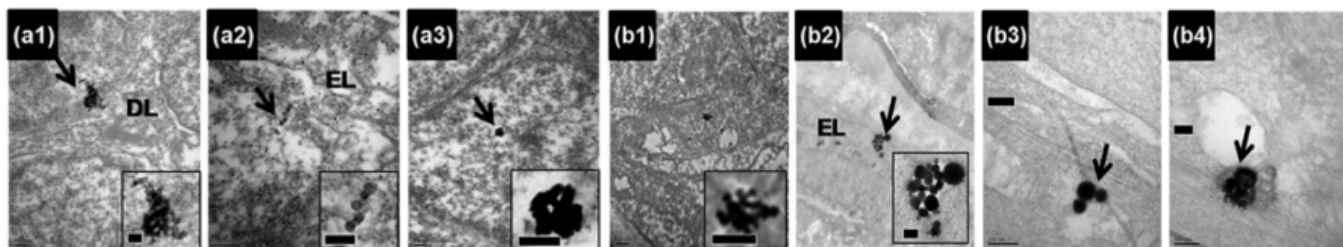


Рисунок 3.3. TEM-зображення органів ембріонів *Oryzias latipes* та включень наночасток срібла

Цікавою виявилась токсична дія срібла, яка збільшувалась саме при меншій концентрації (23%), ніж при більш вищому співвідношенні (40-100%) [98].

Для запобігання явища агломерації чи агрегації використовують метод вдосконалення НЧ, а саме приєднання до них поверхнево-активних речовин, частин полімерів або окремих хімічних молекул [99].

У дослідженні активності наночасток срібла підтверджено два шляхи дії колоїдного срібла: генерація активних форм кисню та вивільнення іонів  $\text{Ag}^+$ . Обидва ці процеси відбуваються на поверхні частинок, разом з тим руйнуючи бактерії. Дослідників зацікавило утворення аніону супероксиду ( $\text{O}_2^-$ ). При дії ультрафіолетового світла надлишки електронів братимуть участь у розщепленні молекулярного кисню, як наслідок утворення супероксиду.

Частинки  $\text{Ag}$  поєднують з молекулами диклофенаку та кетолаку (протизапальних засобів), що є носіями карбоксилатної групи ( $\text{COO}^-$ ). Синтез таких частинок проводився у присутності протизапальних засобів у темному місці, після синтезу зразки зберігались у темних склянках з мінімізацією доступу світла. Окрім того схожим чином синтезувались чисті НЧ. Антибактеріальна дія перевірялась за допомогою *S. aureus* (ATCC 6538) та *E. coli* (BW25113).



Завдяки трансмісійному електронному мікроскопу (Рис. 3.4) можна побачити різницю між зразками НЧ при однаковому збільшенні, де чітко видно, що частинки трьох типів синтезованих AgNP демонструють сфероїдну форму та розміри  $19-6,0$  нм (голі),  $8-3,0$  нм (з кетолаком) та  $11 \pm 6,0$  нм (з диклофенаком). Крім того, видно, що чисті мають схильність до агломерації, навіть осадження, тоді як диклофенак виявляє меншу тенденцію до агломерату і, отже, більш рівномірного розподілу в розмірах (Рис. 3.4).

Тобто з упевненістю можна стверджувати про те що, синтез у присутності покриттів може забезпечити електростатичні та електростеричні відштовхування між окремими частинками і запобігти їх агрегації.

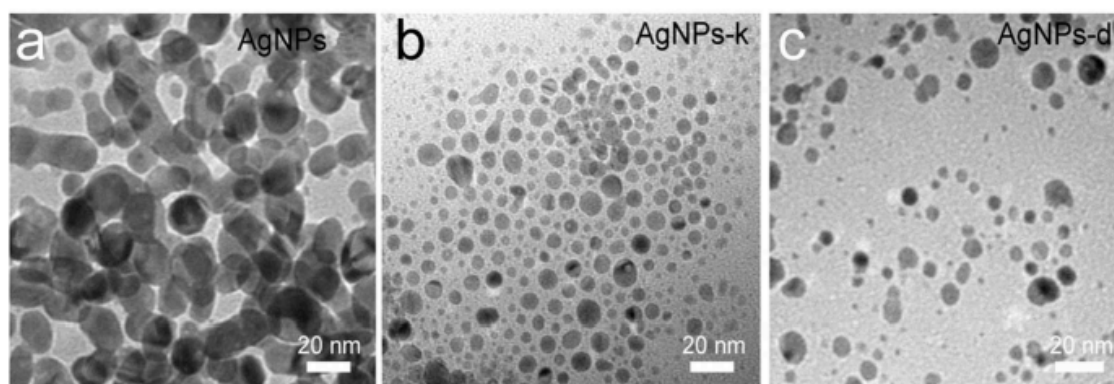


Рисунок 3.4. Зображення TEM синтезованих AgNP. а) чисті; б) кетолак і с) диклофенак.

Антибактеріальна дія даних НЧ здійснювалась на твердому середовищі та представлена у вигляді зон інгібування, де зв'язані НЧ представили найбільші ореоли інгібування, без суттєвої різниці між ними, ніж чисті НЧ. А мінімальна інгібуюча концентрація виявлена у НЧ-диклофенак для обох досліджуваних штамів, у той час як для чистих НЧ значення було у декілька разів більшим.

Значення підтверджують, що стабілізація НП відіграє визначну роль у зменшенні дози цих антибактеріальних засобів. Незважаючи на збільшення дози чистих AgNP (100 мкг/мл проти 50 мкг/мл зв'язаних НЧ), не вдалося досягти

еквівалентності з відсотком бактеріального гальмування, у чистих НЧ відсоток був вищий [95].

Інше глибоке дослідження [94] стверджує, що агрегацію можна використовувати для доставки ліків та боротьби з пухлинами. Ідея полягає в тому що, малі наночастинки мають високу активність, однак не затримуються в місцях пухлини, тоді як великі частинки можуть накопичуватися в місцях пухлини, але не можуть проникнути глибоко і вбити пухлинні клітини зсередини. Як одне з найважливіших фізико-хімічних властивостей наночастинок, розмір відіграє важливу роль не лише у локалізації пухлин, але впливає на поведінку наночастинок від початку до кінця терапії. Мононуклеарна фагоцитарна система людини є першим бар'єром для наночастинок, які захоплюються за допомогою фагоцитозу та легко секвеструється печінкою та нирками відповідно. А от частинки розміром від 200 нм до 1,2 мкм могли проникнути через пори судин і потрапити всередину пухлинних ділянок. Зазначається, що після потрапляння в пухлини великі наночастинки розміром близько 150 нм є доцільним вибором для утримання, а малі наночастинки (10 нм) виявляють таланти глибоко проникнення.

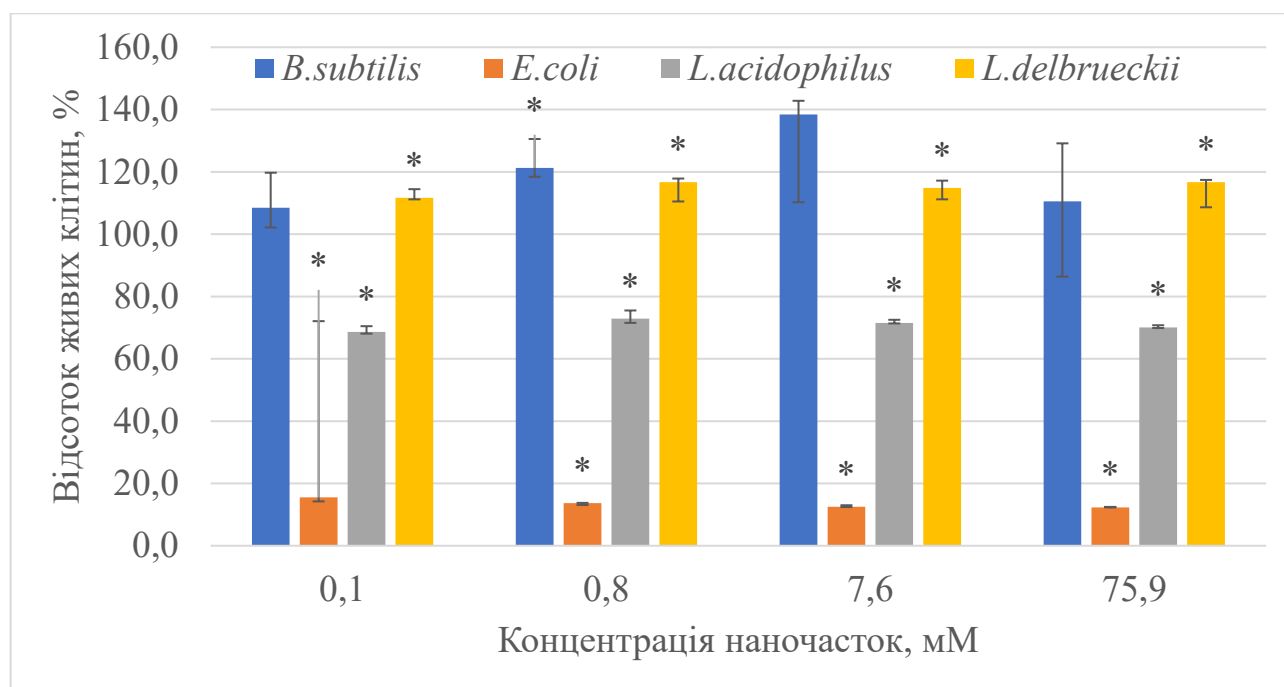
Для того щоб використати дані властивості, було розроблено різні способи «дизайну». Так би мовити інтелектуальні наночастинки можуть агрегуватись у самій клітині до великих розмірів, початковий розмір яких зазвичай малий, що й потрібно для глибокого проникнення.

Щоб контролювати агрегацію застосовують приєднання спеціальних матеріалів або функціональні групи, що спеціально зазнаються перетворень через водневий зв'язок, гідрофобні взаємодії тощо. До таких стимулів утворення наноагрегатів відносяться ферменти, зміна значення рН, світлоіндукована агрегація, приєднання певного ряду амінокислот (для доставки ліків).

Як висновок, можемо припустити, що синтезовані нами великі наночастинки самовільно сформували агрегати чи агломерати, але наведені вище дослідження допомагають зрозуміти дані явища та попередити подібну проблематику.

### 3.4 Антибактеріальна дія синтезованих наночастинок

При дослідженні антибактеріальної дії синтезованих наночастинок зі зразку супернатанту дріжджів *S. cerevisiae* 1995 (Рис. 3.5) було встановлено, що найбільша цитотоксична дія проявилася проти штаму *E. coli*. Відсоток живих клітин у всіх досліджених концентраціях (від 0,1 до 75,9 мМ) становить 12,3-15,5% ( $p < 0.05$ ).



$p < 0,05$

Рис. 3.5. Антибактеріальна дія наночастинок, отриманих зі зразку супернатанту дріжджів *S. cerevisiae* 1995

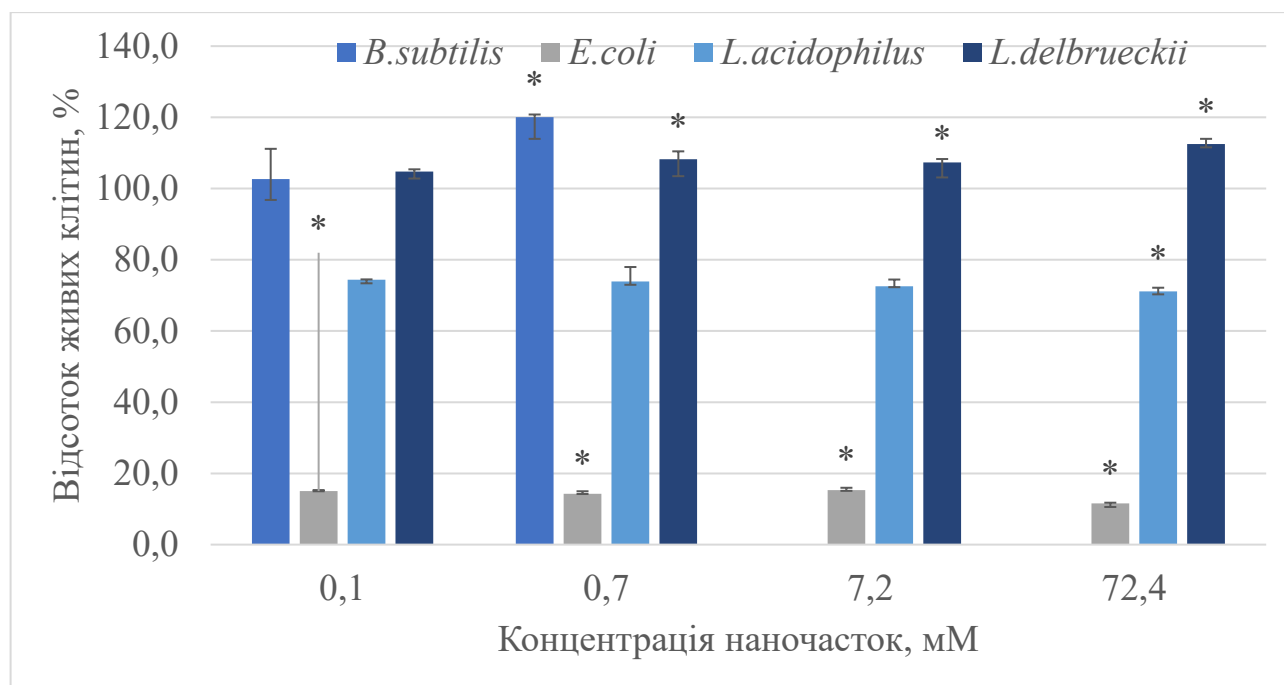
На життєдіяльність клітин штаму *B. subtilis* синтезовані за допомогою супернатанту *S. cerevisiae* 1995 наночастки срібла не впливали. Лише, на 21,3% відбулося підвищення показника відсотку живих клітин при дослідженні отриманих наночастинок в концентрації 0,8 мМ.

При дослідженні впливу наночастинок срібла з супернатанту дріжджів *S. cerevisiae* 1995 на життєдіяльність *L. acidophilus* було виявлено незначне пригнічення – в

середньому у всіх досліджених концентраціях спостерігали зменшення показника відсотку живих клітин на 27,1-31,4 %.

Проти бактеріальних клітин *L. delbrueckii* цитотоксичної дії виявлено не було. Проте, при дослідженні впливу наночастинок срібла з супернатанту дріжджів *S. cerevisiae* 1995 в концентрації 0,1, 0,8 та 7,6 мМ було показано збільшення життєдіяльності на 11,7 %, 16,7% та 14,8% відповідно ( $p < 0.05$ ).

Результати дослідження наночастинок зі зразку Y-530 супернатанту (Рис. 3.6) також показали про значне пригнічення життєдіяльності штаму *E. coli*. Відсоток живих клітин проти контролю у всіх концентраціях НЧ має значення 15,0-11,6%.



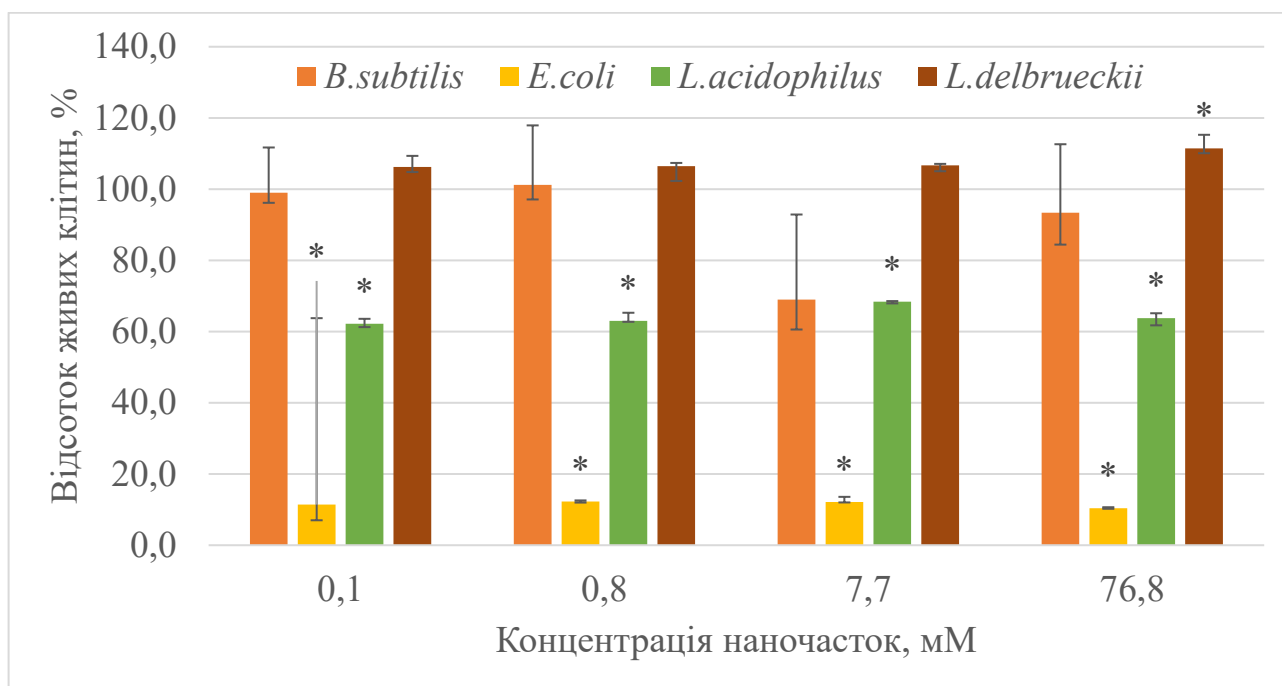
$p < 0,05$

Рис. 3.6. Антибактеріальна дія наночастинок, отриманих зі зразку супернатанту дріжджів *S. cerevisiae* 530

Життєдіяльність *Bacillus subtilis* підвищилась на 2,7-20,1% у концентраціях 0,1 мМ і 0,7 мМ. Відсоток живих клітин при 7,2 мМ та 72,4 мМ був у декілька разів більший, що може пояснюватись помилкою при внесенні культур у лунки.

Наночастки срібла супернатанту дріжджів *S. cerevisiae* 530 знизили життєдіяльність *L. acidophilus*, медіана відсотку живих клітин у зразках – 73,2 %. *L. delbrueckii* не зазнали цитотоксичної дії у всіх концентраціях супернатанту Y-530.

Наночастинки срібла з лізатів культур дріжджів *S. cerevisiae* Y-1995 та Y-530 мають дещо інший антибактеріальний вплив. Так, частки лізату *S. cerevisiae* Y-1995 (Рис 3.7) змогли знизити життєдіяльність *Bacillus subtilis* при концентраціях 7,6 мМ та 76,8 мМ на 31% та 6% відповідно. Менші концентрації (0,1 та 0,8) не спричинили цитотоксичний вплив.



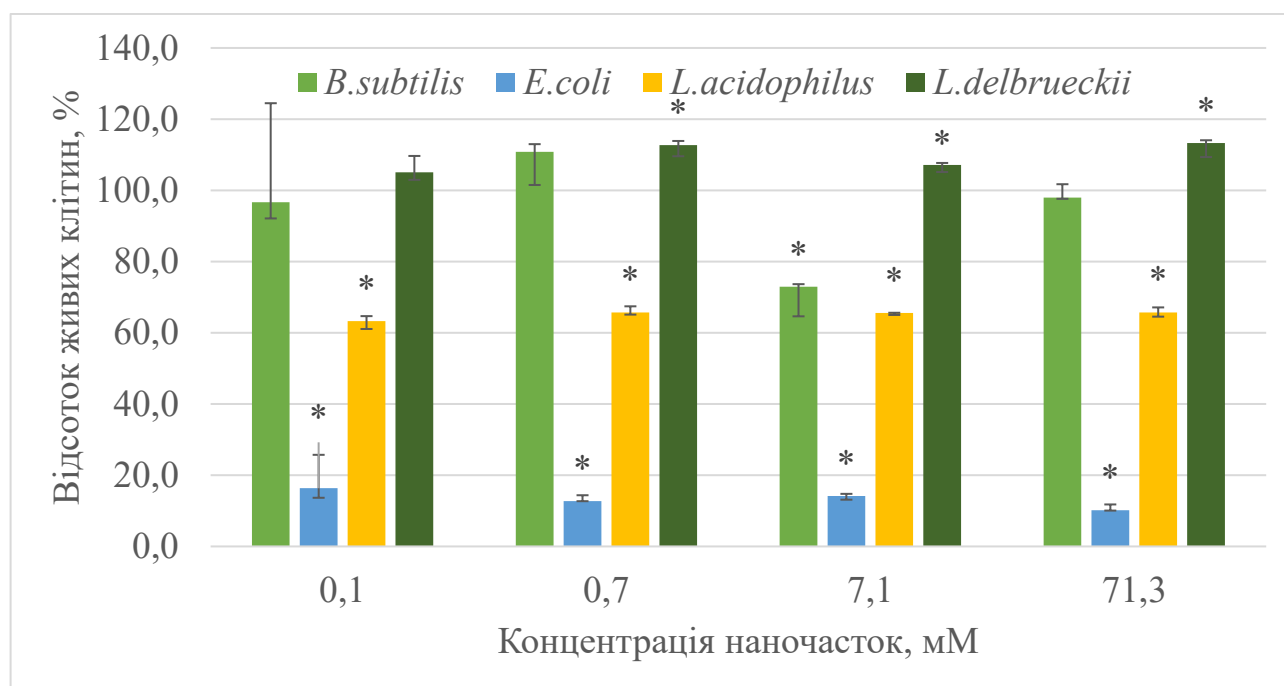
$p < 0,05$

Рис. 3.7. Антибактеріальна дія наночастинок, отриманих зі зразку лізату дріжджів *S. cerevisiae* 1995

*E. coli* зазнала найбільшого антибактеріального ефекту серед усіх інших типів наночастинок срібла у даному експерименті, саме на НЧ лізату *S. cerevisiae* Y-1995. Пригнічення життєдіяльності цим типом частинок, призвело до зниження відсотку живих клітин в середньому на 88,2 % відносно контролю.

Аналіз результатів про *L. acidophilus* показав цитотоксичну дію у зразку наночасток срібла лізату *S. cerevisiae* Y-1995 – до 62,2-68,4 % пригнічення живих клітин. *L. delbrueckii* виявились стійкими і у цьому досліді, але відносно інших зразків наночасток середнє зниження було у проміжку близько 5 %.

Антибактеріальна дія наночасток зі зразку 530 лізату (Рис. 3.8) проти патогенних штамів та нормофлори людини мала вплив на всі бактеріальні культури.



$p < 0,05$

Рис. 3.8. Антибактеріальна дія наночасток, отриманих зі зразку лізату дріжджів *S. cerevisiae* 530

Інгібування *E. coli* зразком лізату 530 коливається у межах 83,7-89,8 %. У той час, *B. subtilis* дещо втрачав свою життєздатність у концентраціях НЧ срібла 0,1 мМ, 7,1 мМ та 71,3 мМ на 3,35 %, 27,07 % та 2,01 % відповідно. А при 0,7 мМ відсоток живих клітин навпаки збільшився відносно контролю на 10,8 %.

*L. acidophilus* втрачає свою життєздатність, як і в інших типах наночасток. Інгібуванню культура завдяється на всіх значеннях концентрації зі зразку 530 лізату,

а саме при 0,1 мМ, 0,7 мМ, 7,1 мМ і 71,3 мМ показники виживання падають до 63,3 %, 65,7 %, 65,6 % і 65,7 %.

Унікальну в даному дослідження стійкість до наночастинок срібла синтезованих на *S. cerevisiae* проявила культура *L. delbrueckii*. Штам цих бактерій покращив свою життєдіяльність відносно контролю в середньому на 9,9 %.

Як висновок, з вище згаданих результатів, ми підтверджуємо гіпотезу про антибактеріальну дію наночастинок срібла створених зеленим синтезом за допомогою штамів дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Y-1995 та Y-530.

Окрім зазначених висновків, виявлено антибактеріальну дію наночастинок срібла на представників роду *Lactobacillus*, що варто дослідити більш глибоко.

Як виявилось це не поодиноким випадком. Схоже дослідження проводилось на штаммах *L. bulgaricus*, *L. casei*, *E. coli* та *S. aureus*. Перевірялась антибактеріальна дія наночастинок срібла. Бактерії *L. bulgaricus* та *L. casei* вмирали при концентрації НЧ 3 ppm, у той час як *E. coli* та *S. aureus* показують незначний ефект.

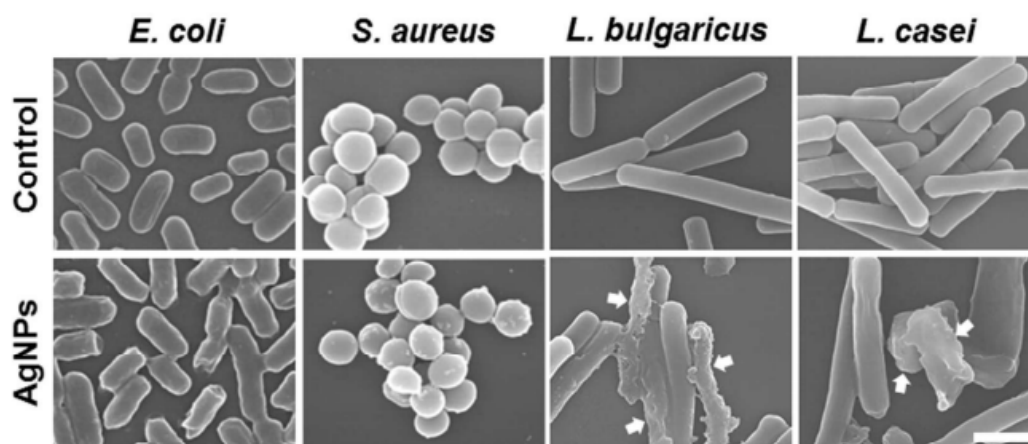


Рисунок 3.9. Зображення впливу наночастинок срібла на клітині

При 7 ppm близько 80% *L. bulgaricus* і *L. casei* були вбиті, на відміну від 30% *E. coli* та *S. aureus*. Для розуміння як саме НЧ срібла вплинули на лактобацили використали метод SEM (скануюча електронна мікроскопія), який показав сильну деформацію клітин *L. bulgaricus* та *L. casei*, на відміну від *E. coli* та *S. aureus* (Рис.

3.9). Вони стверджують, що AgNP можуть дестабілізувати проникність клітинної мембрани [101].

У дослідженні антибактеріальних властивостей НЧ срібла на поширені штами ротової порожнини *S. mutans*, *L. casei*, *S. aureus*, *E. coli*, також найсильніший вплив НЧ зазнав *L. casei* [ $5.0 \pm 0.27$  мм паперового диску з НЧ срібла], у порівнянні з іншими культурами *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli* [ $4.0 \pm 0.16$  мм;  $3.0 \pm 0.22$  мм;  $2.0 \pm 0.15$  мм] відповідно [102].

Проте в організмі людини популяція основних груп бактерій (*Bacteroides*, *Enterobacteriaceae* та *Lactobacillus*) при впливі наночасток срібла змінювалась відносно розташування даних груп бактерій. Так у першому сегменті товстої кишки наночастки знизили популяцію *Enterobacteriaceae* та *Lactobacillus* більш ніж у 100 разів після лікування. Під час проходження через систему GIS (симулятора транзиту товстої кишки) клітинна концентрація популяцій *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae* і *Lactobacillus* значно зросла [103].

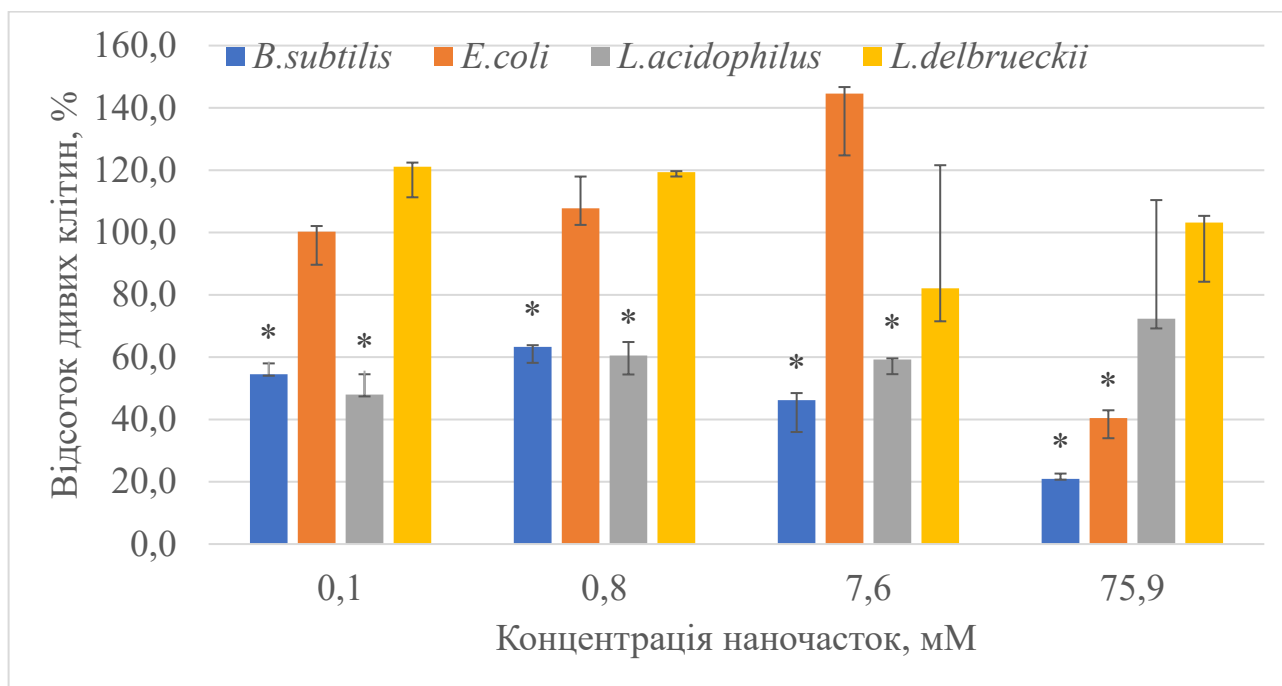
Отже, бактерії роду *Lactobacillus* дійсно сильно піддаються дії наночасток срібла, однак у живому організмі існують різні популяції пробіотиків, які можуть підтримувати один одного.

### **3.5 Антиадгезивна дія наночасток срібла на обрані штами бактерій**

Адгезія клітин – це властивість зчеплення клітини з поверхнею на якій вона живе. Ця здатність є дуже важливою для нормофлори людини, особливо для лактобактерій, що допомагають у травленні. Тому ми звернули увагу на антиадгезивну дію наночасток синтезованих нами.

Отже, за нашими розрахунками *L. delbrueckii* зберігає свою стійкість та адгезивність при концентраціях наночасток срібла зі зразка супернатанту штаму Y-1995 (Рис. 3.10), які мають значення 0,1 мМ, 0,8 мМ та 75,9 мМ [121,1%; 119,4%; 103,2%]. Лише при концентрації 7,6 мМ прикріплення клітин знизилось до 82,1 %.





$p < 0,05$

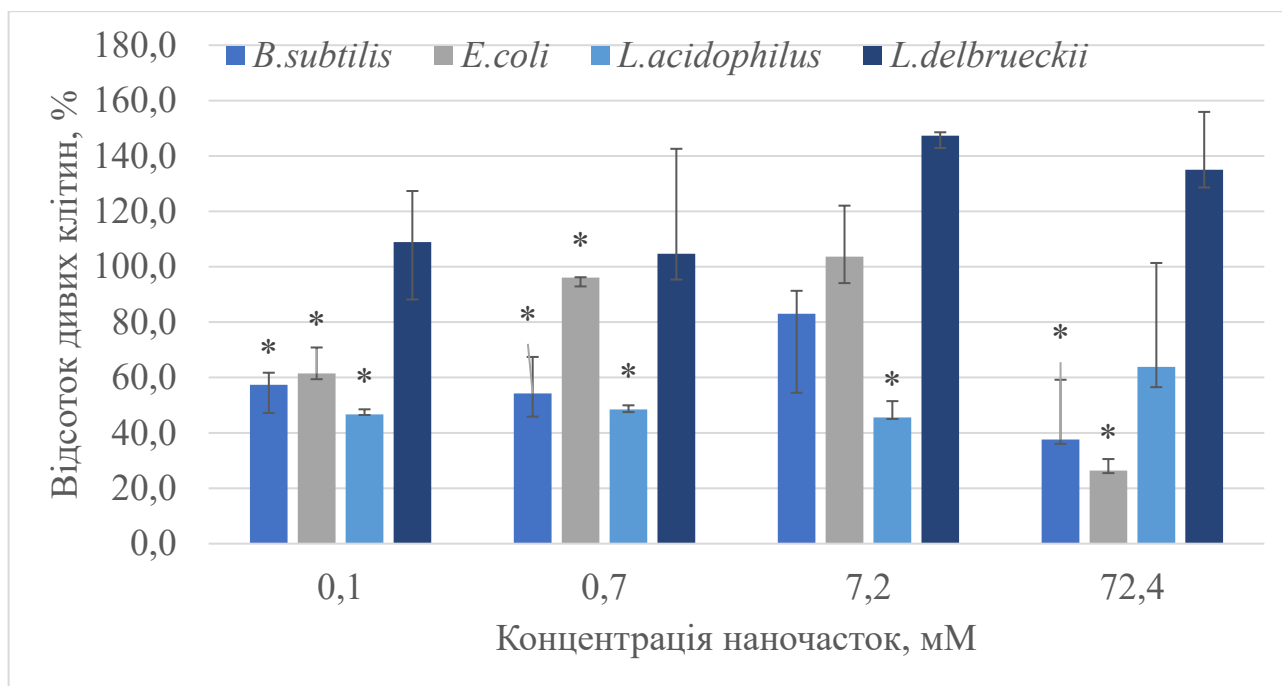
Рис. 3.10. Антиадгезивна дія наночастинок, отриманих зі зразку супернатанту дріжджів *S. cerevisiae* 1995

*E. coli* краще прикріплювалась відносно контролю клітин за наявності наночастинок у менших концентраціях [100,3 %; 107,8%; 144,6%], тільки при найвищому значенні адгезія знизилась до 40,4 % наявних живих клітин.

Найменш стійкими до адгезивної дії наночастинок срібла виявились культури *B. subtilis* та *L. acidophilus*.

*B. subtilis* втратили свою здібність до адгезії при різних концентрації НЧ у деяких зразках більше ніж удвічі-тричі. Адгезивність бактерій падає з підвищенням концентрації НЧ срібла, так при значеннях 0,1 мМ, 0,8 мМ, 7,6 мМ та 75,9 мМ відсоток прикріплених клітин становить 54,5%, 63,3%, 46,25%, 20,9%.

Відносно *B. subtilis*, культура бактерій *L. acidophilus* трохи краще витримують наночастинок. Градієнт адгезивності відповідає значенням: 48,0%, 60,5%, 59,2% та 72,4%.



$p < 0,05$

Рис. 3.11. Антиадгезивна дія наночастинок, отриманих зі зразку супернатанту дріжджів *S. cerevisiae* 530

Результати дослідження наночастинок зі зразку Y-530 супернатанту (Рис. 3.11) також показали про значну адгезію штаму *E. coli*. Відсоток живих клітин проти контролю у концентраціях НЧ (0,1 мМ та 72,4 мМ) має значення 61,5% та 26,4%. А при середніх концентраціях (0,7 мМ та 7,2 мМ) здатність до прикріплення майже не змінилась (96,1% та 103,7%).

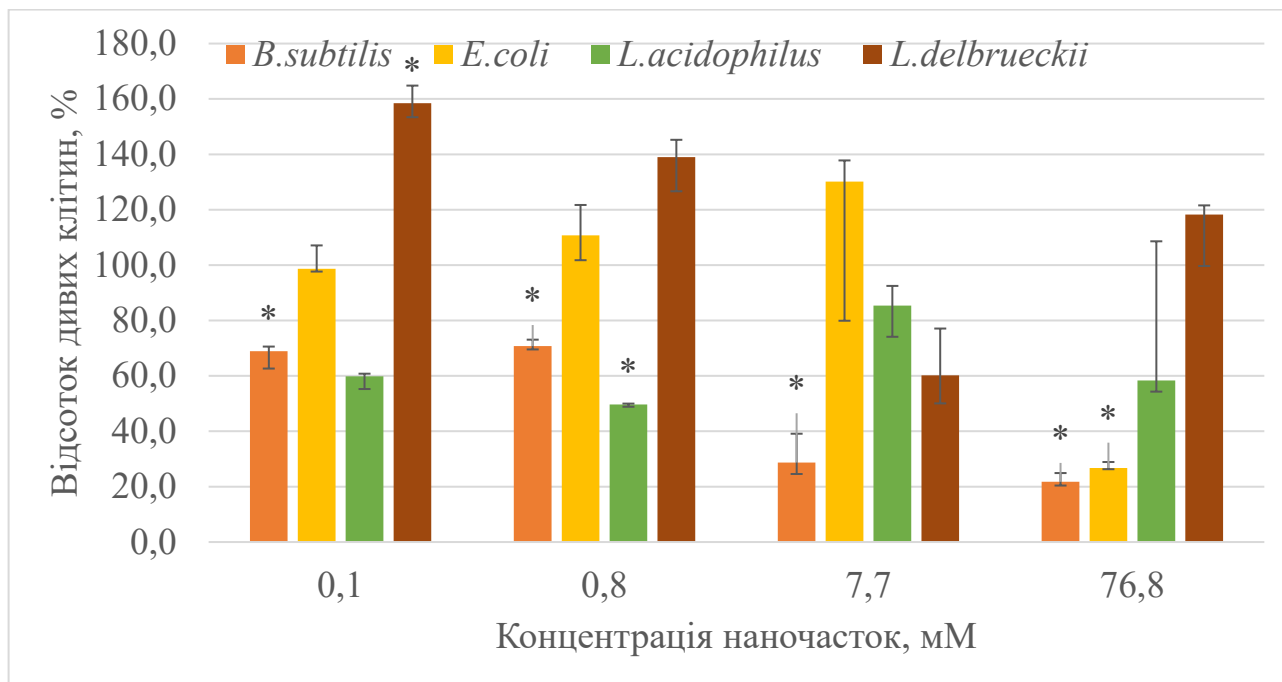
Адгезія *Bacillus subtilis* була суттєво знижена у всіх концентраціях зі зразку супернатанту 530, вона склала 57,4%, 54,2%, 83,0% та 37,6%.

Наночастки срібла супернатанту дріжджів *S. cerevisiae* 530 теж знизили прикріплення клітин *L. acidophilus*, медіана відсотків живих клітин у зразках 52,4%.

*L. delbrueckii* не постраждали від дії даних наночастинок та навіть підвищили свою адгезивність відносно контролю на 4,7-47,3 %.

У наступному зразку наночасток срібла зі зразку лізату дріжджів *S. cerevisiae* 1995 (Рис. 3.12) було встановлено наявну антиадгезивну дію на бактерії *B. subtilis*, *E. coli*, *L. acidophilus* та *L. delbrueckii* в різній мірі.

Прикріплення клітин *B. subtilis* знижувалось зі збільшенням концентрації НЧ (0,1 мМ, 0,8 мМ, 7,7 мМ та 76,8 мМ) та дорівнює 68,9 %, 70,8 %, 28,7 % і 21,8%.



$p < 0,05$

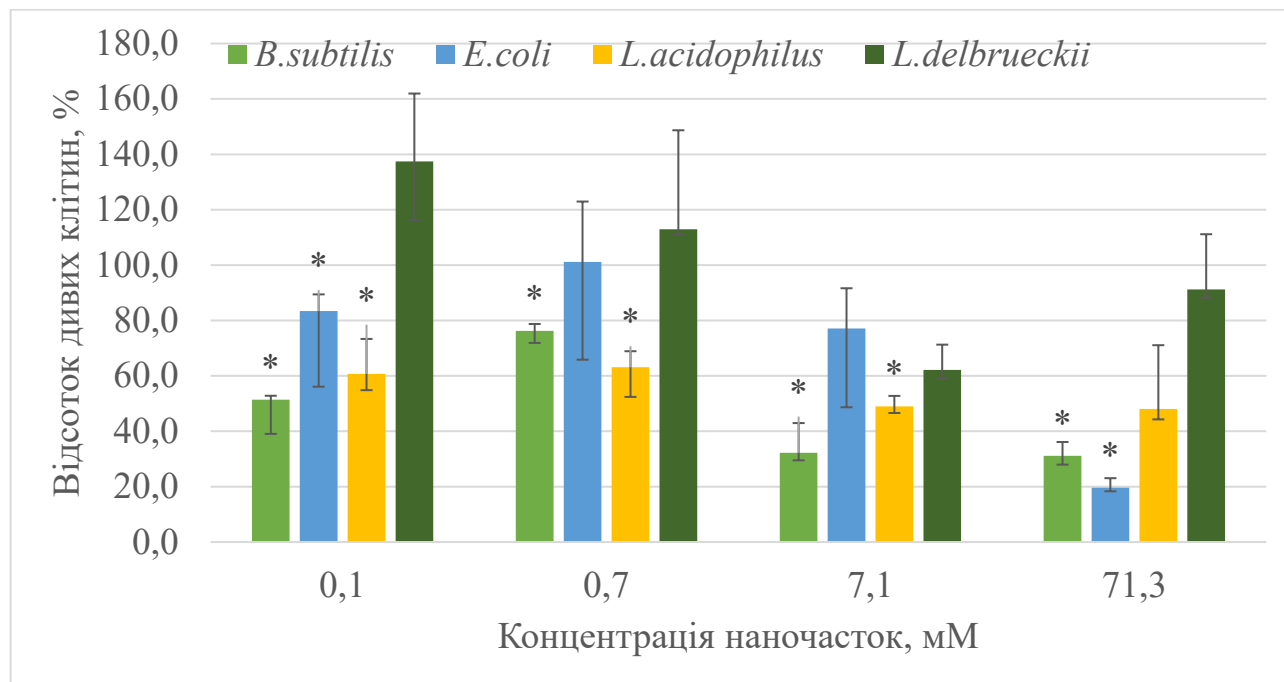
Рис. 3.12. Антиадгезивна дія наночасток, отриманих зі зразку лізату дріжджів *S. cerevisiae* 1995

*E. coli* проявила стійкість до менших концентрацій [98,7 %; 110,8 %; 130,1%], однак здалась при найвищій [26,7 %].

Відсоток живих прикріплених клітин *L. acidophilus* не залежав від концентрацій наночасток у лізаті 1995, однак присутнє зниження адгезії. Показники відсотку живих клітин коливались у порядку – 59,9 %, 49,7 %, 85,4 %, 58,4%.

Культура *L.delbrueckii* піддалась наночасткам срібла тільки при концентрації 7,6 мМ (60,2 %), при інших значеннях адгезія була підвищена [158,4%, 139,0 %, 118,2 %] відносно контролю.

При аналізі наночасток зі зразку лізату дріжджів *S. cerevisiae* 530, основна маса клітин виявилась пригніченою та зі зниженою адгезією (Рис. 3.13).



$p < 0,05$

Рис. 3.13. Антиадгезивна дія наночасток, отриманих зі зразку лізату дріжджів *S. cerevisiae* 530

Адгезія *B. subtilis* знижувалась непропорційно збільшенню концентрації. При значеннях концентрації 0,1 мМ, 0,7 мМ, 7,1 мМ та 71,3 мМ, відсоток виявлених живих клітин склав 51,4 %, 76,3 %, 32,2 % та 31,1 % відповідно.

Стійкість *E. coli* з'явилась при значенні 7,1 мМ [101,2 %], а при найбільшій концентрації 71,3 мМ виявився найменший показник живих клітин з усіх зразків дослідження про антиадгезивні властивості наночасток срібла [19,6 %].

Прикріплення *L. acidophilus* у середньому знижувалась майже вдвічі (медіана відсоткових значень 45,1 %).

Бактерії *L.delbrueckii* піддалися антиадгезивній дії наночастинок при вищих концентраціях 7,1 мМ та 71,3 мМ [62,2 %; 91,2 %], а при менших 0,1 мМ та 0,7 мМ наростили біомасу зі збільшеною адгезією [137,5 %; 113,0 %].

### **Висновки до розділу 3**

За допомогою УФ-спектрофотометричний методу ми змогли підтвердити наявність наночастинок у зразках супернатантів та лізатів *S. cerevisiae* Y-1995 та Y-530, де значення плазмонного резонансу відповідає літературним даним (440 нм).

При визначення концентрації іонів срібла, що містяться в досліджуваних зразках, було виявлено, що зразки наночастинок, отримані від супернатанту та лізату *S. cerevisiae* Y-1995 мають менші втрати іонів срібла в порівнянні зі зразками, отриманими від супернатанту та лізату *S. cerevisiae* Y-530. Можна сказати, що найкращим зразком, що зберіг найвищу концентрацію іонів, виявився зразок наночастинок срібла, отриманий від *S. cerevisiae* Y-1995.

Завдяки аналізатору розміру та форми частинок *Bettersizer* змогли визначити, що форма усіх НЧ наближається до сферичної, а розміри наночастинок відрізняються залежно від зразку, де їх розмір коливається від 9 нм до 353 нм. Оскільки загальновідоме визначення про розмір НЧ 1-100 нм, ми припустили, що завдяки великій активності наночастинок вони могли агрегувати чи створити агломерати. У розділі було запропоновано вирішення даної проблеми за допомогою регуляції параметрів зеленого синтезу.

Найбільш чутливим до антибактеріального впливу НЧ срібла був штам *E. coli* усіх зразків та концентрацій, найстійкіші виявились *B. subtilis* та *L.delbrueckii*, а *L. acidophilus* мав дещо гірші показники виживання. Виражена антиадгезивна дія була у *B. subtilis*, *L. acidophilus*, у той час *L.delbrueckii* надзвичайно стійка у всіх зразках НЧ

та концентраціях (живі клітини 60-147%). *E. coli* мала меншу стійкість у порівнянні з *L.delbrueckii*, особливо при найвищій концентрації НЧ (75,9 мМ).

Нас турбувала досить сильна дія НЧ на штами нормофлори людини, однак схожі дослідження підтвердили наші результати, де виявили, що популяції пробіотиків у живому організмі можуть підтримувати один одного.

Отже, синтезовані НЧ можуть стати перспективою для створення антибактеріальних препаратів, з антиадгезивними властивостями, проте необхідні більш глибокі дослідження цитотоксичної дії таких частинок.

## ВИСНОВКИ

В даній роботі було синтезовано наночастки срібла зеленим методом за допомогою дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* штамів Y-1995 та Y-530.

1. Наявність наночастинок в синтезованій суспензії була доведена УФ-спектроскопією. Всі досліджені зразки мали пік поглинання на 440 нм, що відповідає плазмонному резонансу наночастинок срібла.

2. При дослідженні розмірів синтезованих наночастинок, встановили, що при використанні лізатів дріжджів можна отримати наночастки менших розмірів (9,16-174,85 нм), проте вони будуть характеризуватися більшою полідисперсністю (0,4). При використанні супернатантів можна отримати більші за розміром частки (277,49-353,16), але з меншою полідисперсністю (0,1-0,2).

3. Всі досліджені зразки наночастинок, отриманих з лізатів і супернатантів *Saccharomyces cerevisiae* Y-1995 та Y-530 проявили найбільшу антибактеріальну дію проти *Escherichia coli* у всіх досліджених концентраціях. Проте, варто зазначити, що всі досліджені зразки знижували життєздатність клітин *L. acidophilus*, що може створити обмеження для можливого використання зелених наночастинок срібла в антибактеріальній терапії.

4. При дослідженні антиадгезивної дії синтезованих наночастинок встановлено, що зразки, отримані з супернатанту та лізату дріжджів *S. cerevisiae* 530 проявляють найвищу активність проти *Escherichia coli* в концентрації 01 мМ. Проте, одночасно з цим всі досліджувані зразки володіють високою антиадгезивною дією проти *B. subtilis* та *L. acidophilus* у всіх досліджуваних концентраціях.

5. Таким чином, використання супернатантів і лізатів *S. cerevisiae* штамів Y-1995 та Y-530 дозволяє отримувати наночастки з антибактеріальною дією, проте питання токсичності та безпечності таким наночастинок потребує більш глибокого вивчення.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Hutchings M., Truman A., Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*. 2019. Vol. 51. P. 72–80. doi:10.1016/j.mib.2019.10.008.
2. World Health Organization (WHO). Antimicrobial Resistance: *Global Report on Surveillance*. Geneva, Switzerland. 2014.
3. Willyard C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature*. 2017. Vol. 543(7643). P. 15–15. doi:10.1038/nature.2017.21550.
4. Muhammad U., Arsalan A., Muhammad U., Sajal S. Recent Advances in Nanotechnology-Aided Materials in Combating Microbial Resistance and Functioning as Antibiotics Substitutes. *International Journal of Nanomedicine*. 2020. Vol. 15. P. 7329-7358. doi:10.2147/IJN.S265934
5. Gupta A., Mumtaz, S., Li C.-H., Hussain I., Rotello V. M. Combatting antibiotic-resistant bacteria using nanomaterials. *Chemical Society Reviews*. 2018. Vol. 48. P. 415-427. doi:10.1039/c7cs00748e.
6. Ahmad S., Munir S., Zeb N., Ullah A., Khan B., Ali J., ... Ali S. Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles — an ecofriendly approach. *International Journal of Nanomedicine*. 2019. Vol. 14. P. 5087–5107. doi:10.2147/ijn.s200254.
7. Gupta A., Landis R.F., Rotello V.M. Nanoparticle-based antimicrobials: Surface functionality is critical. *F1000Research*. 2016. Vol. 5. P. 364. doi:10.12688/f1000research.7595.1.
8. Berry V., Gole A., Kundu S., Murphy C. J. and Saraf R. F. Deposition of CTAB-Terminated Nanorods on Bacteria to Form Highly Conducting Hybrid Systems. *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127. P. 17600–17601. doi:10.1021/ja056428l.
9. Mughal B., Zaidi S. Z. J., Zhang X., Hassan S. U. Biogenic Nanoparticles: Synthesis, Characterisation and Applications. *Applied Sciences*. 2021. Vol. 11(6). P. 2598. doi:10.3390/app11062598.



10. Wang L., Hu C., Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *Nanomed.* 2017. Vol.12. P. 1227–1249. doi:10.2147/IJN.S121956.
11. Manoranjan A., Sweta P., Devyani S., Tapan K. P., Bairagi C. M., Krishna P., Bibekanand M., Suman J. Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface. *Scientific Reports.* 2015. Vol. 5. Article number: doi:14813. 10.1038/srep14813.
12. Fayaz A. M., Balaji K., Girilal M., Yadav R., Kalaichelvan P. T., Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2010. Vol. 6(1). P. 103–109. doi:10.1016/j.nano.2009.04.006
13. Bingyun L., Thomas J W. Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections: BACTERIA ANTIBIOTIC RESISTANCE. *Journal of Orthopaedic Research.* 2017. Vol. 36(1). doi:10.1002/jor.23656.
14. Mohammad J H., Katharina M F., Ali A. A., Dorleta J., Idoia R., Teofilo R., Vahid S., Wolfgang J P., Morteza M. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 2012. Vol. 10. P. 499-511. doi:10.1016/j.tibtech.2012.06.004.
15. Gupta A., Mumtaz S., Li C.-H., Hussain I., Rotello V. M. Combatting antibiotic-resistant bacteria using nanomaterials. *Chemical Society Reviews.* 2018.Vol. 48. P. 415. doi:10.1039/c7cs00748e.
16. Rai M. K., Deshmukh S. D., Ingle A. P., Gade A. K. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology.* 2012. Vol. 112(5). P. 841–852. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x.
17. Dizaj S. M., Lotfipour F., Barzegar-Jalali M., Zarrintan M. H., Adibkia K. (2014). Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C.* 2014. Vol. 44. P. 278–284. doi:10.1016/j.msec.2014.08.031.

18. Suresh K. K., Tae-Jung P., Jigneshkumar V. R., Janardhan R. K. Antimicrobial activity of silver nanoparticles. *Nanoparticles in Pharmacotherapy*. 2019. P. 461-484. doi: 10.1016/B978-0-12-816504-1.00009-0.
19. Allahverdiyev A. M., Abamor E. S., Bagirova M., Rafailovich M. Antimicrobial effects of TiO<sub>2</sub> and Ag<sub>2</sub>O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmanian parasites. *Future Microbiology*. 2011. Vol. 6(8). P. 933–940. doi:10.2217/fmb.11.78.
20. Lu Z., Rong K., Li J., Yang H., Chen R. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2013. Vol. 24(6). P. 1465–1471. doi:10.1007/s10856-013-4894-5.
21. Iravani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*. 2011. Vol. 13(10). P. 2638. doi:10.1039/c1gc15386b.
22. Priyanka S., Yu-Jin K., Dabing Z., Deok-Chun Y. Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends Biotechnol.* 2016. Vol. 34(7). P. 588-599. doi:10.1016/j.tibtech.2016.02.006.
23. Li J., Li Q., Ma X., Tian B., Li T., Yu J., ... Hua Y. Biosynthesis of gold nanoparticles by the extreme bacterium *Deinococcus radiodurans* and an evaluation of their antibacterial properties. *International Journal of Nanomedicine*. 2016. Vol. 11. P. 5931–5944. doi:10.2147/ijn.s119618.
24. Tsekhmistrenko S. I., Bityutskyy V. S., Tsekhmistrenko O. S., Horalskyi L. P., Tymoshok N. O., Spivak M. Y. Bacterial synthesis of nanoparticles: A green approach. *Biosystems Diversity*. 2020. Vol. 28(1). P. 9–17. doi:10.15421/012002.
25. Hallol M. Studies on Bacterial Synthesis of Silver Nanoparticles Using Gamma Radiation and Their Activity against Some Pathogenic Microbes. *Department of Microbiology and Immunology*, Cairo University. 2013.
26. Shahverdi A.R., Minaeian S., Shahverdi H.R., Jamalifar H., Nohi -A-A. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: a novel

- biological approach. *Process Biochem.* 2007. Vol. 42(5). P. 919–923. doi:10.1016/j.procbio.2007.02.005.
27. Parikh R.Y., Ramanathan R., Coloe P.J. Genus-wide physicochemical evidence of extracellular crystalline silver nanoparticles biosynthesis by *Morganella* spp. *PLoS One*. 2011. Vol. 6(6). Article: e21401. doi:10.1371/journal.pone.0021401.
  28. Gurunathan S., Kalishwaralal K., Vaidyanathan R., et al. Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids Surf B*. 2009. Vol. 74(1). P. 328–335. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.07.048.
  29. Shivaji S., Madhu S., Singh S.. Extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles using psychrophilic bacteria. *Process Biochem.* 2011. Vol. 46(9). P. 1800–1807. doi:10.1016/j.procbio.2011.06.008.
  30. Nanda A., Saravanan M. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine*. 2009. Vol. 5(4). P. 452–456. doi:10.1016/j.nano.2009.01.012.
  31. Saravanan M., Barik S. K., MubarakAli D., Prakash P., Pugazhendhi A. Synthesis of silver nanoparticles from *Bacillus brevis* (NCIM 2533) and their antibacterial activity against pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*. 2018. Vol. 116. P. 221–226. doi:10.1016/j.micpath.2018.01.038.
  32. Mondal A.H., Yadav D., Mitra S., Mukhopadhyay K. Biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Shewanella* sp. ARY1 and their antibacterial activity. *Int. J. Nanomed.* 2020. Vol. 15. P. 8295–8310. doi:10.2147/IJN.S274535.
  33. Oladipo I.C., Lateef A., Azeez M.A., Asafa T.B., Yekeen T.A., Akinboro A., Akinwale A.S., Gueguim-Kana E.B., Beukes L.S. Green Synthesis and Antimicrobial Activities of Silver Nanoparticles using Cell Free-Extracts of *Enterococcus* species. *Notulae Scientia Biologicae*. Vol. 9(2). P. 196. doi:10.15835/nsb929938.
  34. Sunkar S., Nachiyar C. V. Biogenesis of antibacterial silver nanoparticles using the endophytic bacterium *Bacillus cereus* isolated from *Garcinia xanthochymus*. *Asian*

- Pacific *Journal of Tropical Biomedicine*. 2012. Vol. 2(12). P. 953–959. doi:10.1016/s2221-1691(13)60006-4.
35. Roy A., Bulut O., Some S., Mandal A. K., Yilmaz M. D. Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC Advances*. 2019. Vol. 9(5). P. 2673–2702. doi:10.1039/c8ra08982e.
  36. Singh P., Kim Y.-J., Zhang D., Yang D.-C. Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends in Biotechnology*. 2016. Vol. 34(7). P. 588–599. doi:10.1016/j.tibtech.2016.02.006.
  37. Mohammadinejad R., Shavandi A., Raie D. S., Sangeetha J., Soleimani M., Shokriani H. Plant molecular farming: production of metallic nanoparticles and therapeutic proteins using green factories. *Green Chemistry*. 2019. Vol. 21(8). P. 1845–1865. doi:10.1039/c9gc00335e.
  38. Dauthal P., Mukhopadhyay M. Noble Metal Nanoparticles: Plant-Mediated Synthesis, Mechanistic Aspects of Synthesis, and Applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2016. Vol. 55(36). P. 9557–9577. doi:10.1021/acs.iecr.6b00861.
  39. Ahmed S., Saifullah Ahmad, M., Swami B. L., Ikram S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2016. Vol. 9(1). P. 1–7. doi:10.1016/j.jrras.2015.06.006.
  40. Philip D. *Mangifera Indica* leaf-assisted biosynthesis of well-dispersed silver nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2011. Vol. 78(1). P. 327–331. doi: 10.1016/j.saa.2010.10.015.
  41. Francis S., Joseph S., Koshy E. P., Mathew B. Microwave assisted green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *elephantopus scaber* and its environmental and biological applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2017. Vol. 46(4). P. 795–804. doi:10.1080/21691401.2017.1345921.
  42. Asghar M. A., Zahir E., Shahid S. M., Khan M. N., Asghar M. A., Iqbal, J., Walker G. Iron, copper and silver nanoparticles: Green synthesis using green and black tea leaves

- extracts and evaluation of antibacterial, antifungal and aflatoxin B 1 adsorption activity. *LWT*. 2018. Vol. 90. P. 98–107. doi:10.1016/j.lwt.2017.12.009.
43. Roy A., Bulut O., Some S., Mandal A. K., Yilmaz M. D. Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC Advances*. 2019. Vol. 9(5). P. 2673–2702. doi:10.1039/c8ra08982e.
  44. Salari Z., Danafar F., Dabaghi S., Ataei S. A. Sustainable synthesis of silver nanoparticles using macroalgae *Spirogyra varians* and analysis of their antibacterial activity. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2016. Vol. 20(4). P. 459–464. doi:10.1016/j.jscs.2014.10.004.
  45. Elumalai E., Kayalvizhi K., Silvan S. Coconut water assisted green synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2014. Vol. 6(4). P. 241. doi:10.4103/0975-7406.142953.
  46. Shankar S.S.; Ahmad, A.; Sastry, M. Geranium Leaf Assisted Biosynthesis of Silver nanoparticles. *Biotechnol Prog*. 2003. Vol. 19(6). P. 1627-31. doi:10.1021/bp034070w.
  47. Ashvi S. J., Pranita S. P., Aira S., Vijayabhaskarreddy J., Sathish D. Bionanofactories for Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Toward Antimicrobial Applications. *Int. J. Mol. Sci*. 2021. Vol. 22(21). P. 11993. doi:10.3390/ijms222111993.
  48. Singh P., Kim Y.-J., Zhang D., Yang D.-C. Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends in Biotechnology*. 2016. Vol. 34(7). P. 588–599. doi:10.1016/j.tibtech.2016.02.006.
  49. Klis F.M., Boorsma A, De Groot PW. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2006. Vol. 23. P. 185-202. doi:10.1002/yea.1349.
  50. Salunke B. K., Sawant S. S., Lee S.-I., Kim B. S. Comparative study of MnO<sub>2</sub> nanoparticle synthesis by marine bacterium *Saccharophagus degradans* and yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol. 99(13). P. 5419–5427. doi:10.1007/s00253-015-6559-4.

51. Roychoudhury A. Yeast-mediated Green Synthesis of Nanoparticles for Biological Applications. *Indian J. Pharm. Biol. Res.* 2020. Vol. 8(3). P. 26-31. doi:10.30750/ijpbr.8.3.4.
52. Ma G., Zhao Z., Liu H. Yeast Cells Encapsulating Polymer Nanoparticles as Trojan Particles via in Situ Polymerization inside Cells. *Macromolecules.* 2016. Vol. 49(5). P. 1545–1551. doi:10.1021/acs.macromol.6b00016.
53. Kowshik M., Ashtaputre S., Kharrazi S., Vogel W., Urban J., Kulkarni S. K., Paknikar K. M. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. *Nanotechnology.* 2002. Vol. 14(1). P. 95–100. doi:10.1088/0957-4484/14/1/321.
54. Nam K. T., Lee Y. J., Krauland E. M., Kottmann S. T., Belcher A. M. Peptide-Mediated Reduction of Silver Ions on Engineered Biological Scaffolds. *ACS Nano.* 2008. Vol. 2(7). P. 1480–1486. doi:10.1021/nm800018n.
55. Ashwini N., Gayathiri V., Farah E. K., Mas J. M., Azham Z. Synthesis, Characterization and Biomedical Application of Silver Nanoparticles. *Materials.* 2022. Vol. 15. P. 427. doi:10.3390/ma15020427.
56. Riddin T., Gericke M., Whiteley C. Analysis of the inter-and extracellular formation of platinum nanoparticles by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using response surface methodology. *Nanotechnology.* 2006. Vol. 17(14). P. 3482. doi:10.1088/0957-4484/17/14/021.
57. Aygün, A., Özdemir, S., Gülcan, M., Cellat, K., & Şen, F. (2019). Synthesis and Characterization of Reishi Mushroom-mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles for the Biochemical Applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 112970. doi:10.1016/j.jpba.2019.112970 1.
58. Lee S., Jun, B.-H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019. Vol. 20(4). P. 865. doi:10.3390/ijms20040865.

59. Sanghi R., Verma P. Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles. *Bioresource Technology*. 2009. Vol. 100(1). P. 501–504. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.048.
60. Tan Y., Wang Y., Jiang L., Zhu, D. Thiosalicylic Acid-Functionalized Silver Nanoparticles Synthesized in One-Phase System. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2002. Vol. 249(2). P. 336–345. doi:10.1006/jcis.2001.8166.
61. Singh A., Gautam P. K., Verma A., Singh V., Priya P. M. S., Shivalkar S., Samanta S. K. Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: A review. *Biotechnology Reports*. 2020. Vol. 25. e00427. doi:10.1016/j.btre.2020.e00427.
62. Skóra B., Krajewska U., Nowak A., Dziedzic A., Barylyak A., Kus-Liśkiewicz M. Noncytotoxic silver nanoparticles as a new antimicrobial strategy. *Scientific Reports*. 2021. Vol. 11(1). doi:10.1038/s41598-021-92812-w.
63. Liao S., Zhang Y., Pan X., Zhu F., Jiang C., Liu Q., ... Chen L. (2019). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Nanomedicine*. 2019. Vol. 14. P. 1469–1487. doi:10.2147/ijn.s191340.
64. Maji A., Beg M., Das S., Aktara M.N., Nayim S., Patra A., Islam M.M., Hossain M. Study on the antibacterial activity and interaction with human serum albumin of *Tagetes erecta* inspired biogenic silver nanoparticles. *Process Biochem*. 2020. Vol. 97. P. 191–200. doi:10.1016/j.procbio.2020.07.017.
65. Saravanakumar K., Sriram B., Sathiyaseelan A., Mariadoss A. V. A., Hu X., Han K.-S., ... Wang M.-H. Synthesis, characterization, and cytotoxicity of starch-encapsulated biogenic silver nanoparticle and its improved anti-bacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. Vol. 182. P. 1409–1418. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.05.036.

66. Lakshmi H.P., Prasad U.V., Yeswanth S., Swarupa V., Prasad O.H., Narasu M.L., P.V.G.K. Sarma. Molecular characterization of  $\alpha$ -amylase from *Staphylococcus aureus*. *Bioinformation*. 2013. Vol. 9 (6). P. 281–285. doi:10.6026/97320630009281.
67. Vijayan S., Divya K., Varghese S., Jisha M. S. Antifungal Efficacy of Chitosan-Stabilized Biogenic Silver Nanoparticles against Pathogenic *Candida* spp. Isolated from Human. *BioNanoScience*. 2020. doi:10.1007/s12668-020-00781-7.
68. Huang K.-S., Wang L.-S., Wang C.-Y., Yang C.-H., Hsieh C.-L., Chen S.-Y., ... Wang J.-J. Synthesis and anti-fungal effect of silver nanoparticles–chitosan composite particles. *International Journal of Nanomedicine*. 2015. P. 2685. doi:10.2147/ijn.s77410.
69. Longhi C., Santos J. P., Morey A. T., Marcato P. D., Durán N., Pinge-Filho P., ... Yamauchi L. M. Combination of fluconazole with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* improves antifungal effect against planktonic cells and biofilm of drug-resistant *Candida albicans*. *Medical Mycology*. 2015. Vol. 54(4). P. 428–432. doi:10.1093/mmy/myv036
70. Lee B., Lee M. J., Yun S. J., Kim K., Choi I.-H., Park S. Silver nanoparticles induce reactive oxygen species-mediated cell cycle delay and synergistic cytotoxicity with 3-bromopyruvate in *Candida albicans*, but not in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Nanomedicine*. 2019. Vol. 14. P. 4801–4816. doi:10.2147/ijn.s205736.
71. Yantcheva N. S., Karashanova D. B., Georgieva B. C., Vasileva I. N., Stoyanova A. S., Denev P. N., Dinkova R. H., Ognyanov M. H., Slavov A. M. Characterization and application of spent brewer's yeast for silver nanoparticles synthesis. *Bulgarian Chemical Communications*. 2019. Vol. 51. Special Issue D p. 173 – 177.
72. Slavov A., Denev P., Panchev I., Shikov V., Nenov N., Yantcheva N., Vasileva, I. Combined recovery of polysaccharides and polyphenols from *Rosa damascena* wastes. *Industrial Crops and Products*. 2017. Vol. 100. P. 85–94. doi:10.1016/j.indcrop.2017.02.017.



73. Lucini L., Pellizzoni M., Pellegrino R., Molinari G. P., Colla G. Phytochemical constituents and in vitro radical scavenging activity of different Aloe species. *Food Chemistry*. 2015. Vol. 170. P. 501–507. doi:10.1016/j.foodchem.2014.08.034.
74. Sharifi-Rad M., Pohl P. Synthesis of Biogenic Silver Nanoparticles (AgCl-NPs) Using a *Pulicaria vulgaris* Gaertn. Aerial Part Extract and Their Application as Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Agents. *Nanomaterials*. 2020. Vol. 10(4). P. 638. doi:10.3390/nano10040638.
75. Aziz N., Faraz M., Sherwani M. A., Fatma T., Prasad R. Illuminating the Anticancerous Efficacy of a New Fungal Chassis for Silver Nanoparticle Synthesis. *Frontiers in Chemistry*. 2019. Vol. 7. doi:10.3389/fchem.2019.00065.
76. Hu X., Saravanakumar K., Jin, T., Wang M.-H. Mycosynthesis, characterization, anticancer and antibacterial activity of silver nanoparticles from endophytic fungus *Talaromyces purpureogenus*. *International Journal of Nanomedicine*. 2019. Vol. 14. P. 3427–3438. doi:10.2147/ijn.s200817.
77. Altinsoy B. D., Şeker Karatoprak G., Ocsoy, I. Extracellular directed ag NPs formation and investigation of their antimicrobial and cytotoxic properties. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018. doi:10.1016/j.jsps.2018.07.013.
78. Zhao X., Zhou L., Riaz Rajoka M. S., Yan L., Jiang C., Shao D., ... Jin M. Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2017. Vol. 38(6). P. 817–835. doi:10.1080/07388551.2017.1414141.
79. Т.П. Пирог. Становлення та розвиток мікробіології. Загальна мікробіологія : підручник. - 2 вид., доп. і перероб. Київ : НУХТ, 2010. - 620 с.
80. С. М. Тетеріна, Н.М. Грегірчак. Мікробіологія харчових продуктів : Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051701 "Харчові технології та інженерія" ден. та заоч. форм навчання. : НУХТ, 2013. – 97 с.
81. Вилучено з <https://shop.hlr.ua/ua/sreda-saburo-agarizovannaya-epusp-conda-500-g-254552.html>

82. Біохімічні і мікробіологічні основи харчової та бродильної технології : навч. посібник / М. Г. Зінченко. – Харків: НТУ «ХП», 2009 – 188 с
83. Moreno-Arribas, M. Victoria; Polo, M. Carmen. *Wine Chemistry and Biochemistry || Biochemistry of Alcoholic Fermentation*. 2009. (Chapter 1), 3–26. doi:10.1007/978-0-387-74118-5\_1
84. Hand, T. W. The Role of the Microbiota in Shaping Infectious Immunity. *Trends in Immunology*. 2016. Vol. 37(10), 647–658. doi:10.1016/j.it.2016.08.007
85. [Лекція] Умовно-патогенні мікроорганізми. Опортуністичні інфекції. (2019). Національний фармацевтичний університет. Кафедра мікробіології, вірусології та імунології. Вилучено з: [https://microbiology.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2020/02/%D0%9A%D0%BB%D1%96%D0%BD-%D0%BC%D1%96%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F\\_- %D0%9B%D0%B5%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F-2\\_%D0%A3%D0%9F%D0%9C\\_2019.pdf](https://microbiology.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2020/02/%D0%9A%D0%BB%D1%96%D0%BD-%D0%BC%D1%96%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F_- %D0%9B%D0%B5%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F-2_%D0%A3%D0%9F%D0%9C_2019.pdf)
86. Прес-служба Національної академії медичних наук України. (2020). Мікробіологічні аспекти поширення інфекції. Вилучено з: <https://amnu.gov.ua/mikrobiologichni-aspekty-poshyrennya-infekcziyi/>
87. Н. В. Дехтяренко, Л. М. Шинкаренко, О. М. Дуган. (2007). Критерії відбору пробіотичних штамів мікроорганізмів. Києво-Могилянська академія. Вилучено з: <https://ekmair.ukma.edu.ua/server/api/core/bitstreams/ec1a2aab-4df1-497c-b676-d9bffa2e75d6/content>
88. Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., & Banat, I. M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology Letters*. 2016. Vol. 38(6), 1015–1019. doi:10.1007/s10529-016-2079-2.

89. Hamad, M. T. Biosynthesis of silver nanoparticles by fungi and their antibacterial activity. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2018. doi:10.1007/s13762-018-1814-8
90. Sawtarie, N., Cai, Y., & Lapitsky, Y. Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017. Vol.157, 110–117. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.05.055
91. Kittler, S., Greulich, C., Gebauer, J. S., Diendorf, J., Treuel, L., Ruiz, L., ... Epple, M. The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. *J. Mater. Chem.* 2010. Vol. 20(3), 512–518. doi:10.1039/b914875b
92. Yeap, S. P., Lim, J., Ngang, H. P., Ooi, B. S., & Ahmad, A. L. Role of Particle–Particle Interaction Towards Effective Interpretation of Z-Average and Particle Size Distributions from Dynamic Light Scattering (DLS) Analysis. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2018. Vol. 18(10), 6957–6964. doi:10.1166/jnn.2018.15458
93. Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., & Kalaskar, M. G. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019. 101174. doi:10.1016/j.jddst.2019.101174
94. Yu, W., Shevtsov, M., Chen, X., & Gao, H. Advances in aggregatable nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *Chinese Chemical Letters*. 2020. Vol. 31(6), 1366–1374. doi:10.1016/j.ccllet.2020.02.036 10.1016/j.ccllet.2020.02.036
95. Azócar, M. I., Alarcón, R., Castillo, A., Blamey, J. M., Walter, M., & Paez, M. Capping of silver nanoparticles by anti-inflammatory ligands: Antibacterial activity and superoxide anion generation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2019. Vol.193, 100–108. doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.02.005
96. Shrestha, S., Wang, B., & Dutta, P. Nanoparticle processing: Understanding and controlling aggregation. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2020. 102162. doi:10.1016/j.cis.2020.102162

97. Ulaeto, S. B., Mathew, G. M., Pancrecious, J. K., Nair, J. B., Rajan, T. P. D., Maiti, K. K., & Pai, B. C. Biogenic Ag Nanoparticles of Neem Extract; its Structural Evaluation and Antimicrobial Effects against *Pseudomonas nitroreducens* and *Aspergillus unguis* - NII 08123. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2019. doi:10.1021/acsbiomaterials.9b01257
98. Bae, E., Lee, B.-C., Kim, Y., Choi, K., & Yi, J. Effect of agglomeration of silver nanoparticle on nanotoxicity depression. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2012. Vol. 30(2), 364–368. doi:10.1007/s11814-012-0155-4
99. Restrepo, C. V., & Villa, C. C. Synthesis of silver nanoparticles, influence of capping agents, and dependence on size and shape: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*. 2021. Vol. 15, 100428. doi:10.1016/j.enmm.2021.100428
100. Tian, X., Jiang, X., Welch, C., Croley, T. R., Wong, T.-Y., Chen, C., ... Yin, J.-J. Bactericidal Effects of Silver Nanoparticles on Lactobacilli and the Underlying Mechanism. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2018. Vol. 10(10), 8443–8450. doi:10.1021/acsami.7b17274
101. Hernández-Gómora, A., Lara-Carrillo, E., Robles-Navarro, J., Scougall-Vilchis, R., Hernández-López, S., Medina-Solís, C., & Morales-Luckie, R. Biosynthesis of Silver Nanoparticles on Orthodontic Elastomeric Modules: Evaluation of Mechanical and Antibacterial Properties. *Molecules*. Vol. 201722(9), 1407. doi:10.3390/molecules22091407
102. Vamanu, E., Ene, M., Biță, B., Ionescu, C., Crăciun, L., & Sârbu, I. In Vitro Human Microbiota Response to Exposure to Silver Nanoparticles Biosynthesized with Mushroom Extract. *Nutrients*. 2018. Vol. 10(5), 607. doi:10.3390/nu10050607.

## ДОДАТОК А



Науково-практична  
міжнародна дистанційна  
конференція  
**«МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТА  
ІМУНОЛОГІЧНІ  
ДОСЛІДЖЕННЯ В  
СУЧАСНІЙ МЕДИЦИНІ»**

Конференція зареєстрована у ДУ  
«Український інститут науково-  
технічної експертизи та інформації»,  
посвідчення № 544 від 19 грудня 2022 року

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІНВАЛІДНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ПРИКЛАДНОЇ ФАРМАЦІЇ  
КАФЕДРА МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ

№090

*Сертифікат*

Цим засвідчується, що

**Кудіна С.В.**

брав(ла) участь у роботі Науково-практичної  
міжнародної дистанційної конференції  
**«Мікробіологічні та імунологічні дослідження  
в сучасній медицині»**

24 березня 2023 р. м. Харків

Тривалість – 5 годин / 0,15 кредитів ЕКТС

Проректор з науково-педагогічної роботи  
(інноваційної та науково-дослідної)  
Національного фармацевтичного університету,  
доктор фармацевтичних наук, професор

Завідувачка кафедри мікробіології, вірусології та імунології  
доктор медичних наук, професор



І.М. Владимірова

Н.І. Філімонова

## ДОДАТОК Б



Векшин В.О., Бачинський Р.О., Стеценко С.О. ПЕРЕВАГИ ТА НЕДОЛКИ ЗАСТОСУВАННЯ НАНОТЕХНОЛОГІЙ У БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНІ .....	155
Гринзовська А.А., Бобир В.В. ТЕХНОЛОГІЯ DECTISOMES: НОВИЙ НАПРЯМОК У ЛІКУВАННІ ГРИБКОВИХ ІНФЕКЦІЙ .....	156
Кудіна С. В., Шидловська О. А. ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ НАНОЧАСТОК СРІБЛА ОТРИМАНИХ МЕТОДОМ ЗЕЛЕНОГО СИНТЕЗУ.....	158
<i>Фармакологічна корекція інфекційної патології, доклінічні дослідження</i>	
Dzhoraieva S.K. <sup>1,2</sup> , Filimonova N.I. <sup>2</sup> , Nikitenko I.M. <sup>1</sup> , Goncharenko V.V. <sup>1</sup> , Geyderikh O.G. <sup>2</sup> , Tischenko I.Y. MICROBIOLOGICAL JUSTIFICATION OF THE USE OF FLUOROQUINOLONES FOR THE TREATMENT OF NONSPECIFIC INFLAMMATORY DISEASES OF THE GENITOURINARY TRACT .....	161
Ishan Tiwari Dr. D.K. Choudhary ROLE OF MICROBIAL PEPTIDE AS BIOCONTROL AGENT.....	162
Suleymanov F.S. EFFECT OF THE DRUG IRS-19 ON THE MOUTH MICROFLORA IN PATIENTS WITH ACUTE PERIOSTITIS .....	162
Suleymanov S.F. USE OF IMMUNOCORRECTION AND ANTI-HELICOBACTER THERAPY IN PATIENTS WITH DUODENAL ULCER.....	164
Suleymanov S.F., Suleymanov F.S. USE OF THYMOPTINUM IN PATIENTS CHRONIC PANCREATITIS.....	166
Suleymanova G.S. USING THE DRUG ABACTAL IN GYNECOLOGICAL PATHOLOGY .....	168
Бутко Я.О., Меленченко Н.О., Хмелевський М.О. ОСНОВНІ ТИПИ ВАКЦИН ПРОТИ COVID-19: ЕФЕКТИВНІСТЬ ТА БЕЗПЕКА .....	170
Васильченко В.С., Кошова О.Ю. ТАРГЕТНА ТЕРАПІЯ РАКУ: УВАГА НА БАКТЕРІЇ.....	172
Кутасевич Я.Ф., Джораєва С.К., Олійник І.О., Гончаренко В.В., Олійник І.О. РАЦІОНАЛЬНІ ПІДХОДИ ДО СИСТЕМОЇ ТЕРАПІЇ ПОШИРЕНИХ ДЕРМАТОЗІВ, УСКЛАДНЕНИХ СТАФІЛОКОКОВОЮ ІНФЕКЦІЄЮ .....	175
<i>Генетика мікроорганізмів</i>	
Zhike Liu, Anatoliy Fotin, Tetiana Fotina THE DISTRIBUTION OF <i>SALMONELLA PULLORUM</i> IN DIFFERENT ORGANS OF CHICKEN USING IN SITU HYBRIDIZATION .....	178
<i>Питання викладання мікробіології, вірусології та імунології</i>	
Suleymanov S.F. THE ROLE OF STUDENTS' INDEPENDENT WORK WHEN MASTERING THE DISCIPLINE MICROBIOLOGY, VIROLOGY AND IMMUNOLOGY .....	179



*Сучасна біотехнологія*

також можуть бути ефективними при лікуванні патогенів у царстві бактерій.

Разом з тим, залишається не дослідженим питання динаміки формування лікарської стійкості до антимікотичних препаратів при використанні технології DectiSomes. Не виключено, що поєднання такого підходу в комбінації з протигрибковими препаратами на основі азолів може мати позитивний ефект в цьому плані і в цілому покращить ефективність лікування пацієнтів та буде сприяти зменшенню смертності від грибкових інфекцій, зокрема аспергільозу.

**Висновок:** Використання технології DectiSomes може в значній мірі сприяти підвищенню ефективності лікування грибкових інфекцій (аспергільозу, кандидозу, криптококозу, мукормікозу)

**ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ НАНОЧАСТОК СРІБЛА  
ОТРИМАНИХ МЕТОДОМ ЗЕЛЕНОГО СИНТЕЗУ**

**С. В. Кудіна, О. А Шидловська**

*Київський національний університет технологій та дизайну, м. Київ,*

*Україна*

[sofia.kievskaya2015@gmail.com](mailto:sofia.kievskaya2015@gmail.com)

**Актуальність.** Підвищення антибіотикорезистентності у бактерій стає світовою проблемою, визнаною у 2014 році Всесвітньою організацією охорони здоров'я як глобальну загрозу. Часте та неконтрольоване застосування антибіотиків призводить до зменшення їх ефективності та утворенню супер-інфекцій проти яких може не бути ліків і як наслідок можливе лише хірургічне втручання. Такі обставини змушують людство шукати безпечні альтернативи антибіотикам, з меншою токсичністю та більшою біобезпекою. Такою альтернативою можуть бути наночастинки металів. Вони досить добре вивчені, описаний широкий спектр методів їх отримання, більше того можна використовувати відходи металургійної та хімічної промисловості у вигляді оксидів чи солей металів.

Серед металів, перспективних для синтезу наночастинок, варто відмітити саме срібло за його антибактеріальні властивості.

**Методи та матеріали.** Наночастинки срібла (AgНЧ) були отримані методом зеленого синтезу з використанням дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Біологічну дію AgНЧ досліджували з використанням добових культур *Escherichia coli* та *Lactobacillus delbrueckii*. Проти даних штамів визначали антибактеріальну дію (МТТ-тест) та антиадгезивну дію (метод з кристалічним фіолетовим). Вимірювання оптичної густини проводили з допомогою спектрофотометра при довжинах хвиль 568 нм та 620 нм. Результати представлені у вигляді медіан значень живих або адгезованих



## Сучасна біотехнологія

клітин з інтерквартильним розкидом. Правильність нульової гіпотези перевірена з використанням методу Відкоксона.

**Результати.** В роботі проводили синтез наночасток срібла з використанням лізату двох штамів дріжджів *S. cerevisiae* 1995 і 530. При дослідженні антибактеріальної дії проти *E. coli* встановили, що у всіх досліджених концентраціях (від 0,01 до 10,00 мМ) наночастки срібла, отримані з використанням *S. cerevisiae* 530 достовірно знижують показник кількості живих клітин на 85,4 % ( $p=0.03$ ). Для наночасток срібла, отриманих з використанням *S. cerevisiae* 1995 було встановлено ефективну та достовірну антибактеріальну дію лише в концентраціях 0,10, 1,00 та 10,00 мМ – зниження відсотку живих клітин на 86,6 %, 86,7 % та 88,7 % відповідно ( $p=0.03$ ).

При дослідженні антибактеріальної дії проти *L. delbrueckii* встановлено, що при використанні наночасток срібла, синтезованих з використанням лізату *S. cerevisiae* 530, в концентраціях 0,01 та 0,10 мМ спостерігається збільшення показника відсотку живих клітин достовірно на 8,8 % та 16,7 % ( $p=0.05$  та  $p=0.03$  відповідно). В інших двох концентраціях (1,00 та 10,00 мМ) достовірної різниці з контролем не спостерігали. Для наночастинок срібла, синтезованих з використанням лізату *S. cerevisiae* 1995, показана здатність підвищувати показник живих клітин в концентраціях 0,001, 1,00 та 10,00 мМ – на 10,0 %, 10,4 % та 15,4 % відповідно. В концентрації 0,10 достовірної різниці з контролем бактеріальних клітин не спостерігали. Ефективне зниження адгезивних властивостей для клітин *E. coli* при використанні наночасток срібла, синтезованих з використанням лізату *S. cerevisiae* 530, спостерігали в концентраціях 0,01 та 10,00 мМ – на 10,8 % та 79,0 % відповідно ( $p=0.03$ ). При використанні наночасток срібла з лізату *S. cerevisiae* 1995 ефективного зниження адгезивних властивостей *E. coli* спостерігали лише в концентрації 10,00 мМ – зниження відсотку адгезованих клітин на 71,4 % ( $p=0.03$ ). При дослідженні зразків наночасток з використанням лізатів як штаму *S. cerevisiae* 1995, так і штаму *S. cerevisiae* 530 ефективного впливу на адгезивні властивості клітин *L. delbrueckii* не спостерігали. Єдині цікаві дані отримали при використанні наночасток срібла, синтезованих з використанням лізату *S. cerevisiae* 1995 в концентрації 0,01 мМ – збільшення відсотку адгезованих клітин на 169,5 %.

**Висновки.** Отримані в роботі дані вказують на ефективну антибактеріальну дію наночасток срібла отриманих методом зеленого синтезу проти умовно-патогенного штаму *E. coli*. Зниження відсотку живих клітин майже у всіх досліджених концентраціях сягає 88,7 %. Цікаво, що при цьому високу адгезивну дію наночасток срібла спостерігали у високих концентраціях, а саме 10,00 мМ. Самим важливим висновком даної роботи є

*Сучасна біотехнологія*

те, що отримані наночастки срібла не мають антибактеріальної та антиадгезивної дії проти представника нормофлори людини *L. delbrueckii*. Більше того, в концентраціях 1,00 та 10,00 мМ спостерігається підвищення метаболічної активності клітин в середньому на 10-15 %. Результати роботи дають змогу зробити висновок щодо перспектив використання наночасток срібла, синтезованих з використанням лізату дріжджів *S. cerevisiae*. Такі наночастки мають ефективну антибактеріальну дію проти представника умовно-патогенної мікрофлори, при цьому абсолютно безпечні для пробіотичного штаму *L. delbrueckii*. А те, що наночастки срібла, отримані методом зеленого синтезу інтенсифікують метаболічну активність такого пробіотичного штаму, може мати перспективи в розробці комплексних препаратів для збереження нормофлори кишечника людини.

## ДОДАТОК В

COLLECTION OF SCIENTIFIC PAPERS  
**SCIENTIA****CERTIFICATE OF PARTICIPATION**

Certificate provides at least a 0.1 ECTS credits to awarded participants for being involved

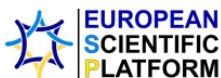
**Sofiia Kudina**

participated in the IV International Scientific and Theoretical Conference

**MODERNIZATION OF TODAY'S SCIENCE:  
EXPERIENCE AND TRENDS**Scan the code to get access to  
the conference proceedings

September 22, 2023

Singapore, Republic of Singapore

The conference is included in the Academic Resource  
Index ResearchBib catalog and UKRISTEI catalog  
(Certificate № 297 dated June 16<sup>th</sup>, 2023);Head of the European Scientific Platform  
Chairman of the Organizing committee**MARIIA HOLDENBLAT**

Conference proceedings are publicly available under terms of the Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License.

ДОДАТОК Д



22

SEPTEMBER, 2023

SINGAPORE, REPUBLIC OF SINGAPORE

**MODERNIZATION OF TODAY'S  
SCIENCE: EXPERIENCE AND TRENDS**

IV INTERNATIONAL SCIENTIFIC AND THEORETICAL CONFERENCE

**EUROPEAN  
SCIENTIFIC  
PLATFORM**

DOI 10.36074/scientia-22.09.2023 ISBN 979-8-88955-766-1

## SECTION 5.

## MANAGEMENT, PUBLIC MANAGEMENT AND ADMINISTRATION

## ALGORITHM FOR MANAGEMENT OF ELECTRONIC PAYMENT SYSTEMS BASED ON ASSESSMENT OF THEIR EFFICIENCY

**Вольвач О.О.** .....31

## РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО РОЗВИТКУ СИСТЕМИ МОТИВАЦІЇ ПЕРСОНАЛУ МЕДИЧНОГО ПІДПРИЄМСТВА

**Беззубов В.В., Кубіцький С.О.**.....36

## SECTION 6.

## INTERNATIONAL RELATIONS

## ЕКОЛОГІЧНІ ВИКЛИКИ ДЛЯ ЕКОНОМІЧНОГО РОЗВИТКУ КРАЇН БЛИЗЬКОГО СХОДУ

**Заставний А.Р., Оконський М.І.**.....42

## КЛІМАТИЧНІ ЗМІНИ ТА ЕКОНОМІЧНИЙ ПРОГРЕС: СУЧАСНІ ВИКЛИКИ

**Запухляк В.З., Демкура І.Г.**.....44

## SECTION 7.

## LAW AND INTERNATIONAL LAW

## ВИЗНАЧЕННЯ ОКРЕМИХ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ВИНОГРАДНИХ ВИН

**Федоров М.В.**.....46

## ДЕРЖАВА ЯК СТОРОНА СУДОВОЇ СПРАВИ: ОПТИМІЗАЦІЯ ГОСПОДАРСЬКОГО ПРОЦЕСУАЛЬНОГО ЗАКОНОДАВСТВА УКРАЇНИ

**Бичкова С.С.**.....48

## ДЕЯКІ ПРОБЛЕМИ УДОСКОНАЛЕННЯ РЕСОЦІАЛІЗАЦІЇ ЗАСУДЖЕНИХ, ЯКІ ВІДБУВАЮТЬ ПОКАРАННЯ У ВИДІ ПОЗБАВЛЕННЯ ВОЛІ

**Резніченко Г.С.**.....51

## ТЕОРЕТИЧНІ АСПЕКТИ ЮРИДИЧНОГО СТАНОВИЩА ПРОКУРАТУРИ ЯК СУБ'ЄКТА АДМІНІСТРАТИВНОГО ПРАВА

**Павленко Д.Ю.**.....53

## SECTION 8.

## BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

## ВЛАСТИВОСТІ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА СИНТЕЗОВАНИХ НА ГРИБАХ

**Кудіна С.В., Науковий керівник: Шидловська О.А.**.....55

## SECTION 8. BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

---

**Кудіна Софія Володимирівна**

магістрант факультету хімічних та біофармацевтичних технологій  
Київський національний університет технологій та дизайну, Україна

**Науковий керівник: Шидловська Ольга Андріївна** 

кандидат біологічних наук, доцент, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра  
Київський національний університет технологій та дизайну, Україна

---

### ВЛАСТИВОСТІ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА СИНТЕЗОВАНИХ НА ГРИБАХ

***Анотація.** Нанотехнології все міцніше вкорінюються у всіх сферах життєдіяльності людини, зокрема, в медицині. Використання досягнень цього прогресу дозволяє застосовувати різні наноструктури в традиційних методах лікування різноманітних патологій. Зокрема, наночастинки металів застосовуються для візуалізації клітин та субклітинних структур, діагностики процесів у живому організмі, адресної доставки генів, в якості протипухлинних ліків тощо. Срібні наночастинки найбільш перспективні, оскільки володіють найефективнішою антибактеріальною дією. А, зростаюча резистентність до антибіотичних препаратів серед патогенних для людини штамів мікроорганізмів вимагає розробки альтернатив, якими і можуть стати наночастинки срібла. В даній роботі використали методи порівняльного аналізу та класифікації. Для аналізу методів синтезу наночасток срібла та встановлення їх властивостей використовували системний підхід в добірї найактуальнішого матеріалу та методів індуктивного і логічного аналізу. Проаналізовано існуючі на даний час методи отримання наночастинок срібла. Акцентовано увагу на тому, що біологічні методи синтезу наночастинок розглядаються як такі, що здатні успішно конкурувати з традиційними хімічними та фізичними методами за швидкістю та керованістю процесу. Серед усіх біологічних продуцентів гриби дозволяють отримувати наночастинки, що характеризуються високою стабільністю та не втрачають свої властивості навіть в процесі тривалого зберігання. Проаналізовано основні дані про біологічні властивості отриманих наночастинок, методи їх виявлення, вплив розміру на взаємодію з клітинами. Наночастинки срібла окрім антибактеріальної активності, володіють широким спектром біологічних властивостей. Їх використовують в доставці терапевтичних агентів, мають антифунгальну та протівірусну дію. Використання наночастинок срібла є ефективним засобом в боротьбі з біоплівками. Вони позитивно зарекомендували себе в боротьбі з багатьма резистентними до антибіотиків штамми мікроорганізмів, у тому числі з *P. aureginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*.*

**Вступ.** Технологія нанорозмірних благородних металів та отримання наночасток (НЧ) металів знаходять дедалі ширше застосування у сфері біологічних досліджень, а також в біотехнологічних та біомедичних розробках. Зокрема, наночастинки металів застосовуються для візуалізації клітин та субклітинних структур, діагностики процесів у живому організмі, адресної доставки генів, ліків та інших цільових «вантажів», лікуванні пухлин, вірусних захворювань тощо. З благородних металевих наночастинок, срібні наночастинки (AgNPs) найбільш широко вивчені. Це зумовлено їх високою антибактеріальною дією проти широкого кола патогенних мікроорганізмів. Наночастинки



AgNPs проявляють ефективну антибактеріальну дію проти грам-позитивних (*S. aureus*, *E. hirae*, *B. cereus*) та грам-негативних (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. pneumophila subsp. Pneumophila*) бактерій [1]. Також, важливим питанням є доступний, безпечний та керований спосіб отримання AgNPs. Фізичні та хімічні методи синтезу наночастинок металів часто потребують використання токсичних розчинників та енергії. Альтернативним варіантом синтезу наночастинок є біологічний синтез. Таким чином, дана робота має на меті проаналізувати біологічні властивості наночастинок срібла, отриманих економічно-вигідним та біобезпечним методом за допомогою грибів.

**Мета дослідження.** Проаналізувати властивості наночастинок срібла синтезованих з використанням грибів.

**Матеріали і методи дослідження.** В роботі використовували методи теоретичного аналізу наукової літератури, класифікації та узагальнення. методів індуктивного і логічного аналізу.

При проведенні літературного аналізу було використано наступні наукові методи: ситуаційний підхід, порівняння, прогнозування, табличний.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Якщо традиційні ліки на основі розчинних солей срібла надзвичайно токсичні й мають протипоказання до застосування, то наночастинок срібла є помірно токсичними для організму. Завдяки своїм надмалим розмірами (близько однієї мільйонної частки міліметра) наночастинок мають здатність генерувати велику кількість іонів. Для порівняння: кулька срібла вагою 1 г у воді виділить іонів менше, ніж 0,0001 г наночастинок. Важливим питанням при застосуванні наночастинок срібла в медицині є складність виведення наночастинок із організму через видільні системи. Накопичення в організмі срібла має потенційний токсичний вплив. Можливим вирішенням даного питання є використання методів зеленого синтезу для наночастинок срібла, оскільки біогенні наночастинок срібла володіють меншою токсичністю в порівнянні з AgNPs, отриманими методами фізичного та хімічного синтезу [2].

До традиційних методів синтезу наночастинок належать високотемпературна конденсація, лазерна абляція, вакуумне випаровування металів, електроконденсаційний метод Сведберга, радіолітичні методи, хімічне відновлення полімерними сурфактантами, відновлення на м'яких та твердих матрицях, використання поліоксометалатів тощо [3]. Квантові точкові наночастинок синтезують за допомогою методів молекулярно-променевої епітаксії, металоорганічної парової фазової епітаксії, електронної променевої літографії, нарощуванням у неполярних середовищах тощо. Застосування згаданих методів пов'язане зі значними витратами енергії та ресурсів, використанням токсичних сполук, таких, як борогідрид натрію, хлорид тетракіс (гідроксиметил) фосфонію, полі-N-вінілпіролідон, гідроксиламін тощо, а також з утворенням значної кількості токсичних побічних продуктів [4, 5, 6]. Альтернативою даним методам слугує біологічний, що передбачає використання біологічних метаболітів та біологічних систем або їх аналогів для синтезу наночастинок.

Біологічні методи синтезу наночастинок розглядаються як такі, що здатні успішно конкурувати з традиційними хімічними та фізичними методами за швидкістю та керованістю процесу.

При застосуванні біоміметичних методів імітується протікання певних процесів, що відбуваються при синтезі наночастинок у живому організмі за участю визначених біологічних сполук. Для «зеленого» синтезу наночастинок срібла як вихідну неорганічну сировину найчастіше використовують нітрат срібла  $\text{AgNO}_3$  [7, 8].

Гриби лише одні із різних видів організмів, які використовують для синтезу НЧ. Вони є більш вигідними продуцентами, ніж бактерії у багатьох аспектах. Гриби ростуть у вигляді міцелію, що допомагає їм витримувати тиск, умови перемішування та інші умови, які впливають на них в ході культивування в біореакторі. Простота масштабування синтезу і

подальша обробка володіють економічною доцільністю, що є важливими перевагами використання саме грибів для отримання НЧ. Гриби виділяють значно більшу кількість білків в порівнянні з бактеріями, що також підвищує продуктивність синтезу НЧ. При цьому НЧ, як правило, формуються позаклітинно і позбавлені різних домішок внутрішньоклітинних метаболітів.

Для синтезу наночастинок срібла з використанням грибів використовують різноманітні підходи та біологічні агенти. В дослідженні авторів Ammar та El-Desouky для синтезу AgNPs використовували грибові штами *Penicillium expansum HA2N* та *Aspergillus terreus HA 1N*. За допомогою трансмісійної електронної мікроскопії встановили, що з *P. expansum* були отримані AgNPs діаметром 14–25 нм, а з *A. terreus* – діаметром 10–18 нм. Біологічна активність цих AgNPs полягала у високій протигрибовій активності [9].

Серед усіх біологічних продуцентів гриби дозволяють отримувати НЧ, що характеризуються високою стабільністю та не агрегують в процесі тривалого зберігання. Гриби толерантні до високих концентрацій НЧ, що дає їм ще одну перевагу. *Verticillium sp.*, *Cladosporium cladosporioides*, *Trichoderma asperellum*, *Neurospora crassa* та інші види *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* можуть використовуватися для синтезу НЧ [10].

Гриб *Fusarium oxysporum* неодноразово застосовувався для створення НЧ металів, головним чином, срібла. Наночастинки срібла (5–50 нм) можуть бути синтезовані позаклітинно з *F. oxysporum* без ознак флокуляції частинок навіть через місяць після реакції [11]. Довгострокова стабільність наночастинок може бути обумовлена стабілізацією срібних частинок білками. Морфологія наночастинок (НЧ) срібла сильно варіює від сферичної форми до трикутної. Білки, що включають цитохром C, при реакції зі сріблом може самоагрегуватися на поверхні цитратної оболонки колоїдного срібла.

У дослідженні авторів Аугїн зі співавторами AgNPs були синтезовані за допомогою екстракту гриба рейши (*Ganoderma lucidum*). 20 мл грибного екстракту розбавляли до 100 мл додаванням дистильованої води. Згодом до суміші додавали 15 мг солі  $\text{AgNO}_3$  і залишали з магнітною мішалкою для відновлення іонів  $\text{Ag}^+$  до  $\text{Ag}^0$ . Процес відновлення іонів оцінювали за переходом від прозорого до коричнево-червоного забарвлення розчину. При УФ-спектроскопії виявили досить широкий пік поглинання між 400–460 нм, що вказує на існування наночастинок AgNPs в реакційній суміші. Зображення TEM показали, що наночастинки є сферичними з діаметром 15–22 нм [1].

Вченим Hamad було досліджено позаклітинний біосинтез AgNPs на грибах *Penicillium citreonigrum* Dierckx та *Scopulariopsis brumptii* Salvanet-Duval. Вдалося синтезувати сферичні частинки розміром 6-26 нм та 4-23 нм відповідно. Особливістю даної розробки є застосування шару поліуретану як носія наночастинок срібла. Антибактеріальна активність була продемонстрована проти *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*. Однак, важливо зазначити, що наночастки срібла у розчині певної концентрації діють набагато швидше (60 хв), ніж на шарі поліуретану (24 год). Авторами був запропонований метод відстоювання як один з етапів очищення наночастинок срібла [12].

Також, інтерес дослідників викликають дріжджі як біологічні фабрики для отримання наночастинок. Клітини організмів царства грибів містять більшу кількість ферментів – редуказ, ніж бактеріальні клітини, а їх мембрани виділяють адгезивні білки, які можуть сприяти закріпленню іонів металу на мембрані клітини. При цьому дріжджі можуть легко культивуватися у лабораторних умовах, швидко нарощують біомасу і є досить безпечними. Цікавим підходом у використанні дріжджів як біологічних агентів для синтезу AgNPs є застосування штаму *Saccharomyces boulardi*, що володіє пробіотичними властивостями. Також, даний штам стійкіший до змін температури та pH, ніж *S. cerevisiae*, що може зробити їх ще більш перспективним організмом для синтезу наночастинок срібла [13].

Методика отримання наночастинок срібла передбачає додавання дріжджів *S. boulardi* в концентрації 6 г/л в середовище з 200 г/л цукру, з подальшим інкубуванням протягом



24 год при 25 °С для нарощування біомаси культури. Після центрифугування, рН культуральної рідини доводять до 9 і додають 100 мМ розчин  $\text{AgNO}_3$  до кінцевої концентрації в розчині 1 мМ [14].

Науковцями Аумонієр зі співавторами було доведено, що гібриди наночастинок срібла з амфіфільними надрозгалуженими макромолекулами забезпечують отримання ефективних протимікробних поверхневих покриттів. Вивчення стабільних водних дисперсій наночастинок срібла у вигляді нетоксичних елементарних гідрозолей виявило сильну бактерицидну дію проти *E. coli* –концентрація 50 мкг/см<sup>3</sup> викликає 100% інгібування росту бактерій [15].

Вивчено протимікробні властивості нанокмпозитних систем на прикладі лактазаміщеного хітозану та AgNPs (Chitlac-nAg). Ряд розведень колоїдного розчину срібла досліджували на планктонних фазах *Streptococcus mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, зразках слини і рості біоплівки. Для планктонних фаз виявлено бактерицидний та інгібуючий ефекти для всіх стрептококових штамів у концентрації 0,1%, крім *S. mitis*, для якого інгібуюча концентрація виявилася на порядок нижчою. Субінгібуюча концентрація колоїдного розчину для стрептококових штамів має дозозалежний характер, типово властивий метаболічно-активним біоплівкам [16].

Часто результат антибіоплівкової активності AgNPs залежить від форми їх застосування. При вивченні впливу AgNPs на формування на кореневому дентині біоплівки *E. faecalis* показано, що зрошення 0,1% розчином AgNPs не викликало істотних змін в структурі біоплівки і життєздатності бактерій (в порівнянні з обробкою стерильним сольовим розчином). При обробці біоплівки 0,02% гелем AgNPs порушувалася цілісність структури біоплівки і знижувалася кількість життєздатних бактерій (порівняно з 0,01% гелем AgNPs і розчином гіпохлориту) [17].

В експериментах з вивчення антибактеріальних властивостей наночастинок срібла в тканинах тварин на моделі перитоніту і менингоенцефаліту аналізувалася ефективність AgNPs при пероральному введенні препарату. На моделі перитоніту була показана достовірна антибактеріальна активність AgNPs, тоді як на моделі менингоенцефаліту не було досягнуто вираженого антибактеріального ефекту. Отримані дані, можливо, обумовлені меншою проникністю наночастинок срібла через гематоенцефалічний бар'єр, в порівнянні з органами черевної порожнини [18].

Науковці Nanda зі співавторами встановили, що AgNPs мають високу антифунгальну дію проти грибка *C. albicans* [19]. Наночастинки срібла розміром близько 25 нм або менше мають значний потенціал до інгібування вірусної інфекції. Зокрема, малорозмірні AgNPs мають здатність інгібувати вірус простого герпесу 1/2 типу (ВПГ) і вірус парагрипу людини 3 типу [20].

Під час пандемії COVID-19, спричиненої новим коронавірусом SARS-CoV-2, заходи стримування уповільнили поширення інфекції, але не повністю запобігли поширенню хвороби. В дослідженні Gurunathan зі співавторами було продемонстровано, що нанокластерно-кремнеземне композитне покриття срібла, нанесене на маски для обличчя, має віруліцидну дію. Це покриття здатне повністю знизити титр SARS-CoV-2 до нуля [21].

Дослідження Ratan зі співавторами показали, що наночастинки срібла можуть інгібувати всі частинки поліовірусу в концентрації 3,13 ррп, що відповідає вірусній концентрації 1 TCID<sub>50</sub> через 30 хв і 10 TCID<sub>50</sub> через 60 хв після внесення. Розмір наночастинок срібла (7,1 нм) був значно меншим, ніж розмір частинок поліовірусу (25–30 нм) [22].

Механізм впливу наночастинок срібла на вірусні частинки описаний в ряді робіт. Передбачається, що AgNPs втручаються в механізм проникнення вірусів у клітини, взаємодіючи з вірусними поверхневими глікопротеїнами у чутливих клітинах. Крім того, повідомлялося, що AgNPs інгібують постінвазивні стадії життєвого циклу ВІЛ-1, оскільки

вони зберігають свою противірусну активність навіть після того, як були внесені до клітин, вже інфікованих ВІЛ. Механізм, що лежить в основі цієї події, полягає в тому, що AgNPs, можливо, блокували інші функціональні білки ВІЛ-1 і зменшували швидкість зворотної транскрипції шляхом прямого зв'язування з сірчаними та фосфористими групами ядерного матеріалу. AgNPs ефективно інгібують респіраторно-синциціальний вірус (RSV), можливо, зв'язуючись з рівномірно розподіленими поверхневими глікопротеїнами на оболонці віріону RSV [23].

Підсумовуючи вище згадані дослідження можемо виділити основні параметри для характеристики наночасток срібла синтезованих за допомогою представників одноклітинних та багатоклітинних грибів (табл. 1):

Таблиця 1

Біооб'єкт	Розмір НЧ	Спектроскопія	Синтез	Перевірена біологічна дія	Джерело
<i>Ganoderma lucidum</i>	15-22 нм	400-460 нм	Поза клітиною	Антибактеріальна, антиоксидантна, протигрибкова	[1]
<i>Penicillium expansum</i>	14-25 нм	430 нм	Поза клітиною	Протигрибкова	[9]
<i>Aspergillus terreus</i>	10-18 нм	430 нм	Поза клітиною	Протигрибкова	[9]
<i>Pestalotiopsis pauciseta</i>	123-195 нм	-	Поза клітиною	Не перевірялась	[10]
<i>Candida albicans</i>	20-100 нм	400 нм	Поза клітиною	Антибактеріальна	[10]
<i>Fusarium semitectum</i>	12-20 нм	422 нм	Поза клітиною	Фіто-цитотоксичність	[10]
<i>Fusarium graminearum</i>	1-100 нм	440 нм	Поза клітиною	Антибактеріальна, протигрибкова	[10]
<i>Fusarium oxysporum</i>	25-50 нм	430 нм	Внутрішньоклітинно	Не перевірялась	[11]
<i>Penicillium citreonigrum Dierckx</i>	6-26 нм	400-450 нм	Внутрішньоклітинно	Антибактеріальна	[12]
<i>Scopulariopsis brumptii Salvanet-Duval</i>	4-23 нм	350-430 нм	Внутрішньоклітинно	Антибактеріальна	[12]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10 нм	450 нм	Поза клітиною	Фотокаталітична активність	[13]
<i>Saccharomyces boulardi</i>	19-100 нм	-	Поза клітиною	Антибактеріальна, Антиоксидантна,	[14]
Суміш грибів з рослин: <i>Alternaria species,</i> <i>Fusarium oxysporum,</i> <i>Curvularia species,</i> <i>Chaetomium indicum,</i> <i>Phoma species</i>	20-50 нм	413-435 нм	Поза клітиною	Противірусна, цитотоксична	[20]

Можна зробити висновок, що наночастки за допомогою грибів переважно синтезуються позаклітинно. Розмір наночасток можна регулювати за допомогою виду біологічного агента та параметрів синтезу, таких як рН та температура. Найефективніша біологічна дія AgNPs, синтезованих з використанням грибів, є антибактеріальна та протигрибкова.

**Висновки і перспективи.** В роботі проаналізовано методи синтезу та можливі біологічні властивості наночастинок срібла. Показано, що біологічні методи синтезу є

більш безпечними та економічно-вигідними в порівнянні з традиційними хімічними та фізичними методами. Більше того, зелений метод синтезу характеризується високою швидкістю синтезу AgNPs та керованістю процесу. Наночастинки срібла володіють високою антибактеріальною дією як проти грампозитивних, так і грамнегативних бактерій. Більше того, для них показана ефективна протибіоплівкова дія. Отримані зеленим синтезом AgNPs є надзвичайно перспективною альтернативою сучасним антибіотикам. Також, варто зазначити, що AgNPs мають противірусний потенціал, що може бути використано як в профілактиці, так і в лікуванні вірусних захворювань. Важливим напрямком розвитку зеленого синтезу наночастинок срібла є зменшення їх токсичності та кероване вивільнення наночастинок в організмі людини.

#### Список використаних джерел:

1. Aygün, A., Özdemir, S., Gülcan, M., Cellat, K., & Şen, F. (2019). Synthesis and Characterization of Reishi Mushroom-mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles for the Biochemical Applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 112970. doi:10.1016/j.jpba.2019.112970 1.
2. Cao, X., Zhu, L., Bai, Y., Li, F., & Yu, X. (2022). Green one-step synthesis of silver nanoparticles and their biosafety and antibacterial properties. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 15(1), 28-34. doi: 10.1080/17518253.2021.2018506.
3. Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., & Kalaskar, M. G. (2019). Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 101174. doi:10.1016/j.jddst.2019.101174.
4. Claro, M. S., Levy, I., Gangopadhyay, A., Smith, D. J., & Tamargo, M. C. (2019). Self-assembled Bismuth Selenide (Bi<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>) quantum dots grown by molecular beam epitaxy. *Scientific Reports*, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-39821-y.
5. Bajorowicz, B., Kobyłański, M. P., Gołębiewska, A., Nadolna, J., Zaleska-Medynska, A., & Malankowska, A. (2018). Quantum dot-decorated semiconductor micro- and nanoparticles: A review of their synthesis, characterization and application in photocatalysis. *Advances in Colloid and Interface Science*, 256, 352–372. doi:10.1016/j.cis.2018.02.003.
6. Schnauber, P., Schall, J., Bounouar, S., Höhne, T., Park, S.-I., Ryu, G.-H., ... Reitzenstein, S. (2018). Deterministic Integration of Quantum Dots into on-Chip Multimode Interference Beamsplitters Using in Situ Electron Beam Lithography. *Nano Letters*, 18(4), 2336–2342. doi:10.1021/acs.nanolett.7b05218.
7. Saravanan, A., Kumar, P. S., Karishma, S., Vo, D.-V. N., Jeevanantham, S., Yaashikaa, P. R., & George, C. S. (2020). A Review on Biosynthesis of Metal Nanoparticles and its Environmental Applications. *Chemosphere*, 128580. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128580.
8. Pirko Y., Borovaya M., Ihor Danylenko I. (2021). Eco-friendly Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Camellia sinensis* Phytoextracts. *Letters in Applied NanoBioScience*. Vol. 10, Issue 3, 2515 – 2524. Вилучено із <https://doi.org/10.33263/LIANBS103.25152524>.
9. Ammar, H. A. M., & El-Desouky, T. A. (2016). Green synthesis of nanosilver particles by *Aspergillus terreus* HA1N and *Penicillium expansum* HA2N and its antifungal activity against mycotoxigenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 89–100. doi:10.1111/jam.13140.
10. Abdelghany, T. M., Al-Rajhi, A. M. H., Al Abboud, M. A., Alawlaqi, M. M., Ganash Magdah, A., Helmy, E. A. M., & Mabrouk, A. S. (2017). Recent Advances in Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications: About Future Directions. A Review. *BioNanoScience*, 8(1), 5–16. doi:10.1007/s12668-017-0413-3.
11. Korbekandi H., Ashari Z., Iravani S., Abbasi S. Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using *Fusarium oxysporum*. *Iran. J. Pharm. Res.* 2013, Vol. 12, P. 289–298. doi:10.22037/IJPR.2013.1329.
12. Hamad, M. T. (2018). Biosynthesis of silver nanoparticles by fungi and their antibacterial activity. *International Journal of Environmental Science and Technology*. doi:10.1007/s13762-018-1814-8.
13. Roy, K., Sarkar, C. K., & Ghosh, C. K. (2014). Photocatalytic activity of biogenic silver nanoparticles synthesized using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) extract. *Applied Nanoscience*, 5(8), 953–959. doi:10.1007/s13204-014-0392-4.

14. Sahib F. H., Aldujaili N. H., & Alrufae M. M. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces boulardii* and their biological activity. *European Journal Pharmaceutical and Medical Research*, 4(9). Вилучено із [https://www.researchgate.net/profile/Nawfal-Aldujaili/publication/322369747\\_BIOSYNTHESIS\\_OF\\_SILVER\\_NANOPARTICLES\\_USING\\_Saccharomyces\\_boulardii\\_AND\\_STUDY\\_THEIR\\_BIOLOGICAL\\_ACTIVITIES/links/5a567a70aca272bb6963eec0/BIOSYNTHESIS-OF-SILVER-NANOPARTICLES-USING-Saccharomyces-boulardii-AND-STUDY-THEIR-BIOLOGICAL-ACTIVITIES.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Nawfal-Aldujaili/publication/322369747_BIOSYNTHESIS_OF_SILVER_NANOPARTICLES_USING_Saccharomyces_boulardii_AND_STUDY_THEIR_BIOLOGICAL_ACTIVITIES/links/5a567a70aca272bb6963eec0/BIOSYNTHESIS-OF-SILVER-NANOPARTICLES-USING-Saccharomyces-boulardii-AND-STUDY-THEIR-BIOLOGICAL-ACTIVITIES.pdf).
15. Aymonier, C., Schlotterbeck, U., Antonietti, L., Zacharias, P., Thomann, R., Tiller, J. C., & Mecking, S. (2002). Hybrids of silver nanoparticles with amphiphilic hyperbranched macromolecules exhibiting antimicrobial properties. *Chemical Communications*, (24), 3018–3019. doi:10.1039/b208575e.
16. Wang, X., Wang, Z., Zhang, J., Qi, H., Chen, J., & Xu, M. (2016). Cytotoxicity of AgNPs/CS composite films: AgNPs immobilized in chitosan matrix contributes a higher inhibition rate to cell proliferation. *Bioengineered*, 7(5), 283–290. doi:10.1080/21655979.2016.1197683.
17. Balto, H., Bukhary, S., Al-Omran, O., BaHammam, A., & Al-Mutairi, B. (2020). Combined effect of a mixture of silver nanoparticles and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of Endodontics*. doi:10.1016/j.joen.2020.07.001.
18. Chestnova, T. V., Zilov, V. G., Gladkikh, P. G., Khadartsev, A. A., Korotkova, A. S., & Buzulukov, Y. P. (2018). Combined Effect of Silver Nanoparticles, Ceftriaxone, and Methyluracil during Experimental Purulent Peritonitis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 165(6), 777–780. doi:10.1007/s10517-018-4262-z.
19. Nanda, A., Nayak, B. K., & Krishnamoorthy, M. (2018). Antimicrobial properties of biogenic silver nanoparticles synthesized from phylloplane fungus, *Aspergillus tamarii*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 225–228. doi:10.1016/j.bcab.2018.08.002.
20. Galdiero, S., Rai, M., Gade, A., Falanga, A., Incoronato, N., Russo, L., ... Ingle, A. (2013). Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *International Journal of Nanomedicine*, 4303. doi:10.2147/ijn.s50070.
21. Gurunathan, S., Qasim, M., Choi, Y., Do, J. T., Park, C., Hong, K., ... Song, H. (2020). Antiviral Potential of Nanoparticles—Can Nanoparticles Fight Against Coronaviruses? *Nanomaterials*, 10(9), 1645. doi:10.3390/nano10091645.
22. Ratan Z.A., Mashrur F.R., Chhoan A.P., Shahriar S.Md., Mohammad and other. (2021). Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents. *Pharmaceutics*, 13(12), 2034. doi:10.3390/pharmaceutics13122034.
23. Chen, L., & Liang, J. (2020). An overview of functional nanoparticles as novel emerging antiviral therapeutic agents. *Materials Science and Engineering: C*, 110924. doi:10.1016/j.msec.2020.110924.