

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ХАРЧЕНКО ЄВГЕН

УДК 602.4:[602.3:582.282.23

ДИСЕРТАЦІЯ

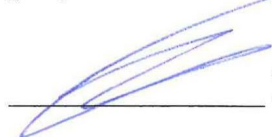
**ВИКОРИСТАННЯ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ДЛЯ
ОДЕРЖАННЯ НАНОЧАСТОК СРІБЛА**

Спеціальність 162 – Біотехнології та біоінженерія

Галузь знань 16 – Хімічна та біоінженерія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



Харченко Є.

Науковий керівник: Скроцька Оксана Ігорівна

кандидат біологічних наук, доцент

Київ-2022

АНОТАЦІЯ

Харченко Є. «Використання дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для одержання наночастинок срібла» – кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 162 «Біотехнологія та біоінженерія». – Національний університет харчових технологій Міністерства освіти та науки України, Київ, 2022.

Біологічний спосіб синтезу дозволяє отримувати наночастки срібла (AgNPs) різної форми та розмірів, що досягається різними умовами біосинтезу, такими як зміна температури, рН, часу культивування, концентрації нітрату срібла та ін. Слід наголосити, що отримання AgNPs з використанням мікроорганізмів є екологічно чистим та економічно вигідним, оскільки відпадає необхідність у використанні токсичних та дорогих матеріалів, які застосовуються при хімічному і фізичному методах синтезу наночастинок.

На сьогодні встановлено ряд біологічних (антибактеріальна, протигрибкова, антивірусна, протипухлинна дія) та фізико-хімічних властивостей біогенних наночастинок срібла, що дозволяють їх використовувати у медицині, харчовій промисловості, сільському господарстві, хімічній та нафтохімічній промисловості, електроніці та інших галузях. Найбільший практичний інтерес для біосинтезу наночастинок срібла викликають дріжджі, зокрема, *Saccharomyces cerevisiae*, що є одними з найбільш досліджених і широко використовуваних у промисловості мікроорганізмів. Тому дисертація присвячена дослідженню можливості використання дріжджів *S. cerevisiae* для біогенного синтезу наночастинок срібла та вивченню їх антибактеріальної та антиадгезивної активності

У дисертаційній роботі реалізовано два способи біосинтезу наночастинок срібла з використанням хлібопекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* M437 і *Saccharomyces cerevisiae* 71В. Перший спосіб: синтез AgNPs у супернатанті та безклітинному водному екстракті *S. cerevisiae* M437 (нітрат срібла для біосинтезу наночастинок вносили безпосередньо у супернатант і

безклітинний екстракт). Другий спосіб: синтез наночасток срібла відбувається у культуральній рідині *S. cerevisiae* 71В (для біосинтезу AgNPs нітрат срібла вносили на початку культивування *S. cerevisiae* 71В).

Встановлено характеристики та досліджено стабільність в процесі зберігання розчинів наночасток срібла отриманих з використанням *S. cerevisiae* М437. При використанні супернатанту *S. cerevisiae* М437 синтезувались AgNPs сферичної форми з діаметром близько 15 нм. Індекс полідисперсності (PdI) їх розчинів становив 0,3; дзета-потенціал -13,6. Після зберігання упродовж 45 діб при 4 °С значення PdI збільшилось в 1,6 разів, а дзета-потенціалу на 11,7 %. Ці результати дають підставу припустити, що в процесі зберігання можлива зміна форми AgNPs, формування агломератів або відбуваються інші процеси, які протікають у розчині наночасток у процесі їх зберігання. Наночастки срібла, які були отримані при використанні безклітинного водного екстракту *S. cerevisiae* М437 мали овальну форму з розмірами 21,3×14,2 нм. Індекс полідисперсності розчину – 0,3, а дзета-потенціал – -13,7. Після зберігання спостерігали збільшення значення PdI лише в 1,3 рази та зменшення показника дзета-потенціалу на 29 %. Це говорить, що розчин наночасток срібла, які були синтезовані з використанням безклітинного екстракту є більш стабільним після зберігання за вказаних вище умов.

Показано різницю у розмірах AgNPs при використанні різних методів дослідження (метод динамічного розсіювання світла – Zetasizer Nano ZS і трансмісивна електронна мікроскопія – TEM). Визначені розміри наночасток, що синтезувались з використанням безклітинного водного екстракту *S. cerevisiae* М437 при використанні TEM були в середньому на 75 % менші за значення отримані з використанням Zetasizer Nano ZS.

Досліджено діапазон концентрацій нітрату срібла (0,5-2 мМ) та встановлено ефективну концентрацію для біосинтезу AgNPs з використанням *S. cerevisiae* 71В. При використанні даного штаму дріжджів нітрат срібла вносили на початку культивування і наночастки срібла були синтезовані у культуральній рідині. Після чого працювали з розчинами AgNPs у супернатанті

та дріжджовому екстракті. Встановлено, що найбільш ефективні концентрації нітрату срібла для біосинтезу AgNPs становлять 0,5 мМ і 1,0 мМ: для наночастинок у безклітинному екстракті спостерігали збільшення у порівнянні з контролем оптичної густини у піку поглинання (400 нм) на 90 % та 118 %, а для наночастинок у супернатанті – на 95 % та 68 % відповідно.

В ході роботи встановлено антимікробну активність AgNPs, отриманих з використанням *S. cerevisiae* 71В. Найбільш ефективними виявились розчини наночастинок, отримані при внесенні 1,5 мМ та 2,0 мМ нітрату срібла на початку культивування дріжджів. Антибактеріальна дія по відношенню до референс-штамів *S. aureus* ATCC 25923 та *E. coli* ATCC 25922, а також клінічних ізолятів *S. aureus* 1536 та *K. pneumoniae* 520 при використанні розчину AgNPs у супернатанті була у 6-36, а у безклітинному екстракті у 9-21 разів більшою у порівнянні з контролем.

Показано антиадгезивну дію розчинів наночастинок, що були отримані при використанні *S. cerevisiae* 71В. У діапазоні досліджуваних концентрацій нітрату срібла для біосинтезу AgNPs високу антиадгезивну дію мали розчини наночастинок, що були отримані при внесенні 1,5 мМ та 2,0 мМ нітрату на початку культивування *S. cerevisiae* 71В. Розчини наночастинок срібла у супернатанті та безклітинному екстракті знижували адгезію *S. aureus* ATCC 25923 та *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* 1536 на 82-96 % та 80-97 % відповідно. По відношенню для клітин *K. pneumoniae* 520 досліджувані розчини наночастинок мали низьку антиадгезивну активність.

Наведені у даній роботі способи біосинтезу наночастинок срібла з використанням дріжджів *S. cerevisiae* та встановлені їх антимікробні властивості є підґрунтям для їх подальшого застосування в залежності від сфери практичного використання.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, наночастки, срібло, метали, синтез, розмір, дріжджі, бактерії, гриби, культура, мікроорганізм, культивування, антибактеріальна активність, антиадгезивна активність, біологічна активність.

Статті у наукових фахових виданнях України

1. Харченко, Є. В., & Скроцька, О. І. (2020). Використання мікроорганізмів для біогенного синтезу наночасток. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*, 26 (2), 57-70.

<http://dspace.nuft.edu.ua/handle/123456789/32152>

«Наукові праці Національного університету харчових технологій» включено у перелік наукових фахових видань за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія», категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 975 від 11.07.2019); міжнародна індексація: *Index Copernicus, Google Scholar, EBSCOhost*.

2. Харченко, Є., Лазюка, Ю., Скроцька, О., & Пенчук, Ю. (2021). Отримання біогенних наночасток срібла з використанням дріжджів і перспективи їх застосування у протимікробній терапії. *Наукові праці НУХТ*, 27 (3), 32-42.

http://sw.nuft.edu.ua/Archiv/2021/swnuft_27_3.pdf.pdf#page=32

«Наукові праці Національного університету харчових технологій» включено у перелік наукових фахових видань за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія», категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 975 від 11.07.2019); міжнародна індексація: *Index Copernicus, Google Scholar, EBSCOhost*.

3. Скроцька, О., Лазюка, Ю., & Харченко, Є. (2022). Наночастки срібла та золота: практичне застосування, біосинтез з використанням дріжджів, біологічна активність. *Наукові праці НУХТ*, 28 (1), 18-31.

http://sw.nuft.edu.ua/Archiv/2022/swnuft_28_1.pdf#page=18

«Наукові праці Національного університету харчових технологій» включено у перелік наукових фахових видань за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія», категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 975 від 11.07.2019); міжнародна індексація: *Index Copernicus, Google Scholar, EBSCOhost*.

4. Skrotska, O., Kharchenko, Y., Laziuka, Y., Marynin, A., & Kharchuk, M. (2021). Biosynthesis and characteristics of silver nanoparticles obtained using *Saccharomyces cerevisiae* M437. *Ukrainian Food Journal*, 10 (3), 615-631.

<http://www.ufj.ho.ua/Archiv/UKRAINIAN%20FOOD%20JOURNAL%202021%20V.10%20Is.3.pdf#page=195>

«*Ukrainian Food Journal*» включено у перелік наукових фахових видань за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія», категорія А (Наказ Міністерства освіти і науки України № 358 від 15.03.2019); міжнародна індексація *Emerging Sources Citation Index* (складова **Web of Science**), *Google Scholar*, *Index Copernicus*, *Directory of Research Journal Indexing (DRJI)*, *Universal Impact Factor*, *EBSCO*, *Ulrichs Web*, *ERIH PLUS*, *Directory of Open Access Scholarly Resources*, *Directory of Open Access Journal*, *CAS Source Index*, *Scopus*.

Статті у періодичних виданнях країн Європейського Союзу

5. Kharchenko, Y., Lastovetska, L., Maslak, V., Sidorenko, M., Vasylenko, V., & Shydlovska, O. (2022). Antibacterial Activity of Green Synthesised Silver Nanoparticles on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Sciences*, 12(7), 3466. doi: 10.3390/app12073466.

<https://www.mdpi.com/2076-3417/12/7/3466>

Applied Sciences – це міжнародний рецензований журнал (Швейцарія) відкритого доступу з усіх аспектів прикладних природничих наук, який публікується кожні півмісяця онлайн MDPI. Індексується в базах даних **Scopus**, **SCIE (Web of Science)**, *Inspec*, *CAPlus/SciFinder*, та інших. Рейтинг журналу: **CiteScore – Q2 (інженерний, багатопрофільний)**.

Тези доповідей у матеріалах конференцій

6. Харченко, Є., & Скроцька, О.І. (2019). Перспективи використання бактерій для синтезу біогенних наночасток на прикладі наночасток срібла і золота. Збірник тез VIII Міжнародної науково-практичної онлайн конференції

студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії». Київ: НУБіП України.

7. Kharchenko, Y., & Skrotska, O.I. (2019). *Biogenic silver nanoparticles as potential antimicrobial agents*. VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement «Science and modern pharmaceutical manufacturing». Kyiv: Український медичний часопис.

8. Харченко, Є., & Скроцька, О.І. (2020). *Використання бактерій для синтезу наночасток металів*. Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю «Нанотехнології і наноматеріали у фармації та медицині». Харків: НФаУ.

9. Лазюка, Ю.В., Харченко, Є.В., & Скроцька, І.О. (2020). *Можливість використання грибів та бактерій для біологічного синтезу наночасток срібла*. Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття». Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського.

10. Лазюка, Ю.В., Харченко, Е.В., & Скроцкая, О.И. (2020). *Перспективы использования Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241 для получения наночастиц серебра*. Тезисы докладов участников Республиканской конференции с международным участием, посвященной 80-летию со дня рождения Т.С. Морозкиной «Физико-химическая биология как основа современной медицины». Минск: БГМУ.

11. Kharchenko, Y., & Skrotska, O. (2020). *Peculiarities of the synthesis of biogenic silver nanoparticles by bacteria*. Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті». Київ: НУХТ.

12. Laziuka, Y., Kharchenko, Y., & Skrotska, O. (2020). *Biosynthesis of silver nanoparticles using Acinetobacter calcoaceticus IMV V-7241 cell-free supernatant*. Збірник тез доповідей XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології». Львів: ЛНУ ім. Івана Франка.

13. Laziuka, Y., Skrotska, O., & Kharchenko, Y. (2020). *Ecological synthesis of silver nanoparticles using bacteria*. Actual environmental problems. Proceedings of

the X International Scientific Conference of young scientists, master and PhD students. Minsk: «Информационно-вычислительный центр Министерства финансов Республики Беларусь».

14. Харченко, Є.В., Лазюка, Ю.В., & Скроцька, О.І. (2021) *Синтез наночасток металів з використанням рослинних екстрактів*. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції «PLANTA+. Наука, практика та освіта». Київ: НМУ ім. Богомольця.

15. Лазюка, Ю.В., Харченко, Е.В., & Скроцкая, О.И. (2021). *Получение наночастиц серебра с использованием микроорганизмов и их антибиоплёночные свойства*. Сборник тезисов докладов LXXV Международной научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Актуальные проблемы современной медицины и фармации – 2021». Минск: БГМУ.

16. Лазюка, Ю.В., Потапенко, В.В., Харченко, Е.В., & Скроцкая, О.И. (2021). *Использование сахаромикетов для биосинтеза наночастиц серебра*. Тезисы докладов участников Международной научной конференции «Физико-химическая биология как основа современной медицины». Минск: БГМУ.

17. Харченко, Є., & Скроцька, О. (2021). *Синтез наночасток срібла з використанням рослинних екстрактів*. Матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті». Київ: НУХТ.

18. Лазюка, Ю.В., Скроцька, О.І., & Харченко, Є.В. (2021). *Спектрофотометричний аналіз наночасток срібла синтезованих з використанням безклітинного дріжджового екстракту*. Програма та тези матеріалів Х Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції». Київ: НУХТ.

19. Kharchenko, Y., Skrotska, O., Laziuka, Y., & Potapenko, V. (2021). *Biosynthesis of silver nanoparticles by Saccharomyces cerevisiae M437*. Матеріали ІІІ Міжнародної науково-практичної конференції «Європейські виміри сталого розвитку». Київ: НУХТ.

20. Kharchenko, Y., & Skrotska, O. (2021). *Saccharomycetes as biological agents for the mediated biosynthesis of silver nanoparticles*. The International Conference «Biotechnologies, Present and Perspectives», 8 Edition. Suceava: "Stefan cel Mare" University.

21. Харченко, Є., & Скроцька, О. (2022) *Використання нанокмпозитів та наночасток срібла для подовження терміну зберігання овочевих культур*. Матеріали 88 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті». Київ: НУХТ.

ABSTRACT

Kharchenko Y. The use of *Saccharomyces cerevisiae* yeast for the production of silver nanoparticles.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 162 "Biotechnology and Bioengineering". – National University Of Food Technologies of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2022.

The biological method of synthesis allows obtaining silver nanoparticles (AgNPs) of different shapes and sizes, which is achieved by different conditions of biosynthesis, such as a change in temperature, pH, cultivation time, concentration of silver nitrate, etc. It should be noted that the production of AgNPs using microorganisms is environmentally friendly and economically beneficial, since there is no need to use toxic and expensive materials used in the chemical and physical methods of nanoparticle synthesis.

To date, a number of biological (antibacterial, antifungal, antiviral, antitumor effects) and physicochemical properties of biogenic silver nanoparticles have been established, allowing them to be used in medicine, food industry, agriculture, chemical and petrochemical industries, electronics and other industries. The greatest practical interest for the biosynthesis of silver nanoparticles is caused by yeast, in particular *Saccharomyces cerevisiae*, which is one of the most studied and widely used microorganisms in industry. Therefore, the dissertation work is devoted to the study of the possibility of using the yeast *S. cerevisiae* for the biogenic synthesis of silver nanoparticles and the study of their antibacterial and antiadhesive activity.

In the dissertation work, two methods for the biosynthesis of silver nanoparticles were implemented using baking yeast *Saccharomyces cerevisiae* M437 and *Saccharomyces cerevisiae* 71B. The first method: the synthesis of AgNPs in the supernatant and cell-free aqueous extract of *S. cerevisiae* M437 (silver nitrate for the biosynthesis of nanoparticles was added directly to the supernatant and cell-free extract). The second method: the synthesis of silver nanoparticles occurs in the culture

liquid of *S. cerevisiae* 71B (for the biosynthesis of AgNPs, silver nitrate was added at the beginning of cultivation of *S. cerevisiae* 71B).

The characteristics and stability during storage of solutions of silver nanoparticles obtained using *S. cerevisiae* M437 were determined. Using the *S. cerevisiae* M437 supernatant, spherical AgNPs with a diameter of about 15 nm were synthesized. The polydispersity index (PdI) of their solutions was 0.3; zeta potential -13.6. After storage for 45 days at 4 °C, the PdI value increased by 1.6 times, and the zeta potential by 11.7%. These results give reason to assume that in the process of storage, a change in the shape of AgNPs, the formation of agglomerates, or other processes occurring in the solution of nanoparticles during their storage are possible. Silver nanoparticles obtained using a cell-free aqueous extract of *S. cerevisiae* M437 had an oval shape with dimensions of 21.3 × 14.2 nm. The polydispersity index of the solution is 0.3, and the zeta potential is -13.7. After storage, an increase in the PdI value by only 1.3 times and a decrease in the zeta potential by 29% were observed. This suggests that the silver nanoparticle solution that was synthesized using the cell-free extract is more stable after storage under the above conditions.

The difference in the size of AgNPs was shown using various research methods (dynamic light scattering method – Zetasizer Nano ZS and transmission electron microscopy – TEM). The determined sizes of nanoparticles synthesized using a cell-free aqueous extract of *S. cerevisiae* M437 using TEM were, on average, 75% smaller than those obtained using Zetasizer Nano ZS.

The concentration range of silver nitrate (0.5-2 mM) was studied and the effective concentration for the biosynthesis of AgNPs using *S. cerevisiae* 71B was established. When using this yeast strain, silver nitrate was introduced at the beginning of cultivation, and silver nanoparticles were synthesized in the culture liquid. After that, we worked with solutions of AgNPs in the supernatant and yeast extract. It was found that the most effective concentrations of silver nitrate for the biosynthesis of AgNPs are 0.5 mM and 1.0 mM: for nanoparticles in a cell-free extract, an increase in optical density at the absorption peak (400 nm) by 90% and 18 for nanoparticles in supernatant, by 95% and 68%, respectively.

In the course of the work, the antimicrobial activity of AgNPs obtained using *S. cerevisiae* 71B was established. The most effective were the solutions of nanoparticles obtained by adding 1.5 and 2.0 mM silver nitrate at the beginning of yeast cultivation. The antibacterial activity against the reference strains *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 25922, as well as the clinical isolates of *S. aureus* 1536 and *K. pneumoniae* 520, when using the AgNPs solution in the supernatant, was 6-3 9-21 times more compared with control.

The antiadhesive effect of nanoparticle solutions obtained using *S. cerevisiae* 71B was shown. In the range of silver nitrate concentrations studied for the biosynthesis of AgNPs, a high antiadhesive effect was exerted by solutions of nanoparticles obtained by adding 1.5 mM and 2.0 mM nitrate at the beginning of cultivation of *S. cerevisiae* 71B. Solutions of silver nanoparticles in the supernatant and cell-free extract reduced the adhesion of *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* 1536 by 82-96% and 80-97%, respectively. In relation to *K. pneumoniae* 520 cells, the studied solutions of nanoparticles had low antiadhesive activity.

The methods for the biosynthesis of silver nanoparticles using the yeast *S. cerevisiae* and the established antimicrobial properties presented in this work are the basis for their further application, depending on the scope of practical use.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, nanoparticles, silver (Ag), metals, synthesis, shape, yeasts, bacteria, fungi, culture, microorganism, cultivation (culturing), antibacterial activity, anti-adhesive activity, biological activity.

Articles in scientific professional publications of Ukraine

1. Kharchenko, Y., & Skrotska, O. I. (2020). Use of microorganisms for biogenic synthesis of nanoparticles. *Scientific Works of NUFT*, 26(2), 57-70. doi: 10.24263/2225-2924-2020-26-2-6

<http://dspace.nuft.edu.ua/handle/123456789/32152>

«Publications of the National University of Food Technologies» is included into the list of scientific professional publications in the specialty 162 Biotechnology and

Bioengineering, Category B (Order № 975 of the Ministry of Education and Science of Ukraine dtd 11.07.2019); Index Copernicus, Google Scholar, EBSCOhost.

2. Kharchenko, Y., Laziuka, Y., Skrotska, O., & PENCHUK, Y. (2021). Obtaining biogenic silver nanoparticles using yeast and prospects for their application in antimicrobial therapy. *Scientific Works of NUFT*, 27(3), 32-42. doi: 10.24263/2225-2924-2021-27-3-6.

http://sw.nuft.edu.ua/Archiv/2021/swnuft_27_3.pdf.pdf#page=32

«Publications of the National University of Food Technologies» is included into the list of scientific professional publications in the specialty 162 Biotechnology and Bioengineering, Category B (Order № 975 of the Ministry of Education and Science of Ukraine dtd 11.07.2019); Index Copernicus, Google Scholar, EBSCOhost.

3. Skrotska, O., Laziuka, Y., & Kharchenko, Y. (2022). Silver and gold nanoparticles: practical application, biosynthesis using yeast, bioactivity. *Scientific Works of NUFT*, 28(1), 18-31. doi: 10.24263/2225-2924-2022-28-1-4.

http://sw.nuft.edu.ua/Archiv/2022/swnuft_28_1.pdf#page=18

«Publications of the National University of Food Technologies» is included into the list of scientific professional publications in the specialty 162 Biotechnology and Bioengineering, Category B (Order № 975 of the Ministry of Education and Science of Ukraine dtd 11.07.2019); Index Copernicus, Google Scholar, EBSCOhost.

4. Skrotska, O., Kharchenko, Y., Laziuka, Y., Marynin, A., & Kharchuk, M. (2021). Biosynthesis and characteristics of silver nanoparticles obtained using *Saccharomyces cerevisiae* M437. *Ukrainian Food Journal*, 10(3), 615-631. doi: 10.24263/2304-974X-2021-10-3-14.

<http://www.ufj.ho.ua/Archiv/UKRAINIAN%20FOOD%20JOURNAL%202021%20V.10%20Is.3.pdf#page=195>

«Ukrainian Food Journal» is included into the list of scientific professional publications in the specialty 162-Biotechnology and Bioengineering, Category A (Order № 358 of the Ministry of Education and Science of Ukraine dtd 15.03.2019); Emerging Sources Citation Index (Web of Science), Google Scholar, Index Copernicus, Directory of Research Journal Indexing (DRJI), Universal Impact Factor, EBSCO,

Ulrichs Web, ERIH PLUS, Directory of Open Access Scholarly Resources, Directory of Open Access Journal, CAS Source Index

Articles in periodicals of European Union countries

5. Kharchenko, Y., Lastovetska, L., Maslak, V., Sidorenko, M., Vasylenko, V., & Shydlovska, O. (2022). Antibacterial Activity of Green Synthesised Silver Nanoparticles on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Sciences*, 12(7), 3466.

<https://www.mdpi.com/2076-3417/12/7/3466>

Applied Sciences – is an international peer-reviewed open access journal (Switzerland) on all aspects of applied science, published semi-monthly online by MDPI. Indexed in Scopus, SCIE (Web of Science), Inspec, CAPlus/SciFinder, and other databases. Journal rating: CiteScore – Q2 (engineering, multidisciplinary).

Abstracts of the conference reports

6. Kharchenko, Y., Skrotska, O.I. (2019). *Prospects of using bacteria for the synthesis of biogenic nanoparticles on the example of silver and gold nanoparticles*. Collection of abstracts of the VII International scientific and practical online conference of students, graduate students and young scientists "Biotechnology: accomplishment and hopes". Kyiv: NUBiP of Ukraine.

7. Kharchenko, Y., & Skrotska, O.I. (2019). *Biogenic silver nanoparticles as potential antimicrobial agents*. VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement «Science and modern pharmaceutical manufacturing». Kyiv: Ukrainian medical journal.

8. Kharchenko, Y., & Skrotska, O.I. (2020). *Use of bacteria for the synthesis of metal nanoparticles*. Materials of the 4th All-Ukrainian Scientific and Practical Internet Conference with International Participation "Nanotechnologies and Nanomaterials in Pharmacy and Medicine". Kharkiv: NFaU.

9. Laziuka, Y.V., Kharchenko, Y., & Skrotska, O.I. (2020). *The possibility of the use fungi and bacteria for the biological synthesis of silver nanoparticles*. Materials of

the 14th All-Ukrainian Scientific and Practical Conference "Biotechnology of the 21st Century". Kyiv: KPI im. Igor Sikorsky.

10. Laziuka, Y.V., Kharchenko, Y., & Skrotska, O.I. (2020). *Prospects for the use of Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241 for the preparation of silver nanoparticles*. Abstracts of the reports of the participants of the Republican conference with international participation, dedicated to the 80th anniversary of the birth of T.S. Morozkina "Physical and chemical biology as the basis of modern medicine". Minsk: BSMU.

11. Kharchenko, Y., Skrotska, O. (2020). *Peculiarities of the synthesis of biogenic silver nanoparticles by bacteria*. Materials of the 86th International Scientific Conference of Young Scientists, Graduate Students and Students "Scientific Achievements of Youth - Solving Human Nutrition Problems in the XXI Century". Kyiv: NUFT.

12. Laziuka, Y., Kharchenko, Y., & Skrotska, O. (2020). *Biosynthesis of silver nanoparticles using Acinetobacter calcoaceticus IMV V-7241 cell-free supernatant*. Collection of abstracts of reports of the XVI International scientific conference of students and postgraduates "Youth and the progress of biology". Lviv: LNU im Ivan Franko.

13. Laziuka, Y., Skrotska, O., & Kharchenko, Y. (2020). *Ecological synthesis of silver nanoparticles using bacteria*. Actual environmental problems. Proceedings of the X International Scientific Conference of young scientists, master and PhD students. Minsk: "Information Computing Center of the Ministry of Finance of the Republic of Belarus".

14. Kharchenko, Y., Laziuka, Y.V., & Skrotska, O.I. (2021). *Synthesis of metal nanoparticles using plant extracts*. Materials of the international scientific and practical conference "PLANTA+. Science, practice and education". Kiev: NMU im. Bogomolets.

15. Laziuka, Y.V., Kharchenko, Y., & Skrotska, O.I. (2021). *Obtaining silver nanoparticles using microorganisms and their antibiofilm properties*. Collection of abstracts of the LXXV International scientific and practical conference of students and

young scientists "Actual problems of modern medicine and pharmacy - 2021". Minsk: BSMU.

16. Laziuka, Y.V., Kharchenko, Y., & Skrotska, O.I. (2021). *The use of Saccharomyces for the biosynthesis of silver nanoparticles*. Abstracts of the participants of the International Scientific Conference "Physical and chemical biology as the basis of modern medicine". Minsk: BSMU.

17. Kharchenko Y., & Skrotska O. (2021). *Synthesis of silver nanoparticles using plant extracts*. Materials of the 87th International scientific conference of young scientists, graduate students and students "Scientific achievements of youth - solving the problems of human nutrition in the XXI century". Kyiv: NUFT.

18. Laziuka, Y.V., Skrotska, O.I., & Kharchenko, Y. (2021). *Spectrophotometric analysis of nanoparticles of spores synthesized from vicarious clementine-free yeast extract*. Program and abstracts of materials of the X International scientific and technical conference "Scientific problems of food technologies and industrial biotechnology in the context of European integration". Kyiv: NUFT.

19. Kharchenko, Y., Skrotska, O., Laziuka, Y., & Potapenko, V. (2021). *Biosynthesis of silver nanoparticles by Saccharomyces cerevisiae M437*. Materials of the 3rd International Scientific and Practical Conference "European Dimensions of Sustainable Development". Kyiv: NUFT.

20. Kharchenko, Y., & Skrotska, O. (2021). *Saccharomyces as biological agents for the mediated biosynthesis of silver nanoparticles*. The International Conference «Biotechnologies, Present and Perspectives», 8 Edition. Suceava: "Stefan cel Mare" University.

21. Kharchenko, Y., & Skrotska, O. (2022) *The use of nanocomposites and silver nanoparticles to extend the shelf life of vegetable crops*. Materials of the 88th International scientific conference of young scientists, graduate students and students "Scientific achievements of young people - solving the problems of human nutrition in the 21st century". Kyiv: NUFT.

ЗМІСТ

| | Стор. |
|---|-------|
| ВСТУП | 20 |
| РОЗДІЛ 1. ВИКОРИСТАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ ДЛЯ БІОГЕННОГО СИНТЕЗУ НАНОЧАСТОК | 28 |
| 1.1. Наночастки та їх застосування | 28 |
| 1.2. Синтез наночасток з використанням мікроорганізмів | 31 |
| 1.2.1. Можливості використання бактерій | 32 |
| 1.2.2. Використання грибів для синтезу наночасток | 36 |
| 1.2.3. Дріжджі як джерело отримання наночасток | 39 |
| Висновки до розділу 1 | 42 |
| РОЗДІЛ 2. НАНОЧАСТКИ СРІБЛА: БІОСИНТЕЗ З ВИКОРИСТАННЯМ ДРІЖДЖІВ ТА ЇХ БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ | 43 |
| 2.1. Можливості використання дріжджів для біосинтезу наночасток срібла | 44 |
| 2.2. Антимікробна дія наночасток срібла | 46 |
| 2.2.1. Актуальність впровадження препаратів на основі наночасток срібла проти коронавірусної інфекції | 48 |
| 2.2.2. Гіпотетична модель промислового виробництва біогенних наночасток срібла для їх використання проти SARS-CoV-2 | 52 |
| 2.3. Механізм синтезу наночасток срібла та їх протимікробної дії | 53 |
| 2.4. Протиракова активність наночасток срібла | 57 |
| 2.5. Інші властивості біогенних наночасток срібла | 58 |
| Висновки до розділу 2 | 59 |
| РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ | 61 |
| 3.1. Об'єкти досліджень | 61 |
| 3.2. Поживні середовища та матеріали | 61 |
| 3.3. Культивування дріжджів | 62 |
| 3.3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> M437..... | 62 |

| | |
|---|-----------|
| | 18 |
| 3.3.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 71B | 63 |
| 3.4. Біосинтез наночастинок срібла | 63 |
| 3.4.1. Використання <i>Saccharomyces cerevisiae</i> M437 для отримання наночастинок срібла | 63 |
| 3.4.2. Синтез наночастинок з використанням <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 71B | 64 |
| 3.5. UV-vis спектроскопія синтезованих наночастинок срібла | 64 |
| 3.6. Аналіз розміру і зета-потенціалу наночастинок срібла | 65 |
| 3.7. Електронна мікроскопія | 65 |
| 3.8. Визначення концентрації іонів срібла | 65 |
| 3.9. Визначення біологічної активності біогенних наночастинок срібла | 66 |
| 3.9.1. Дослідження антибактеріальної дії | 66 |
| 3.9.2. Встановлення антиадгезивної активності | 67 |
| 3.10. Статистичний аналіз | 67 |
| Висновки до розділу 3 | 68 |
| РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ОТРИМАНИХ З ВИКОРИСТАННЯМ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> M437 | 69 |
| 4.1. Біосинтез наночастинок срібла та UV-vis спектроскопія | 69 |
| 4.2. Розмір, зета-потенціал та стабільність біосинтезованих наночастинок | 72 |
| 4.3. Електронна мікроскопія | 78 |
| Висновки до розділу 4 | 81 |
| РОЗДІЛ 5. НАНОЧАСТИНКИ СРІБЛА, СИНТЕЗОВАНІ З ВИКОРИСТАННЯМ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> 71B ТА ЇХ БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ | 82 |
| 5.1. Спектроскопічні дослідження | 82 |
| 5.2. Визначення концентрації іонів срібла..... | 84 |
| 5.3. Антибактеріальна дія | 85 |

| | |
|---|-----|
| | 19 |
| 5.4. Антиадгезивна активність | 89 |
| Висновки до розділу 5 | 93 |
| ВИСНОВКИ | 95 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ | 97 |
| ДОДАТКИ | 117 |
| ДОДАТОК А. Акти апробації результатів у навчальний процес | 117 |
| ДОДАТОК Б. Список опублікованих праць за темою дисертації | 121 |

ВСТУП

Актуальність теми. Наночастки срібла (AgNPs) можна отримати різними способами – хімічними та фізичними методами, а також біогенним синтезом. Хімічний та фізичний способи синтезу наночастинок мають ряд недоліків – використання агресивних, токсичних та дороговартісних реагентів, висока температура синтезу або тиск, негативний вплив на довкілля (Lekha et al., 2021; Halder et al., 2021). Саме тому досить перспективним є саме біологічний синтез наночастинок (Noah, 2019).

Для біогенного синтезу наночастинок можна використовувати рослини, клітини міцеліальних грибів, бактерій та дріжджів (Kumar et al., 2021). Вибір кожного з цих об'єктів для біосинтезу наночастинок має свої переваги та недоліки. Недоліком використання рослин є необхідність у великих площах для їх вирощування, тривалість росту, витрати на збір рослин та екстракцію біомолекул, що приймають участь у синтезі наночастинок (Castillo-Henriquez L. et al., 2020). При використанні міцеліальних грибів недоліком є тривалий час їх культивування (Bahrulolum et al., 2021). Використання бактерій у порівнянні з рослинами та грибами має ряд переваг, проте слід зазначити, що бактерії – це прокаріоти, тому продукти їх метаболізму матимуть меншу біосумісність так як у них, в порівнянні з еукаріотичними моделями, відсутня система кепування і поліаденілювання, що захищають біомолекули і наночастки від деградації і утворення токсичних сполук в організмі (Liu et al., 2021). Серед переваг використання дріжджів у порівнянні з бактеріями є те, що дріжджі на відміну від більшості бактерій більш прості й безпечні у роботі, так як не потребують специфічних заходів біобезпеки (Grasso, Zane & Dragone, 2020).

AgNPs найбільш широко використовуються як антимікробні засоби (Brown et al., 2012), оскільки проявляють антибактеріальну, протигрибкову, антивірусну та протиракову активність, при цьому, показуючи незначну цитотоксичність для клітин тварин (Kasithevar, Periakaruppan, Muthupandian & Mohan, 2017; Kumar & Sujitha, 2014). Крім того, AgNPs характеризуються антимікробною дією щодо стійких до антибіотиків штамів бактерій, а також

показали протівірусну активність, зокрема при лікуванні коронавірусної інфекції (Iqtedar et al., 2019; Gurunathan et al., 2020; Jeremiah, Miyakawa, Morita, Yamaoka & Ryo, 2020).

Завдяки антибактеріальним властивостям біосинтезовані наночастки срібла можна використовувати у медичних цілях, адже стійкість патогенних бактерій до антибіотиків є величезною проблемою сьогодення. Наприклад, *Klebsiella pneumoniae* проявляє високу резистентність до β -лактамів (Iqtedar et al., 2019). Серед *K. pneumoniae* виявлено гіпервірулентні штами, які викликають розвиток важкопротікаючих інфекцій в медичних установах і поза ними. Ці штами спричиняють абсцеси печінки, при цьому захворювання може поширюватись на віддалені області, найчастіше це очі, легені та центральна нервова система (Gurunathan et al., 2020; Jeremiah et al., 2020). Досить поширеними в медичних установах є антибіотикорезистентні штами *Staphylococcus aureus*, які спричиняють бактеріємію, ендокардит, інфекції шкіри та м'яких тканин, кісток і суглобів, а також смертельну пневмонію (Iqtedar et al., 2019).

Також біосинтезовані AgNPs мають великі перспективи використання і у харчовій промисловості завдяки широкому спектру антимікробної дії проти патогенів харчового походження – *Listeria monocytogenes* (Amer, Abushady, Refay & Mailam, 2021), *Campylobacter* (Silvan, Zorraquin-Pena, Gonzalez, Moreno-Arribas, & Martinez-Rodriguez, 2018), *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* (Du et al., 2019; Chandhru, M., Logesh, R., Rani, S.K., Ahmed, N., & Vasimalai, 2019), *Staphylococcus aureus* (Reddy et al., 2021), *Klebsiella pneumoniae* (Huang et al., 2020), *грибів роду Aspergillus* (Bocate et al., 2019).

Залежно від вибору біологічного об'єкта, умов культивування, а також параметрів біогенного синтезу можуть формуватися AgNPs різного розміру та форми, що впливатиме на їх подальші біологічні властивості та можливість використання у різних галузях.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана згідно плану науково-дослідної роботи кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій (НУХТ) «Біотехнологічний потенціал мікроорганізмів природних та техногенних екосистем (2019-2023 рр., № державної реєстрації 0119U001485).

Мета і завдання досліджень.

Мета дисертаційної роботи – дослідити можливість використання дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для біогенного синтезу наночасток срібла та вивчити їх антибактеріальну та антиадгезивну активність.

Основні завдання досліджень:

- здійснити аналіз літературних джерел в основному за останні 10 років, що стосуються тематики біогенного синтезу наночасток з використанням мікроорганізмів;
- дослідити біосинтез наночасток срібла у супернатанті та безклітинному водному екстракті *Saccharomyces cerevisiae* M437; визначити розмір біогенних AgNPs, їх форму, зета-потенціал, індекс полідисперсності та дослідити стабільність розчину наночасток при зберіганні;
- дослідити синтез AgNPs у культуральній рідині *Saccharomyces cerevisiae* 71B та визначити оптимальну для біосинтезу наночасток концентрацію нітрату срібла;
- визначити концентрацію іонів срібла, які не відновились в процесі біогенного синтезу наночасток срібла з використанням *Saccharomyces cerevisiae* 71B;
- дослідити антибактеріальну та антиадгезивну дію біогенних AgNPs у різних розчинах наночасток, отриманих з культуральної рідини *Saccharomyces cerevisiae* 71B

Об'єкти досліджень – дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* M437 та *Saccharomyces cerevisiae* 71B, біосинтезовані наночастки срібла.

Предмет досліджень – біосинтез наночасток срібла з використанням клітин *S. cerevisiae* M437 та *S. cerevisiae* 71B, стабільність розчину наночасток,

антибактеріальна та антиадгезивна активність біогенних AgNPs.

Методи досліджень. Під час виконання дисертаційної роботи використовували такі методи досліджень: біотехнологічні (культивування дріжджів *S. cerevisiae* M437 та *S. cerevisiae* 71B; біосинтез наночастинок срібла у супернатанті, безклітинному водному екстракті та у культуральній рідині *S. cerevisiae*); фізичні (UV-vis спектроскопія, визначення розміру і форми часток за допомогою методу динамічного розсіювання світла (Zetasizer Nano ZS), визначення дзета-потенціалу, трансмісивна електронна мікроскопія (TEM); фізико-хімічні (визначення концентрації іонів срібла); мікробіологічні (визначення антибактеріальної та антиадгезивної дії біосинтезованих наночастинок срібла); математичні (статистична обробка результатів досліджень MS Excel, STATISTICA).

Наукова новизна одержаних результатів.

Встановлено, що при використанні дріжджів *S. cerevisiae* M437 та *S. cerevisiae* 71B можна здійснювати біосинтез наночастинок срібла. При цьому AgNPs синтезувались у супернатанті культуральної рідини та безклітинному водному екстракті *S. cerevisiae* M437 при внесенні нітрату срібла безпосередньо у вказані розчини. При використанні *S. cerevisiae* 71B показано синтез AgNPs у культуральній рідині, при цьому нітрат срібла вносили на початку культивування дріжджів, а в подальшому працювали з розчинами наночастинок, що містились у супернатанті та безклітинному екстракті.

Виявлено, що при використанні супернатанту культуральної рідини *S. cerevisiae* M437 синтезуються AgNPs сферичної форми (середній діаметр 15,6 нм), а при використанні безклітинного екстракту *S. cerevisiae* M437 – овальної (середні розміри 21,3×14,2 нм).

Показано різницю у розмірах AgNPs при використанні різних методів дослідження (Zetasizer Nano ZS і TEM). Визначені розміри наночастинок, що синтезувались з використанням безклітинного водного екстракту *S. cerevisiae* M437 при використанні TEM були в середньому на 75 % менші за значення отримані з використанням Zetasizer Nano ZS.

Встановлено, що при внесенні у культуральну рідину *S. cerevisiae* 71В нітрату срібла у концентрації 0,5 та 1,0 мМ відбувався інтенсивніший біосинтез AgNPs, ніж при використанні нітрату срібла у вищих концентраціях – 1,5 і 2,0 мМ. Максимальне значення оптичної густини розчину наночастинок срібла у супернатанті культуральної рідини *S. cerevisiae* 71В у піку поглинання (400 нм) при використанні для біосинтезу 0,5 мМ нітрату срібла було на 95 % більшим, ніж при використанні 2 мМ нітрату срібла.

Виявлено антибактеріальну та антиадгезивну активність розчинів AgNPs, отриманих при внесенні у культуральну рідину *S. cerevisiae* 71В нітрату срібла у концентрації 1, 1,5 та 2 мМ.

Практичне значення отриманих результатів.

Встановлено стабільність розчинів наночастинок отриманих з використанням безклітинного екстракту *S. cerevisiae* M437 при зберіганні упродовж 45 діб при 4 °С. Після зберігання розчину індекс полідисперсності збільшився лише на 20 %, а дзета-потенціал зменшився на 29 %. AgNPs, які були синтезовані з використанням супернатанту культуральної рідини *S. cerevisiae* M437, показали меншу стабільність у розчині після зберігання: індекс полідисперсності збільшився на 40 %, а дзета-потенціал зріс на 11,7 %.

Отримані з культуральної рідини розчини AgNPs, які були отримані при внесенні нітрату срібла у культуральну рідину *S. cerevisiae* 71В проявили антибактеріальну та антиадгезивну активність по відношенню до референс-штамів *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 та *Escherichia coli* ATCC 25922, а також клінічних ізолятів *Staphylococcus aureus* 1536 та *Klebsiella pneumoniae* 520.

Результати наукових досліджень впроваджені у навчальний процес Національного університету харчових технологій як складові модулів навчальних дисципліни «Мікробні технології наночастинок благородних металів» для підготовки здобувачів освітньо-наукового ступеня «доктор філософії» та дисципліни «Нанобіотехнологія» для підготовки здобувачів освітнього ступеня «магістр».

Особистий внесок здобувача. Дисертація написана автором самостійно. Дисертантом проаналізовано іноземну та вітчизняну наукову літературу, що стосується біосинтезу наночастинок з використанням мікроорганізмів; зроблено теоретичні розрахунки та проведено відповідні експериментальні дослідження; узагальнено отримані експериментальні дані і проведено їх порівняльний аналіз з результатами, що були отримані та оприлюднені у наукових статтях іншими авторами.

Планування експериментальних робіт, їх аналіз, підготовка публікацій за результатами досліджень проходили за безпосередньої участі наукового керівника кандидата біологічних наук, доцента О.І. Скроцької.

Біосинтез наночастинок срібла з використанням *S. cerevisiae* M437 здійснювали спільно із здобувачкою освітнього ступеня «магістр» кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій Лазюкою Ю.В., яка є співавтором публікацій. Визначення фізичних властивостей отриманих розчинів AgNPs за допомогою UV-vis спектроскопії зроблено самостійно. Показники розчинів біогенних наночастинок срібла з використанням методу динамічного розсіювання світла (Zetasizer Nano ZS) були отримані спільно із завідувачем Проблемної науково-дослідної лабораторії НУХТ, к.т.н. Маринінім А.І., який є співавтором публікації. Визначення розміру і форми наночастинок за допомогою методу трансмісивної електронної мікроскопії (ТЕМ) здійснювали спільно з молодшим науковий співробітником лабораторії біологічних полімерних сполук Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, к.б.н. Харчуком М.С., який є співавтором публікації. Визначення концентрації іонів срібла, дослідження антибактеріальної та антиадгезивної активності розчинів AgNPs, які були отримані з використанням клітин *S. cerevisiae* 71В здійснювали спільно з доценткою кафедри біотехнології, шкіри та хутра Київського національного університету технологій та дизайну, к.б.н. Шидловською О.А. яка є співавтором публікації.

Апробація матеріалів дисертації. Основні матеріали дисертаційної

роботи було представлено на: VIII Міжнародній науково-практичній онлайн конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, Україна, 2019); VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement «Science and modern pharmaceutical manufacturing» (2019, «Farmak» JSC, Kyiv, Ukraine); Республіканській міжнародній конференції, присвяченій 80-річчю з дня народження Т.С. Морозкіної «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Мінськ, Республіка Білорусь, 2020); IV Всеукраїнській науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю «Нанотехнології і наноматеріали у фармації та медицині» (Харків, Україна, 2020); XVI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2020); Міжнародній науковій конференції «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Мінськ, Республіка Білорусь, 2020); XIV Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, Україна, 2020); X International Scientific Conference of young scientists, graduates, master and PhD students «Actual environmental problems» (Minsk, Republic of Belarus, 2020); 86-й, 87-й та 88-й Міжнародній науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (Київ, Україна, 2020; Київ, Україна, 2021; Київ, Україна, 2022); Міжнародній науково-практичній конференції «PLANTA+. Наука, практика та освіта» (Київ, Україна, 2021); III Міжнародній науково-практичній конференції «Європейські виміри сталого розвитку» (Київ, Україна, 2021); X Міжнародній науково-технічній конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (Київ, Україна, 2021); The International Conference «Biotechnologies, Present and Perspectives», 8 Edition (Suceava, Romania, 2021).

Публікації. За результатами роботи опубліковано 21 наукову працю, у тому числі 5 статей, серед яких: 1 – у науковому виданні країн Європейського Союзу (міжнародна індексація Scopus та Web of Science, Q2); 4 – у наукових

фахових виданнях України за спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія, з яких – 1 стаття у журналі бази даних Web of Science, категорії «А», 3 статті – у журналі категорії «Б»; 16 тез доповідей – опублікованих у вітчизняних та закордонних науково-практичних конференціях.

Структура роботи. Дисертація складається зі вступу, 5 розділів, висновків та списку використаних джерел (146 найменувань, серед яких 96 % іноземні публікації, більшість з яких датовано 2016-2022 рр.), 2 додатки. Основні матеріали дисертації викладено на 96 сторінках друкованого тексту (4,1 авторських аркушів), які містять 15 таблиць і 15 рисунків.

РОЗДІЛ 1.

ВИКОРИСТАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ ДЛЯ БІОГЕННОГО СИНТЕЗУ НАНОЧАСТОК

Нині зростає інтерес дослідників до наночасток різних елементів, оскільки вони виявляють властивості, які суттєво відрізняються від властивостей самої сполуки у формі суцільних фаз або макроскопічних дисперсій. Це дозволяє їх використовувати у різних галузях – медицині, сільському господарстві, харчовій промисловості, хімічній та нафтохімічній промисловості, електроніці. Наночастки використовують для створення електрохімічних сенсорів і біосенсорів, розробки ефективних сорбентів, антикорозійних покриттів, провідників, полімерних матеріалів, антимікробних засобів, дезінфікуючих розчинів та ін. (Sharma, Kanchi & Bisetty, 2019; Romero & Picchio, 2020).

Наночастки металів можна отримати фізичними і хімічними методами, проте вони мають ряд недоліків, зокрема, використання агресивних, токсичних та дороговартісних реагентів (Amini, 2019). В останні роки активно розвивається нова область нанобіотехнологій, яка включає використання біологічних об'єктів в ряді біохімічних і біофізичних процесів. Що стосується біогенного синтезу наночастинок, то велика зацікавленість до даного способу обумовлена його екологічністю та економічною ефективністю.

1.1. Наночастки та їх застосування

Наночастки визначаються як тверді дисперсійні частинки з розмірами в діапазоні від 10 до 100 нм. У літературі зустрічаються дані щодо наночасток різних металів – золота, срібла, міді, заліза, платини, паладію, цинку, титану та ін. (Thakkar, Mhatre & Parikh, 2010).

Наночастки срібла використовують у різних галузях – медицині, сільському господарстві, харчовій промисловості, хімічній та нафтохімічній промисловості, електроніці. AgNPs мають досить широке застосування: у якості

носії для адресної доставки ліків, наприклад, протипухлинних сполук; антигени та препарати генної терапії; у складі біосенсорів для виявлення білків, імуноглобулінів та нуклеїнових кислот; у складі стоматологічних матеріалів та косметичних засобів; у якості покриття медичних виробів із нержавіючої сталі. Також AgNPs застосовуються у молекулярній діагностиці, каталізі, електроніці, оптиці, очистці води та протипухлинній терапії (Jalal et al., 2018; Salvadori, Monezi, Mehnert & Correa, 2019; Shu et al., 2020). Відомо, що наночастки срібла використовують у якості протимікробних засобів так, як AgNPs показали суттєву антимікробну активність щодо грибів та вірусів, а також антибіотикорезистентних штамів бактерій. Показано, що вони індукують синтез активних форм кисню, які викликають незворотні пошкодження бактерій, а також мають сильну спорідненість до зв'язування з ДНК або РНК, що перешкоджає процесу реплікації мікроорганізмів (Dong et al., 2017; Lafta, Ajah, Dakhil & Al-Wattar, 2019). При цьому наночастки срібла мають низьку цитотоксичність щодо нормальних клітин тварин та людини (Shu et al., 2020).

Наночастки золота (AuNPs) використовують в електроніці, де їх застосовують для отримання провідників з низьким опором. Такі провідники мають ряд переваг: більша гнучкість і більш низька температура плавлення. Також показано можливість використання наночастинок золота як протиракових агентів (Clarence et al., 2020).

Також є повідомлення про можливість використання наночастинок міді (CuNPs) як антибактеріальних агентів. При одночасному використанні наночастинок міді і срібла спостерігається збільшення їх антибактеріальної активності, при цьому бактерицидний ефект залежить від розміру наночастинок (Ramanathan et al., 2013).

Наночастки заліза (FeNPs) можуть бути використані для відновлення важких металів, таких як ртуть, нікель, кадмій, свинець і хром, органічних розчинників (трихлоретену), а також для деградації органічних барвників (бромфеноловий синій, метиленовий синій), які є одними із основних забруднювачів стічних вод текстильної промисловості. Також є дані щодо

впливу наночастинок заліза на деградацію фосфор- та хлорорганічних інсектицидів (Mehrotra, Tripathi, Zafar & Singh, 2017).

Сучасна хімія широко використовує дорогі каталізатори на основі металів платинової групи. Наночастки платини (PtNPs) володіють високою каталітичною активністю, тому вони використовуються для каталізу та у технології паливних елементів. В паливних елементах платина використовується як катод і діє як кисневий редуктор. Також платина може бути використана як анод, при цьому вона окислює різні види палива (Castro-Longoria, Moreno-Velazquez & Vilchis-Nestor, 2012; Riddin, Gericke & Whiteley, 2006).

Паладій є одним із універсальних каталізаторів, але хімічний синтез наночастинок паладію (PdNPs) здійснюють при високих температурах (160-200 °C) і з використанням токсичних відновників, наприклад, боргідриду натрію. PdNPs використовують як каталізатор у реакції Судзукі-Міяури, яку застосовують в органічній хімії для отримання поліолефінів, стиролів, а також заміщених біфенілів. Також паладій є каталізатором у реакції Мізорокі-Хека, яку використовують для промислового синтезу ряду важливих сполук (гербіцид просульфурон, протизапальний препарат напроксен, протиастматичного препарату сингуляр та ін.) (Sobjerg et al., 2009).

Наночастки оксиду цинку (ZnONPs) проявляють досить сильну антимікробну активність, проте вона залежить від їх розміру і форми, що робить їх специфічними для практичного застосування. Бажаний розмір і форма ZnONPs можуть бути отримані за допомогою процесу оптимізації їх мікробного синтезу. Наночастки цинку використовують в електроніці, оптиці, біомедицині та сільському господарстві (Mohd, Mohamad, Zaidan & Rahman, 2019).

Нині досить широко застосовують наночастки діоксиду титану (TiO₂NPs). Їх використовують як добавки в сонцезахисні засоби, фарби, гуму, папір, цемент, зубну пасту, пластикову упаковку, біомедичну кераміку, біоматеріали для імплантатів. Також показана їх антимікробна активність (Ağçeli, Hammachi, Kodai, Cihangir & Aksu, 2020).

Наночастки можна використовувати при створенні електрохімічних датчиків та біосенсорів. Так, розроблені наносенсори для виявлення токсинів водоростей, мікобактерій та ртуті у питній воді. Також розроблені наносенсори для гормональної регуляції, виявлення вірусів, визначення різних речовин у ґрунті, а також для зондування розподілу ауксинів та кисню (Romero & Picchio, 2020).

1.2. Синтез наночастинок з використанням мікроорганізмів

Металеві наночастинки можуть бути синтезовані різними способами. Хімічний синтез широко поширений, проте біосинтез є більш перспективним. Особливо важливою є розробка екологічно чистих методів синтезу наночастинок срібла через їх високу антимікробну активність. Розроблено багато методів біологічного синтезу срібних наночастинок з використанням дріжджових, грибних або бактеріальних метаболітів (табл.1.1).

Таблиця 1.1. Можливі механізми біосинтезу металічних наночастинок різними біологічними агентами (Nida & Khan, 2017)

| Біологічний агент | Механізм біосинтезу |
|-------------------|---|
| Бактерії | Специфічні білки (NADH-залежна редуктаза або нітрат-залежна редуктаза) беруть участь у біоредукції іонів металів |
| Водорості | Функціональні групи, наприклад, гідроксильні приймають участь у біоредукції та стабілізації наночастинок |
| Гриби | Специфічні ферменти, що приймають участь у відновленні металів та біоміметична мінералізація |
| Дріжджі | Зв'язані з мембранами та цитозольні оксидоредуктази та хінони забезпечують відновлення та стабілізацію наночастинок |
| Рослини | У ролі відновлюючих та стабілізуючих агентів виступають алкалоїди, флавоноїди, сапоніни, стероїди, дубильні речовини тощо |

Як видно з таблиці 1.1, біосинтез наночастинок клітинами дріжджів пов'язаний з мембранними білковими структурами та ферментами. Тому до переваг синтезу за допомогою дріжджів можна віднести можливість

використання безклітинного водного екстракту, розмір отриманих наночасток, статичні умови синтезу, низьку температуру та коротку тривалість біосинтезу.

1.2.1. Можливості використання бактерій. Мікробний синтез наночасток є підходом так званої «зеленої хімії», який пов'язує нанотехнології і мікробні біотехнології. Також цей метод є екологічно чистим і альтернативним порівняно з хімічними і фізичними методами. Бактерії здатні відновлювати іони металів в металеві наночастки за участю ферментів та інших сполук, які ними продукуються. При використанні прокариотів можливий як внутрішньо-, так і позаклітинний синтез наночасток. При цьому внутрішньоклітинний синтез наночасток вимагає додаткових етапів їх виділення, зокрема руйнування клітин фізичними чи хімічними методами для вивільнення синтезованих наночасток (Płaza, Chojniak, & Vanat, 2014). У табл. 1.2. наведена узагальнена інформація щодо параметрів біосинтезу різних наночасток металів за допомогою бактерій.

Китайські вчені дослідили синтез наночасток золота з використанням *Rhodospseudomonas capsulata*. Автори спостерігали позаклітинний синтез AuNPs і припустили, що саме білки безклітинного екстракту приймають участь у біоредукції і синтезі наночасток золота. При цьому при більш низькій концентрації іонів золота формувались виключно сферичні AuNPs з розмірами від 10 до 20 нм, а при більш високій – нанопроволоки 50-60 нм із сітчастою структурою (He et al., 2008). Johnston зі співавтор. показали можливість синтезу наночасток золота бактеріями *Delftia acidovorans*, які були виділені з ґрунту. Ці мікроорганізми синтезують нерибосомний пептид делфтібактин, який відповідає за генерацію AuNPs (Johnston et al., 2013).

У літературі наявна невелика кількість повідомлень про синтез бактеріями наночасток паладію. Так, бактерії роду *Pseudomonas* sp., що були виділені із забрудненого солями важких металів ґрунту, здатні синтезувати каталітично активні PdNPs, які можуть здійснювати реакції дегалогенування та гідрування (Schlüter et al., 2014).

Таблиця 1.2. Застосування бактерій для біосинтезу наночасток

| Бактерії | Наночастки | Параметри біосинтезу | Характеристика наночасток | Джерело |
|----------------------------------|----------------------|--|--------------------------------------|----------------------------------|
| <i>R. capsulata</i> | AuNPs | Безклітинний екстракт, 0,05 М тетрахлораурату водню, 30 °С, рН 6, 48 год | Мереживні наноструктури, 50-60 нм | He et al., 2008 |
| <i>D. acidovorans</i> | | Культуральна рідина, 100 мкМ хлориду золота, 30 хв | Октаедричні пластинки* | Johnston et al., 2013 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | PdNPs | Культуральна рідина, 0,25 мМ формиату натрію, 0,25-0,5 мМ тетрахлорпаладату натрію, 28 °С, 12 год, анаеробні умови | Дисперсні, 4-20 нм | Schlüter et al., 2014 |
| <i>C. freundii</i> JH | | Культуральна рідина, 5 мМ формиату натрію, 10 мг/л тетрахлорпаладату натрію, 30 °С, 120 об/хв, 10 год, анаеробні умови | Дисперсні нанокристали, 10 нм | Wang, Bi, Chen & Hu, 2020 |
| <i>B. subtilis</i> T-1 | AgNPs | Безклітинний супернатант, 1 мМ нітрату срібла, 21-25 °С, 200 об/хв, 48 год | Сферичні, 13-19 нм | Plaza et al., 2016 |
| <i>Rhodococcus</i> sp. NCIM 2891 | | Культуральна рідина, 3 мМ нітрату срібла, 22 °С, 130 об/хв, 18 год, без доступу світла | Сферичні, середній розмір 10 нм | Pirog, Geichenko & Zvarych, 2019 |
| <i>A. calcoaceticus</i> LRVP54 | | Безклітинний супернатант, 0,7 мМ нітрату срібла, 70 °С, 24 год, статичні умови | Монодисперсні сферичні, 8-12 нм | Singh et al., 2013 |
| <i>Isoptericola</i> sp. | | Безклітинний супернатант, 0,002 М нітрату срібла, 22 °С, дія сонячного світла 4 хв | Сферичні, 11-40 нм | Dong et al., 2017 |
| <i>M. morgani</i> RP42 | CuNPs | Культуральна рідина, 5 мМ сульфату міді, 37 °С, 20 год | Квазісферичні, середній розмір 19 нм | Ramanathan et al., 2013 |
| <i>H. elongata</i> IBRC-M | TiO ₂ NPs | Безклітинний супернатант, 0,1 М метатитанової кислоти 37 °С, 120 об/хв, 96 год | Сферичні, середній розмір 105 нм | Taran, Rad & Alavi, 2018 |
| | ZnONPs | Безклітинний супернатант, 0,01 М хлориду цинку 37 °С, 120 об/хв, 96 год | Різної форми, середній розмір 18 нм | |
| <i>Streptomyces</i> sp. HC1 | TiO ₂ NPs | Культуральна рідина, 0,025 М метатитанової кислоти, 60 °С, 30 хв, рН 6,5 | Сферичні, 30-70 нм | Ağçeli et al., 2020 |

Примітка: * – дані щодо розміру не вказані.

Також із забрудненого важкими металами ґрунту були виділені бактерії *Cupriavidus necator* ATCC 43291 і *Pseudomonas putida* ATCC 12633. Sobjerg із співавтор. показали можливість їх використання для біосинтезу наночасток паладію. Автори підтвердили високу каталітичну активність біогенних PdNPs

під час реакцій дегалогенування поліхлорованих діоксинів (Sobjerg et al., 2009). Wang із колегами із стічних вод гальванічного виробництва виділили грамнегативні бактерії *Citrobacter freundii* JH і показали їх здатність до синтезу наночасток паладію. Автори пояснюють даний механізм різними молекулярними реакціями у клітині, ключову роль у яких відіграють гідрогенази та NADH-дегідрогенази (Wang, Bi, Chen & Hu, 2020).

Показано можливість внутрішньоклітинного синтезу високодисперсних наночасток срібла упродовж 24 год бактеріями *Bacillus licheniformis*, які були виділені із стічних вод (Kalimuthu, Suresh, Venkataraman, Bilal & Gurunathan, 2008). Також внутрішньоклітинний синтез AgNPs спостерігали у *Bacillus* sp., але тривалість синтезу становила 7 днів (Pugazhenthiran et al., 2009). Shahverdi зі співавтор. для біосинтезу наночасток було запропоновано використовувати супернатант бактеріальної культури. При цьому тривалість синтезу AgNPs скоротилась до 5 хв (Shahverdi, Minaeian, Shahverdi, Jamalifar & Nohi, 2007). Можливість позаклітинного синтезу наночасток срібла показали Das з колегами. Вони спостерігали синтез AgNPs розміром 42-92 нм у супернатанті *Bacillus* sp. при кімнатній температурі упродовж 24 год (Das, Thomas, Varghese, Soniya & Mathew, 2014).

Також є дослідження біогенного синтезу наночасток срібла бактеріями, які є продуцентами поверхнево-активних речовин (ПАР). Так, Plaza зі співавторами дослідили синтез наночасток срібла *Bacillus subtilis* T-1, які продукують ліпопептиди. При цьому бактерії культивували на відходах пивоварного виробництва (Plaza et al., 2016). Нині є велика кількість публікацій про синтез ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* (Пирог, Савенко & Шевчук, 2016; Pirog, Lutsai, Antonuk & Elperin, 2018). Перше повідомлення про синтез AgNPs з використанням *A. calcoaceticus* LRVP54 вийшло у 2013 р. При цьому автори показали суттєвий синергізм дії біогенних наночасток срібла і антибіотиків по відношенню до антибіотикостійких штамів бактерій (Singh et al., 2013). ПАР здатні синтезувати і бактерії роду *Rhodococcus* (Pirog et al., 2019). Otari з колегами дослідили синтез AgNPs клітинами *Rhodococcus* sp. NCIM 2891 і

припустили, що саме клітинні ферментні системи відіграють головну роль у процесі біосинтезу наночасток (Otari, Patil, Nadaf, Ghosh & Pawar, 2012).

Sintubin із співавтор. показали можливість синтезу наночасток срібла молочнокислими бактеріями – *Lactobacillus* spp., *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecium* та *Lactococcus garvieae*. Автори виявили двоетапний процес формування AgNPs. На першому етапі іони срібла накопичуються у клітинній стінці шляхом біосорбції, а потім відбувається їх подальше відновлення з утворенням металевих наночасток (Sintubin et al., 2009).

Позаклітинний синтез AgNPs ендofітними бактеріями *Isoptericola* sp. SYSU 333150 під дією сонячного світла дослідили Dong із колегами. При цьому тривалість синтезу склала 4 хв, а за відсутності сонячного світла тривалість реакції збільшилась у 45 разів. Синтезовані наночастки мали антибактеріальну активність по відношенню до *Staphylococcus warneri* ATCC 27836. Автори встановили, що механізм антистафілококової дії полягав у здатності AgNPs руйнувати ДНК бактерій, за рахунок взаємодії із сіркою та фосфором, які присутні у даній нуклеїновій кислоті (Dong et al., 2017).

Досить складним є синтез наночасток міді, оскільки мідь є нестабільною у нанометровому діапазоні розмірів і досить швидко окислюється, утворюючи оксид міді. У 2013 році було запропоновано біологічний спосіб синтезу CuNPs з використанням *Morganella morganii* RP42. Автори пояснюють, що механізм такого синтезу полягає у наступному: *M. morganii* синтезують наночастки міді внутрішньоклітинно шляхом поглинання іонів міді і подальшого їх зв'язування з металічною редуктазою або іншим подібним білком. Це призводить до відновлення іону міді до металевого Cu(0), який виводиться із клітини і накопичується у культуральному середовищі (Ramanathan et al., 2013). Інші дослідники показали здатність *Morganella* sp. до позаклітинного синтезу наночасток срібла (Parikh et al., 2008).

Taran зі співавтор. показали можливість використання бактерій *Halomonas elongata* IBRC-M для позаклітинного синтезу наночасток оксиду цинку і діоксиду титану. Слід наголосити, що автори не виявили антибактеріальної

активності в отриманих TiO_2NPs , на відміну від ZnONPs , які показали сильну антимікробну активність по відношенню до антибіотикостійких штамів *Escherichia coli* ATCC 25922 і *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Антибактеріальна активність наночастинок цинку обумовлена пошкодженням клітинної стінки, що призводить до можливості проникнення ZnONPs у клітину, де вони активують продукцію активних форм кисню (гідроксидні і супероксидні аніони, перекис водню) (Taran et al., 2018).

Нещодавно вийшла публікація про синтез наночастинок діоксиду титану *Streptomyces* sp. NC1. Досліджувані TiO_2NPs мали сферичну форму з розмірами 30-70 нм. Також автори показали їх антимікробну активність проти *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 35218, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 6275, а також здатність руйнувати біоплівку *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Ağçeli et al., 2020).

1.2.2. Використання грибів для синтезу наночастинок. На сьогодні досліджуються механізми синтезу наночастинок з використанням різних видів грибів. Загальні ж принципи зводяться до наступного. Солі металів в розчині дисоціюють на відповідні іони, які, навіть, при відносно низьких концентраціях є токсичними для грибкових клітин. Тому клітини виділяють NADH-залежний фермент, який окислюється до NAD^+ і нейтралізує іони шляхом відновлення. Потім відбувається формування наночастинок і їх стабілізація (Tripathi & Chung, 2019). У таблиці 1.3 наведена узагальнена інформація по біосинтезу наночастинок з використанням грибів.

Мицеліальні гриби здатні до внутрішньо- та позаклітинного синтезу широкого спектру металевих наночастинок. Так, Bhainsa із співавтор. здійснили позаклітинний синтез наночастинок срібла з використанням *Aspergillus fumigatus*. При цьому час експозиції становив 10 хв, а розміри наночастинок були в діапазоні 5-25 нм (Bhainsa & D'Souza, 2006). Також показано здатність *Trichoderma reesei* до позаклітинної продукції AgNPs упродовж 72 год, але наночастки були неоднорідні і мали розмір 5-50 нм (Vahabi, Mansoori & Karimi,

2011). Виявлено, що гриби *Coriolus versicolor* можуть здійснювати внутрішньо- і позаклітинний синтез наночасток срібла (Sanghi & Verma, 2009).

Таблиця 1.3. Біосинтез наночасток міцеліальними грибами

| Гриби | Наночастки | Параметри біосинтезу | Характеристика наночасток | Джерело |
|----------------------------|------------|--|--|--|
| <i>C. cladosporioides</i> | AgNPs | Вологий міцелій, 1 мМ нітрату срібла, 28 °С, 200 об/хв, 72 год | Різна форма, 5-50 нм | Lafta et al., 2019 |
| <i>F. scirpi</i> | | Безклітинний супернатант, 1 мМ нітрату 28 °С, 180 об/хв, 168 год, без доступу світла | Квазісферичні, 2-20 нм | Rodriguez-Serrano et al., 2020 |
| <i>F. solani</i> ATLOY-8 | AuNPs | Безклітинний екстракт, рН 8,5; 1 мМ тетрахлораурату водню, 48 год, без доступу світла | Голкоподібні структури скупчені у конгломерати, 40-45 нм | Clarance et al., 2020 |
| <i>Verticillium</i> sp. | | Промитий міцелій, 0,1 мМ тетрахлораурату водню, 28 °С, 200 об/хв, 72 год | Розмір – близько 20 нм* | Mukherje et al., 2001 |
| <i>N. crassa</i> | PtNPs | Промитий міцелій, 1 мМ гексахлорплатинової кислоти, 28 °С, 200 об/хв, 24 год, без доступу світла | Сферичні, локалізовані у цитоплазмі, 20-110 нм | Castro-Longoria et al., 2012 |
| | | Грибний екстракт (умови наведені вище) | Сферичні, 17-76 нм. | |
| <i>F. oxysporum</i> | | Промитий міцелій, 12 мМ гексахлорплатинової кислоти, 65 °С, рН 5, 72 год, без доступу світла | Поліморфні, 10-100 нм | Riddin et al., 2006 |
| <i>P. aurantio-griseum</i> | CuNPs | Безклітинний супернатант, 3 мМ сульфату міді, рН 6 28 °С, 120 об/хв, 24 год | Сферичні, 184 нм | Honary, Barabadi, Gharaeifath abad & Naghibi, 2012 |
| <i>P. citrinum</i> | | | Сферичні, 160 нм | |
| <i>P. waksmanii</i> | | | Сферичні, 91 нм | |
| <i>A. niger</i> | ZnONPs | Безклітинний супернатант, 5 мМ нітрату цинку, 37 °С, 200 об/хв, 48 год | Сферичні, 53-69 нм | Kalpana et al., 2018 |
| | | Безклітинний супернатант, 1 мМ ацетату цинку, постійне перемішування, 24 год | Паличкоподібні, скупчені у конгломерати, 80-130 нм | Gao et al., 2019 |

Примітка: * – дані щодо форми наночасток не вказані.

Lafta з колегами здійснили синтез AgNPs з використанням міцелію *Cladosporium cladosporioides*. Науковці виявили антимікробну дію біогенних

наночасток срібла по відношенню до грибів *Trichophyton rubrum* та *Trichophyton mentagrophytes*, які спричинюють оніхомікоз (Lafta et al., 2019). У 2013 р. з'явилося перше повідомлення про можливість використання термофільних грибів *Humicola* sp. для біосинтезу сферичних позаклітинних наночасток срібла (Syed, Saraswati, Kundu & Ahmad, 2013).

Нещодавно вийшла публікація про можливість використання *Fusarium scirpi* для позаклітинного біосинтезу AgNPs. Отримані наночастки були квазісферичними з розмірами 2-20 нм. Автори встановили їх антибактеріальну активність по відношенню до уропатогенних біоплівки *E. coli* (Rodriguez-Serrano et al., 2020).

Показано здатність термофільних грибів (*Rhizomucor pusillus* ATCC 42782, *Sporotrichum thermophile* ATCC 36347, *Thermoascus thermophilus* ATCC 26413, *Thermomyces lanuginosus* ATCC 46882) до синтезу наночасток золота. Авторами виявлено два етапи синтезу AuNPs даними грибами: перший – відновлення Au (III) до Au (0), другий – подальша стабілізація наночасток за допомогою стабілізуючих білків. При цьому автори не виявили специфічних стабілізуючих білків (Molnar et al., 2018).

Є дані про позаклітинний синтез ендоефітним штамом *Fusarium solani* ATLOY-8 наночасток золота розміром 40-45 нм. Такі AuNPs показали протипухлинну активність щодо перещеплюваних клітин HeLa (рак шийки матки) та MCF-7 (рак молочної залози) (Clarance et al., 2020). Mukherjee зі співавтор. спостерігали синтез наночасток золота з використанням *Verticillium* sp., при цьому AuNPs були локалізовані на поверхні міцелію (Mukherjee et al., 2001).

Castro-Longoria з колегами виявили здатність аскоміцетних грибів *Neurospora crassa* до синтезу наночасток платини. При внутрішньоклітинному синтезі спостерігали формування окремих PtNPs з розмірами 4-35 нм і сферичних наноагрегатів діаметром 20-110 нм; при позаклітинному результати були аналогічні, але розміри наночасток були у діапазоні 17-76 нм (Castro-Longoria et al., 2012). Позаклітинний синтез наночасток платини виявили також

і у *Fusarium oxysporum*. При цьому автори встановили, що зміна температури впливає на швидкість синтезу наночастинок, а незначна зміна рН може призводити до інгібування утворення PtNPs (Riddin et al., 2006).

Позаклітинний синтез наночастинок міді ізольованими із ґрунту грибами *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium citrinum* і *Penicillium waksmanii* дослідили іранські дослідники. Синтез CuNPs здійснювали при температурі 28 °C у діапазоні рН 5-9, використовуючи три концентрації сульфату міді: 1, 3 та 5 мМ). Всі вказані параметри впливали на розмір синтезованих наночастинок, але прямої кореляції до їх збільшення чи зменшення виявлено не було. Три вказані види пеніцилових грибів синтезували наночастки міді з розмірами від 80 до 295 нм залежно від досліджуваного параметру і виду *Penicillium* (Honary et al., 2012).

Виявлено здатність *Aspergillus niger* до позаклітинного синтезу наночастинок оксиду цинку, які показали антибактеріальну активність по відношенню до *S. aureus* і *E. coli*. Також автори показали можливість використання біогенних ZnONPs для очистки стічних вод (Kalpana et al., 2018). У іншому повідомленні виявлено антиоксидантну, антимікробну (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*) і протиракову (HepG2, гепатокарцинома людини) активність ZnONPs, що були синтезовані з використанням *A. niger* (Gao et al., 2019).

1.2.3. Дріжджі як джерело отримання наночастинок. Крім таких мікроорганізмів, як бактерії і гриби, для біосинтезу наночастинок використовують і дріжджі (табл. 1.4). Вони містять мембранозв'язані оксидоредуктази і хінони, що відіграють ключову роль в синтезі наночастинок металів. При збільшенні рН всередині дріжджової клітини відбувається активація редуктаз, які відновлюють іони металів при одночасному синтезі наночастинок. Хінони дріжджової клітини характеризуються нуклеофільними та окисно-відновними властивостями і також приймають участь у відновленні іонів металів і перетворенні їх у наночастки (Skalickova, Baron & Sochor, 2017).

Нещодавно було показано можливість використання дріжджового екстракту для біосинтезу наночастинок срібла. Автори не наводять дані щодо роду

та виду використаних у дослідженнях дріжджів. Синтезовані AgNPs показали антимікробну дію по відношенню до ампіцилін-стійких клітин *E. coli*. Науковці пояснюють антибактеріальний ефект взаємодією наночастинок срібла з пептидогліканом клітинної стінки *E. coli*, що призводить до зміни конфігурації пептидоглікану, збільшення проникності клітинної стінки і апоптозу клітини. При цьому синтезовані AgNPs показали низьку цитотоксичність на перещеплюваній культурі клітин Cos-7, що робить можливим їх подальше використання у медицині (Shu et al., 2020).

Таблиця 1.4. Використання дріжджів для біосинтезу наночастинок

| Дріжджі | Наночастки | Параметри біосинтезу | Характеристика наночастинок | Джерело |
|--------------------------------|--------------------------------------|---|------------------------------------|---|
| <i>S. cerevisiae</i> PTCC 5269 | SiO ₂ NPs | Культуральна рідина, 0,1 М силікату натрію, 29 °С, 96 год | Більшість сферичні, 40-70 нм | Zamani, Jafari, Mousavi & Darezere-shki, 2020 |
| Дріжджі* | FeNPs | Безклітинний екстракт, 1 мМ хлориду заліза, інтенсивне перемішування | Полікристалічні кільця, 2-10 нм | Mehrotra et al, 2017 |
| <i>S. cerevisiae</i> | SeNPs | Культуральна рідина, 5 мкг селеніту натрію, 96 год | Сферичні, 75 нм | Faramarzi, Anzabi & Jafarizadeh-Malmiri, 2020 |
| <i>M. ingens</i> LH-F1 | | Безклітинний екстракт, 2 мМ оксиду селену, постійне перемішування, 30 °С | Сферичні і квазісферичні, 70-90 нм | Lian et al., 2019 |
| Дріжджі* | CoFe ₂ O ₄ NPs | Культуральна рідина, 0,2 М нітрату заліза (III), 0,15-0,25 М нітрату кобальту (II), постійне перемішування, 50 °С, рН 6, 12 год | Кубічні, 44 нм | Vignesh, Vishnu, Balakumar, Raguram & Rajni, 2019 |
| Дріжджі* | AgNPs | Безклітинний екстракт, нітрат срібла, рН 10, інтенсивне перемішування | Сферичні, 10-19 нм | Shu et al., 2020 |
| <i>P. fermentans</i> JA2 | AgNPs | Безклітинний супернатант, 1 мМ нітрату срібла, 28 °С, 200 об/хв, 96 год | Прямокутна форма, гладенькі | Chauhan, Reddy & Abraham, 2015 |
| | ZnONPs | Безклітинний супернатант, 0,1 г оксиду цинку, 37 °С, 200 об/хв, 24-48 год | | |

Примітка: * – рід і вид дріжджів не вказаний.

Mehrotra зі співавтор. отримали наночастки заліза, використовуючи для біосинтезу комерційний дріжджовий екстракт. Можливий механізм синтезу FeNPs автори пояснюють наявністю у екстракті ферментів та сірковмісних білків, які діють як відновники і перетворюють Fe^{3+} у Fe^0 . Після цього Fe^0 формує сферичні наночастки, які покривають сірковмісні білки, забезпечуючи таким чином їх стабільність (Mehrotra et al., 2017).

Вперше можливість використання біогенних наночасток діоксиду кремнію (SiO_2NPs) при видобутку нафти показали Zamani зі співавтор. Їм вдалось синтезувати SiO_2NPs з розмірами 6-25 нм, використовуючи дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5269. Авторами показано, що на відміну від хімічно синтезованих наночасток діоксиду кремнію, біогенні SiO_2NPs здатні сильно знижувати міжфазовий натяг. При цьому ефективність видобутку нафти збільшується на 5-7 % (Zamani et al., 2020).

Внутрішньоклітинний синтез наночасток селену (SeNPs) дріжджами *S. cerevisiae* виявили Faramarzi з колегами. Вони встановили, що найбільш стабільні і з мінімальними розмірами SeNPs (75 нм) формувались при додаванні у середовище культивування дріжджів мінімальної кількості (5 мкг) селеніту натрію. При збільшенні його кількості у 5 разів спостерігали синтез наночасток, розмір яких був у 9 разів більшим, а їх антиоксидантна активність зменшувалась на 43 % (Faramarzi et al., 2020).

Китайські вчені дослідили позаклітинний синтез SeNPs з використанням дріжджів *Magnusiomyces ingens* LH-F1. Для синтезу наночасток використовували безклітинний дріжджовий екстракт. Автори припускають, що у синтезі наночасток селену можуть приймати участь гідроксильні, карбоксильні та амінні групи білків, що містяться у безклітинних дріжджових екстрактах. На поверхні SeNPs були виявлені два білка з молекулярною масою близько 16 і 21 кДа, які можливо відіграють роль природніх стабілізаторів, в той час як незв'язані білки можуть діяти як відновники (Lian et al., 2019).

Можливість синтезу наночасток фериту кобальта ($\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{NPs}$) з використанням дріжджів показали індійські вчені. На жаль, у дослідженні автори

не вказали рід та вид дріжджів. Синтез $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{NPs}$ здійснювали з використанням нітрату заліза (III) та нітрату кобальту. Наночастки мали кубічну форму з розмірами кристалів 44 нм та проявляли феромагнітні властивості (Vignesh et al., 2019).

Chauhan зі співавтор. виявили здатність *Pichia fermentans* JA2 до позаклітинного синтезу наночастинок срібла і оксиду цинку. При цьому біосинтез AgNPs здійснювали за температури 28 °C, а ZnONPs – 37 °C. Біогенні наночастки срібла володіли антибактеріальною активністю щодо бактерій *E. coli*, *Salmonella* sp., *P. aeruginosa* та грибів *Fusarium* sp., *Scedosporium* sp. JAS1, *Aspergillus terreus* JAS1, в той час як наночастки оксиду срібла проявили антибактеріальну активність лише щодо *P. aeruginosa* та протигрибкову активність щодо *Fusarium* sp., *Ganoderma* sp. JAS4, *A. terreus* JAS1 (Chauhan et al., 2015).

Висновки до розділу 1

У даному розділі розглянуті різні варіанти використання бактерій, грибів та дріжджів для біосинтезу різних наночастинок. Їх отримання за допомогою мікроорганізмів є екологічно чистим та економічно вигідним, оскільки відповідає необхідності у використанні токсичних та дорогих матеріалів. Слід наголосити, що біогенний спосіб дозволяє отримувати наночастки з різною формою та розмірами, що досягається різними умовами, такими як зміна температури, рН, часу культивування, концентрації солей металів або інших елементів та ін. Також, на відміну від наночастинок, отриманих хімічним чи фізичним методом, біогенні наночастки містять на поверхні біомолекули, що робить їх біосумісними і дозволяє використовувати у медицині та суміжних галузях.

Наукові результати даного розділу дисертації висвітлені у статті (Харченко & Скроцька, 2020).

РОЗДІЛ 2.

НАНОЧАСТКИ СРІБЛА: БІОСИНТЕЗ З ВИКОРИСТАННЯМ ДРІЖДЖІВ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ

У наш час нанотехнології знайшли своє застосування у різних галузях промисловості таких як харчова, хімічна, косметична, енергетична, фармацевтична, медична тощо. Існує безліч методів синтезу наночастинок, які можна поділити на фізико-хімічні та біологічні. Хімічний синтез є широко поширеним, проте біосинтез є більш перспективним через ряд переваг. Так, хімічний метод передбачає здійснення реакцій синтезу під вакуумом або в атмосфері інертного газу, що робить виробництво наночастинок досить вартісним. Синтезовані хімічним способом наночастки схильні до агрегації, а отримані біологічними методами є стабільними впродовж декількох місяців. Також слід зазначити, що при біологічному синтезі наночастинок використовують природні реагенти, що робить виробництво безпечним для навколишнього середовища і людини.

У 2020 р. ми опублікували огляд (Харченко & Скроцька, 2020), у якому узагальнили дані літератури щодо можливостей використання бактерій, грибів та дріжджів для біосинтезу різних наночастинок (золота, срібла, міді, заліза, платини, паладію, оксиду цинку, діоксиду титану), їх властивостей та перспектив можливого застосування. Також ми показали різні підходи авторів до параметрів біогенного синтезу наночастинок з використанням мікроорганізмів та різні способи використання біологічної системи для синтезу наночастинок.

Вибір об'єкту для біосинтезу наночастинок має свої переваги та недоліки. Недоліком використання рослин є великі площі для їх вирощування, тривалість росту, витрати на збір рослин та екстракцію біомолекул, що приймають участь у синтезі наночастинок (Castillo-Henriquez et al., 2020). При використанні міцеліальних грибів недоліком є тривалий час їх культивування (Bahrulolum et al., 2021). Використання бактерій у порівнянні з рослинами та грибами має ряд переваг, проте слід зазначити, що бактерії – це прокаріоти, тому продукти їх

метаболізму матимуть меншу біосумісність так як у них, в порівнянні з еукаріотичними моделями, відсутні системи кепування і поліаденілювання, що захищають біомолекули і наночастки від деградації і утворення токсичних сполук в організмі (Liu et al., 2021). Серед переваг використання дріжджів у порівнянні з бактеріями є те, що дріжджі на відміну від більшості бактерій більш прості й безпечні у роботі, так як не потребують специфічних заходів біобезпеки (Grasso, Zane & Dragone, 2020). Розглядаючи наночастки срібла у розрізі практичного застосування у медицині, великий практичний інтерес у якості продуцента викликають дріжджі. Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* є одним з найбільш досліджених і широко використовуваних у промисловості мікроорганізмів, адже культура сахароміцетів досить швидко росте і не вибаглива до поживних середовищ та не потребує особливих умов проведення процесу біосинтезу.

2.1. Можливості використання дріжджів для біосинтезу наночасток срібла

Дослідження процесу біосинтезу наночасток срібла з використанням дріжджів розпочались близько 20 років тому і до сьогодні не втрачають своєї актуальності. У 2003 році Kowshik з колегами вдалось отримати AgNPs досить малих розмірів (2-5 нм) за допомогою толерантних до срібла дріжджів (Kowshik et al., 2003). Отримання наночасток срібла, як і наночасток золота, з використанням дріжджів може відбуватись за рахунок біоредукції іонів срібла з використанням супернатанту дріжджів (Fernandez et al., 2016; Badhusha & Mohideen, 2016; Jalal et al., 2018), безклітинного водного екстракту (Salvadori et al., 2019; Soliman, Elsayed & Dyaа, 2018; Sowbarnika, Anhuradha & Preetha 2018; Shu et al., 2020), а також клітинної біомаси (Korbekandi, Mohseni, Mardani Jouneghani, Pourhossein & Iravani, 2016). Біосинтез AgNPs може відбуватись при різних температурних режимах та тривалості (табл. 2.1). При цьому в залежності від продуцента та походження матеріалу для синтезу (безклітинний екстракт, біомаса або супернатант) можна отримати наночастки різних розмірів. Проте, у

всіх випадках є незмінним джерело срібла, а саме його нітрат. Це пов'язано з тим, що хімічна форма Ag визначає швидкість вивільнення йонів срібла, і зрештою – формування наночастинок. Сіль нітрату срібла має найбільший потенціал вивільнення йонів Ag^+ у водному розчині, та не вимагає особливих умов (контролю температури або pH) (Nowack, Krug & Height, 2011).

Таблиця 2.1. Отримання біогенних наночасток срібла

| Дріжджі, які були використані для біосинтезу | Умови біосинтезу | Розміри AgNPs, нм | Джерело |
|--|--|-------------------|---|
| Біомаса дріжджів | | | |
| <i>Candida albicans</i> | 1,5 мМ $AgNO_3$, 37 °С, 48 год, 50 об/хв | 20-80 | Rahimi, Alizadeh & Khodavandi, 2016 |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> DSM 3286 | 2,5 мМ $AgNO_3$, 30 °С, 48 год, pH 6, 250 об/хв | 16 | Bolbanabad, Ashengroph & Darvishi, 2020 |
| Безклітинний водний екстракт | | | |
| <i>Rhodotorula</i> sp. ATL72 | 1 мМ $AgNO_3$, 24 год | 9-21 | Soliman et al., 2018 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | 100 мг/л $AgNO_3$, 30 °С, 60 год, 150 об/хв | 11 | Salvadori et al., 2019 |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> | 1 мМ $AgNO_3$, 25 °С, 168 год | 15,5 | Cunha et al., 2018 |
| Супернатант культуральної рідини | | | |
| <i>Candida glabrata</i> | 1 мМ $AgNO_3$, 25 °С, 24 год | 2-15 | Jalal et al., 2018 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 1 мМ $AgNO_3$, 30 °С, pH 6, 24 год | 10-40 | Badhusa & Mohideen, 2016 |
| <i>Cryptococcus laurentii</i> BNM 0525 | 1 мМ $AgNO_3$, 28 °С, 48 год, 100 об/хв (відновлення йонів Ag у реакції з нітратредуктазою) | 35-400 | Fernandez et al., 2016 |
| <i>Metschnikowia</i> sp. HX-YS | 10 мМ $AgNO_3$, pH 6, 26 °С, 96 год | 50-100 | Liu et al., 2021 |
| Культуральна рідина | | | |
| <i>Meyerozyma guilliermondii</i> KX008616 | 5 мМ $AgNO_3$, 30 °С, 24 год, pH 7 | 2,5-30 | Alamri et al., 2018 |
| <i>Candida lusitanae</i> | 3,5 мМ $AgNO_3$, 30 °С, 168 год, 150 об/хв | 3-83 | Eugenio et al., 2016 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PTCC 5052 | 2 мМ $AgNO_3$, 25 °С, 24 год, 150 об/хв | 5-20 | Niknejad, Nabili, Daie Ghazvini & Moazeni, 2015 |

2.2. Антимікробна дія наночастинок срібла

З літературних джерел відомо, що наночастки срібла використовують у якості антибактеріальних та антифунгальних засобів. Наночастки демонструють значну антимікробну активність щодо збудників таких захворювань, як пневмонія, шигельоз, дерматити, нозокоміальні інфекції, аспарагільоз, кандидоз та інші (табл. 2.2).

Shu зі співробітниками продемонстрували безпечність біогенних наночастинок срібла щодо лінії клітин африканської зеленої мавпи Cos-7 та антибактеріальну активність щодо антибіотикорезистентного штаму *Escherichia coli*. Так, інгібуюча концентрація AgNPs щодо патогенних бактерій є у 10 разів меншою, порівнюючи із показником цитотоксичності щодо нормальних клітин тварин (Shu et al., 2020). Показано, що клітини слинної залози людини A-253 та гліоми людини KNS-42 є стійкішими до AgNPs, ніж патогенні мікроорганізми. Так, мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) наночастинок срібла для *Escherichia coli* BL-II-11 (MDR) становила 2 мкг/мл, а для *Cryptococcus neoformans* – 0,2 мкг/мл, у той час, як IC₅₀ для лінії клітин A-253 становить 150 мкг/мл, а для лінії клітин KNS-42 – 70 мкг/мл (Salvadori et al., 2019).

Інша група вчених порівняла токсичність хімічно синтезованих наночастинок та отриманих за допомогою *Rhodotorula glutinis* BNM 0525 та *Cryptococcus laurentii* BNM 0524 на насінні салату. Дослідження показали, що AgNPs, отримані хімічним способом виявились більш токсичними, ніж наночастки, що були отримані з використанням мікроорганізмів (Fernandez et al., 2016). Також у дослідженні, проведеному з кератиноцитами і фібробластами було показало, що срібні наночастки виявили меншу цитотоксичність ніж іони Ag⁺ (Galandakova et al., 2016). Так само антибактеріальна дія AgNPs перевищувала дію AgNO₃ у 2 рази (Kumar, Karthik, Kumar & Roa, 2011).

Таблиця 2.2. Антимікробна дія наночасток срібла, синтезованих за допомогою дріжджів

| Дріжджі | Тест-культура | Зона затримки росту (мм) | Мінімальна інгібуюча концентрація (МКГ/МЛ) | Джерело |
|--------------------------------------|---|--------------------------|--|-------------------------|
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | <i>Escherichia coli</i> BL-II-11 (MDR) | 11 | 2 | Salvadori et al., 2019 |
| | <i>Cryptococcus neoformans</i> | 16 | 0,2 | |
| <i>Rhodotorula</i> sp. ATL72 | <i>Bacillus</i> sp. | н.н. | 0,25 | Soliman et al., 2018 |
| | <i>Escherichia coli</i> | | 1 | |
| | <i>Candida</i> sp. | | 1 | |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> | <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 | н.н. | 0,35 | Cunha et al., 2018 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 | н.н. | 0,5 | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>Esherichia coli</i> | 2,1 | 40 | Sowbarnika et al., 2018 |
| | <i>Shigella flexneri</i> | 1,5 | 220 | |
| | <i>Cryptococcus gastricus</i> | 1,8 | 120 | |
| | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0,8 | 180 | |
| | <i>Fusarium oxysporum</i> | 1 | 140 | |
| <i>Candida glabrata</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | н.н. | 31 | Jalal et al., 2018 |
| | <i>Escherichia coli</i> | | 31 | |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | 62 | |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | 62 | |
| | <i>Salmonella typhimurium</i> | | 125 | |
| | <i>Shigella flexneri</i> | | 62 | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>Escherichia coli</i> | н.н. | 20 | Shu et al., 2020 |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> NCIM 3590 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33591 | 8 | н.н. | Bolbanabad et al., 2020 |
| | <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 | 10 | | |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212 | 7 | | |
| | <i>Proteus vulgaris</i> ATCC49132 | 6 | | |
| | <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615 | 5 | | |
| <i>Metschnikowia</i> sp. HX-YS | <i>Escherichia coli</i> ATCC8099 | 14 | н.н. | Liu et al., 2021 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 21 | | |
| | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6051 | 16 | | |
| | <i>Monilia albicans</i> ATCC10231 | 17 | | |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538 | 15 | | |

Примітка: н.н. – у використаному джерелі інформація не наведена

Встановлено, що антибіотикорезистентні штами патогенних бактерій *Staphylococcus aureus* та *Klebsiella pneumoniae*, які є стійкими до таких препаратів,

як ампіцилін, цефодоксим, хлорамфенікол, ципрофлоксацин, котримоксазол, гентаміцин, імпіпенем, налідиксинова кислота та рифампіцин, є сприятливими до дії біогенних наночасток срібла. Мінімальна інгібуюча концентрація AgNPs становить 20 мкг/мл і 40 мкг/мл відповідно (Kumar et al., 2011). Резистентний до флуконазолу штам *Candida albicans* є чутливим до дії AgNPs у концентрації 2-4 мкг/мл (Niknejad et al., 2015).

2.2.1. Актуальність впровадження препаратів на основі наночасток срібла проти коронавірусної інфекції. Наночастки металів традиційно синтезують, використовуючи фізичні та хімічні методами. Однак ці методи характеризуються використанням небезпечних та агресивних речовин, включаючи боргідрид натрію (NaBH_4), реактив Толленса, N,N-диметилформамід (DMF) і поліетиленгліколь, які шкодять довкіллю, а також спричиняють серйозні проблеми зі здоров'ям. Слід наголосити, що отримання наночасток за допомогою мікроорганізмів є екологічно безпечним, оскільки при даному способі синтезу немає необхідності у використанні токсичних матеріалів (Iqtedar, 2019).

Є багато літературних джерел, в яких описано синтез наночасток з використанням біологічних агентів, таких як рослинні екстракти, гриби, водорості, ціанобактерії, бактерії, дріжджі та актиноміцети (Mittal, Chisti & Banerjee, 2013). Біосинтез наночасток здійснюється мікроорганізмами, які захоплюють іони-мішені з розчинів і потім накопичують відновлений метал в його елементарній формі через ферментативну активність (як біоредуктор), що утворюється в результаті метаболічної діяльності мікробних клітин.

Наночастки металів широко використовуються у противірусній терапії упродовж останніх кількох десятиліть. Наприклад, наночастки срібла, золота, титану, силіцію та купруму застосовують при різних вірусних інфекціях, включаючи вірус гепатиту В (HBV), H3N2 та H1N1, ВІЛ-1, вірус простого герпесу, везикулярний стоматит, ящур та вірус денге.

Інфекційні хвороби призводять до 20 % смертей, а віруси відповідають приблизно за одну третину з них. Так SARS-CoV-2, вірус коронавірусної хвороби (COVID-19), передається безпосередньо від однієї людини до іншої. Спалах COVID-19 розпочався наприкінці 2019 року, а станом на липень 2020 року вірусом SARS-CoV-2 інфіковано 16430566 осіб у 215 країнах світу. Кількість інфікованих випадків і смертей зростає з кожним днем практично у всіх країнах світу. Найкращим підходом до запобігання вірусних інфекцій є вакцинація. Однак розробка вакцин займає багато часу, є дороговартісною і вимагає використання складного обладнання. Препарати наночасток металів є альтернативою, що заслуговує на увагу при розробці протоколу лікування COVID-19 (Gurunathan et al., 2020). Так було встановлено мінімальну інгібуючу концентрації (МІК) наночастинок срібла (AgNPs) в різних відділах дихальної системи при ураженні COVID-19. Встановлено, що оптимальним розміром наночасток є 3-7 нм. Зокрема, використовуючи колоїдне срібло з розміром 5 нм та забезпечуючи вдихання стандартних аерозольних крапель діаметром 5 мкм, МІК наночасток срібла можна досягти за використання 2 см³ концентрацією 100 мкг/мл у випадку введення у верхні дихальні шляхи та 6 см³ концентрацією 200 мкг/мл у випадку введення у нижні дихальні шляхи (Zachar, 2020).

Нині на ринку України представлені наступні препарати з наночастками срібла (табл. 2.3.).

Таблиця 2.3. Препарати, що містять наночастки срібла, представлені на ринку України

| Назва | Діюча речовина | Дозування | Ціна | Виробник (країна) |
|------------------|--------------------------------------|------------|-----------------------|---------------------------|
| Сінумікс Аква | Наночастки срібла (колоїдне срібло) | 45-55 мг/л | 35 грн/флакон (10 мл) | Фітопродукт (Україна) |
| Дефлю Сильвер | Наночастки срібла (колоїдне срібло) | 45-55 мг/л | 90 грн/флакон (10 мл) | Delta Medical (Швейцарія) |
| Нокспрей Сільвер | Наночастки срібла (срібла протеїнат) | 1,25 мг/мл | 70 грн/флакон (10 мл) | Sperco (Іспанія) |

Противірусні механізми наночасток металів спрямовані на прикріплення, проникнення та розмноження вірусів. Можливі механізми включають інактивацію вірусу прямо чи опосередковано, запобігання приєднанню вірусів до чутливих клітин та блокування етапів реплікації вірусів.

Найчастіше наночастинки блокують вищевказані етапи, змінюючи структуру капсидного білка і зменшуючи вірулентність. З іншого боку, непрямий противірусний механізм дії наночасток включає блокування проникнення вірусу в клітину через зміну мембранного потенціалу. Інгібування також може відбуватися, коли наночастинки виступають блокаторами ферменту нейрамінідази, який розщеплює зв'язок між гемаглютиніном вірусу та рецептором сіалової кислоти чутливих клітин (Gurunathan et al., 2020).

Останні роки на фармацевтичному та косметичному ринках світу зростає попит на наночастки срібла. У зв'язку з цим, упродовж останнього десятиліття проводиться науковий пошук перспективних штамів дріжджів-продуцентів, яких можна використати для отримання стабільних розчинів наночасток срібла (табл. 2.4).

Якщо звернути увагу на характеристики наночасток, то найбільший терапевтичний інтерес можуть представляти наночастки розміром 2-15 нм (Jeremiah, Miyakawa, Morita, Yamaoka & Ryo, 2020). Наночастки даного діапазону продукують одразу декілька варіантів дріжджів: *Rhodotorula mucilaginosa* (11 нм), *Rhodotorula* sp. ATL72 (9-21 нм) та *Saccharomyces cerevisiae* (10-40 нм). Для промислового виробництва варто брати до уваги показники, що мають економічний ефект: час синтезу, необхідність підтримки специфічних температурних та механічних умов. Так, продуцент *Rhodotorula mucilaginosa* має найдовшу тривалість процесу – 60 годин при постійному перемішуванні.

Rhodotorula sp. ATL72 має практично однакові з *Saccharomyces cerevisiae* умови проведення процесу: 24 години, без перемішування, а температурний режим ближчий до стандартної кімнатної температури (27,5 °C). Проте, процес отримання наночасток за допомогою *Rhodotorula* sp. ATL72 проводять з використанням безклітинного екстракту, що в порівнянні з *Saccharomyces*

cerevisiae, де використовують для синтезу наночастинок супернатант, економічно менш рентабельно. Найзручнішим і найбільш дешевим способом промислового синтезу вважається спосіб з використанням супернатанту, так як виключаються додаткові стадії дезінтеграції клітин та відмивання наночастинок від залишків клітин. Але, слід наголосити, що при використанні супернатанту клітин для біосинтезу наночастинок можуть формуватись конгломерати наночастинок у процесі їх зберігання, що призводить до втрати їх стабільності та зменшення антимікробної активності.

Таблиця 2.4. Біологічна дія наночастинок срібла,
отриманих з використанням дріжджів

| Продуцент | Характеристика наночастинок | Біологічна дія | Джерело |
|--|---|---|---------------------------|
| <i>Candida</i> sp. VITDKGB | Сферичні наночастки, середній розмір – 87 нм | Антибактеріальна активність | Dinesh et al., 2011 |
| <i>Cryptococcus laurentii</i> BNM 0525 | Полідисперсні наночастки, розмір 35-400 нм | Антифунгальна дія | Fernandez et al., 2016 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | Здебільшого сферичні наночастки, розмір – 11 нм | Антибактеріальна, антифунгальна та протиракова активність | Salvadori et al., 2019 |
| <i>Rhodotorula</i> sp. ATL72 | Сферичні наночастки, розмір 9-21 нм | Антибактеріальна та антифунгальна дія | Soliman et al., 2018 |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> | Полідисперсні наночастинки, розміром 50-175 нм | Антифунгальна та каталітична активність | Cunha et al., 2018 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Сферичні наночастки, розмір 10-40 нм. | Антибактеріальна активність | Badhusha & Mohideen, 2016 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BU-MBT-CY1 | Сферичні наночастки, розмір 10-30 нм. | Антибактеріальна активність | Selvakumar et al., 2011 |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> NCYC 789 | Наночастки розміром від 0,5 до 1 нм. | Антибактеріальна активність | Apte et al., 2013 |

Отже, серед вказаних у таблиці 2.4 продуцентів, найбільший практичний інтерес викликають дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, що є одним з найбільш досліджених і широко використовуваних у промисловості мікроорганізмів.

2.2.2. Гіпотетична модель промислового виробництва біогенних наночасток срібла для їх використання проти SARS-CoV-2. Гіпотетичний процес промислового синтезу може виглядати так. Врахуємо, що за період епідемії COVID-19 в Україні, починаючи з березня 2020 року по березень 2021 року, зареєстровано 1,82 млн випадків інфікування SARS-CoV-2. Разом з тим, станом на кінець березня 2021 року зареєстровано 350000 активних хворих на коронавірусну інфекцію. Враховуючи наявні на ринку України противірусні препарати, а також складність включення препарату до протоколів лікування коронавірусної хвороби, пропонується забезпечити цим противірусним засобом 1 % хворих. Встановлено, що наночастки срібла ефективно інгібують SARS-CoV-2 у концентрації 100 мкг/мл при введенні у верхні дихальні шляхи у вигляді спрею (Jeremiah et al., 2020). Курс лікування становить 7 днів, 2 мл на добу, тобто 1400 мкг наночасток срібла. Отже, шляхом нескладних математичних розрахунків бачимо, що для забезпечення лікування 1 % хворих необхідно отримати близько 4,9 г наночасток срібла.

Для подальшого моделювання необхідно врахувати наступні дані:

1. Для біогенного синтезу використовують супернатант *Saccharomyces cerevisiae* (Badhusha & Mohideen, 2016). З 1 літра культуральної рідини отримують 950 мл супернатанту.

2. Для біогенного синтезу наночасток срібла використовують розчин нітрату срібла (AgNO_3), який додають у супернатант до кінцевої концентрації 1 мМ. Таке значення концентрації еквівалентне 0,108 г срібла. Отже, для отримання 4,9 г наночасток срібла необхідно використати 4,54 мМ AgNO_3 .

3. Враховуючи, що біоредукція срібла становить максимум 30 % (Eswari, Dhagat & Mishra, 2018), з 0,108 г нітрату срібла відновиться 0,0324 г срібла.

Отже, знаючи масу срібла що можна отримати з 1 л супернатанту з розчином нітрату срібла, визначаємо кількість супернатанту, необхідного для отримання 4,9 г наночасток. Кількісно це буде становити 151,23 л супернатанту.

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (20 %), необхідно отримати таку кількість супернатанту – 181,5 л. Для отримання такої кількості супернатанту необхідно мати 190,5 л культуральної рідини (рис. 2.1).

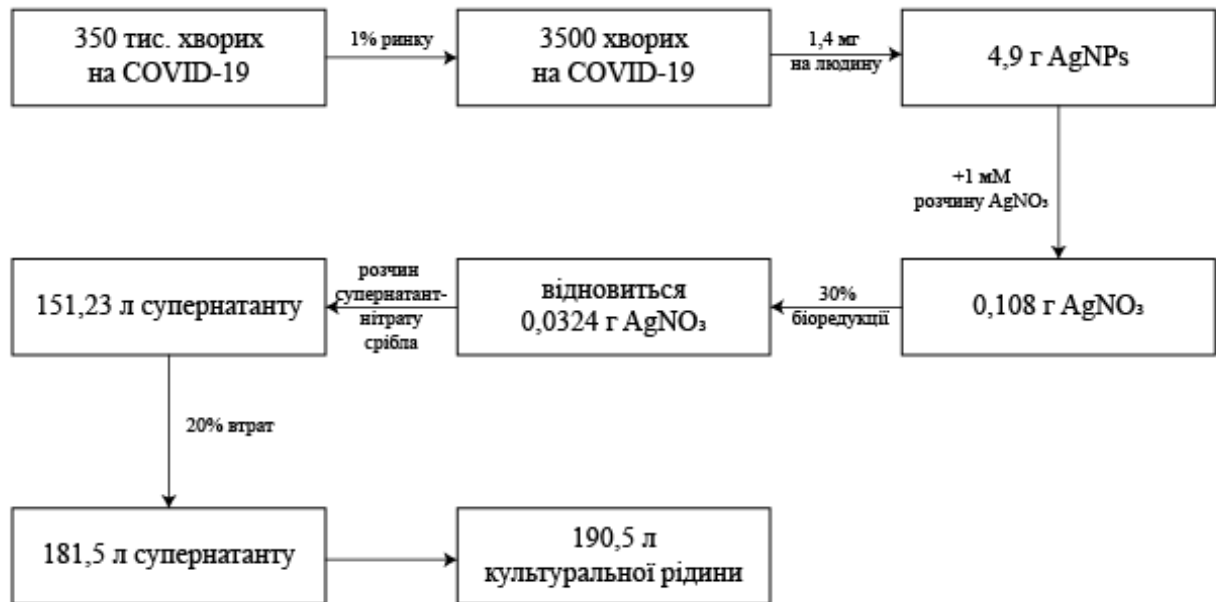


Рис. 2.1. Схема розрахунків необхідної кількості супернатанту дріжджів для отримання 4,9 г наночастинок срібла

Далі, знаючи необхідний об'єм культуральної рідини, необхідно підібрати ферментер необхідного об'єму для вирощування дріжджів. Якщо прийняти кількість робочих трудоднів рівною 60, то кількість культуральної рідини, яку можна отримати за цикл становитиме 5,7 л. Отже даний процес необхідно реалізувати у ферментері з геометричним об'ємом 10 л. Після завершення процесу культивування необхідно відділити супернатант від клітин за допомогою фільтр-пресу. Очищений від клітин супернатант використовують для біосинтезу наночастинок срібла.

2.3. Механізм синтезу наночастинок срібла та їх протимікробної дії

Загальний спосіб одержання біогенних наночастинок срібла включає відновлення іонів срібла у присутності відповідної речовини-відновника або поверхнево-активної речовини (Cheng et al., 2019). У ролі речовин-відновників

часто виступають продукти життєдіяльності клітини (похідні органічних кислот та білки), або її структурні елементи (фрагменти клітинної стінки або інших мембранних структур), що виступають у ролі матриці для відновлення і стабілізації наночасток (Zhang & Zhao, 2009). Схематичне зображення процесу відновлення іонів срібла та формування наночасток срібла відображено на рисунку 2.2.

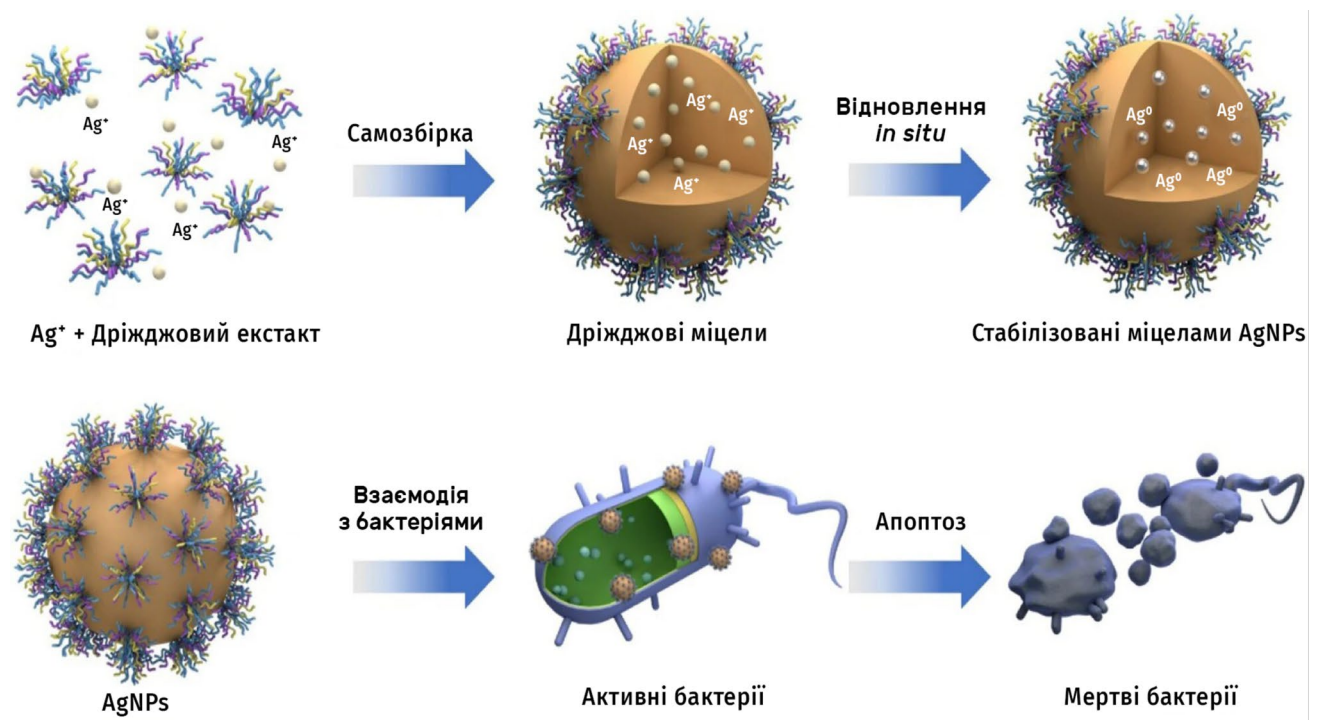


Рис.2.2. Схематичне зображення механізму утворення і механізму антибактеріальної дії наночастинок срібла (Shu et al., 2020)

У 2011 році при використанні супернатанту морських дріжджів *Candida* sp VITDKGB були отримані AgNPs. Автори визначали активність нітратредуктази у супернатанті, яка становила 320 ммоль/год/мл і зробили припущення, що саме даний фермент приймає участь у біосинтезі наночасток срібла (Kumar et al., 2011). А у 2016 році при використанні супернатанту *Cryptococcus laurentii* BNM 0525 уже було встановлено, що біоредукція срібла відбувається за участі саме дріжджової нітратредуктази (Fernandez et al., 2016). Mourato зі співробітниками показали, що значну роль у біосинтезі наночасток відіграють речовини, що

містяться у клітинній стінці дріжджів. Іони срібла відновлюються присутніми у клітинній стінці ферментами, що призводить до утворення «ядер» з Ag^0 , які згодом збільшуються шляхом подальшого відновлення іонів Ag^+ . Також було зроблене припущення, що іони срібла можуть дифундувати через клітинну стінку і відновлюватись ферментами, присутніми на цитоплазматичній мембрані і всередині цитоплазми (Mourato, Gadanho & Lino, 2011).

Щодо механізмів біосинтезу AgNPs за допомогою дріжджів, то вважається, що такі речовини, як білки, амінокислоти, ферменти, вітаміни, полісахариди діють як відновники і стабілізатори наночасток срібла. При використанні безклітинного водного дріжджового екстракту формування наночасток срібла розпочинається з відновлення іонів Ag^+ до Ag^0 сполуками, що містяться в самому екстракті, включаючи амінокислоти, вітаміни та вуглеводи. А далі відбувається стабілізація утворених наночасток срібла (Shu et al., 2020). Однак найбільш широко прийнятий механізм біосинтезу AgNPs при використанні дріжджів, що обумовлений НАДН-залежною нітратредуктазою. Встановлено, що відновлення іонів срібла відбувається за допомогою перенесення електронів з НАДН. Після чого відбувається стабілізація наночасток срібла за рахунок наявних у реакційній суміші біомолекул (Shabbir & Mohammad, 2018).

У 2018 р. було здійснено біосинтез AgNPs з використанням культуральної рідини *Meyerozyma guilliermondii* KX008616. Автори даного дослідження висунули кілька припущень щодо можливих механізмів відновлення іонів срібла дріжджами. Перший механізм – участь системи ферментів нітратредуктаз, які каталізують реакції відновлення іонів срібла в присутності АТФ і НАДН. Другий – активація специфічного поліпептиду, який може зв'язуватись з катіонами срібла, утворюючи при цьому специфічний комплекс, що транспортується у клітинні вакуолі, де і відбувається відновлення іонів срібла. Третій – утворення наночасток срібла на поверхні клітин. Це може бути обумовлено електростатичною взаємодією між Ag^+ і наявними на поверхні

дріжджових клітин негативно зарядженими карбоксилатними групами специфічних ферментів або білків (Alamri et al., 2018).

Відомо, що наночастинки срібла проявляють антимікробну активність проти грибків, деяких вірусів та стійких до антибіотиків штамів бактерій. Що стосується механізму дії наночасток срібла є літературні дані, що вказують на принципово різні шляхи їх біологічної дії. Так, серед можливих механізмів протимікробної дії виділяють: проникнення у внутрішньоклітинний простір та пригнічення реплікації ДНК; блокування транспортної системи у цитоплазматичних мембранах, що пов'язані з різницею електрохімічних потенціалів (натрієві канали); порушення роботи дихального ланцюга та синтезу АТФ. Або, найбільш поширений механізм протибактеріальної дії – безпосередній контакт наночасток з пептидогліканом і порушення структури клітинної стінки, що призводить до руйнування клітини (рис. 2.2). Отже спосіб протимікробної дії може бути кардинально різним і залежить від наступних факторів: розміру, структури поверхні та форми наночасток срібла.

Висунуто гіпотезу, що механізми антибактеріальної дії наночасток срібла здебільшого пов'язані з порушенням цілісності клітинної мембрани і зменшенням внутрішньоклітинного АТФ. Синтез активних форм кисню та поглинання клітиною наночасток, внаслідок різниці мембранного потенціалу, призводить до пригнічення активності дихальних ферментів та компонентів транспорту електронів, а також призводить до порушення функцій ДНК (Rahimi, et al., 2016).

Є повідомлення, що антимікробна дія наночасток срібла базується на порушенні процесу поділу клітин, пошкодженні клітинної мембрани та індукції апоптозу шляхом збільшення кількості гідроксильних радикалів у клітині (Cunha et al., 2018). Також було виявлено, що бактеріальні збудники захворювань показали більшу чутливість щодо наночасток, ніж грибкові. Передбачається, що таке явище зумовлено різницею в клітинній структурі і організації бактеріальних і грибних клітин. Будова бактеріальних клітин є простішою, тому вони не в змозі ефективно протидіяти токсичній дії AgNPs. Клітини грибів і дріжджів

витримують вищі концентрації наночастинок срібла через складнішу організацію, а також завдяки ефективній системі детоксикації (Jalal et al., 2018). Наночастки виявляють більшу антимікробну активність щодо грамнегативних бактерій, ніж щодо грампозитивних бактерій. Причиною цього явища може бути специфіка структури клітинної стінки: у грамнегативних бактерій у складі клітинної стінки є тонкий шар пептидоглікану, тоді як у клітинній стінці грампозитивних бактерій – товстий шар.

2.4. Протиракова активність наночастинок срібла

Наночастки срібла становлять інтерес в діагностиці та лікуванні деяких типів раку людини завдяки своїм унікальним властивостям (табл. 2.5). Встановлено, що AgNPs знижують життєздатність двох клітинних ліній раку молочної залози (MCF-7 та T47D). Зменшення життєздатності пухлинних клітин спостерігалось при концентрації наночастинок срібла 2,5 мкг/мл і вище. При цьому життєздатність здорових клітин молочної залози за такої концентрації AgNPs не змінилась. Дослідження механізму апоптозу встановило, що загибель клітин пов'язують з активацією клітинного ферменту каспази. Велика частина біосинтезованих наночастинок поглинається клітинами шляхом ендоцитозу. Всередині ендолізосом відбувається вивільнення іонів Ag^+ , які в свою чергу спричиняють збільшення кількості активних форм кисню, що і призводить до апоптозу (Ortega et al., 2015). Saratale зі співробітниками синтезували AgNPs з кульбаби лікарської (*Taraxacum officinale*). Синтезовані наночастки показали високий цитотоксичний ефект щодо клітин раку печінки людини (HepG2) (Saratale, Benelli, Kumar, Kim & Saratale, 2018).

Kurpusamy з колегами успішно біосинтезували наночастки срібла з використанням спиртового екстракту пелюстків троянди (*Rosa indica*). Екстракт-стабілізовані AgNPs показали потенційну протипухлинну активність щодо лінії клітин раку аденокарциноми товстої кишки людини HCT-15. У свою чергу, значне зниження життєздатності клітин та підвищення цитотоксичності щодо клітин раку товстої кишки HCT-116 показали AgNPs, синтезовані з

використанням водного екстракту рослини *Commelina nudiflora* (Kuppusamy et al., 2016). Біофункціоналізовані AgNPs, синтезовані в різних рослинних екстрактах гуави та гвоздики, мали протираковий ефект щодо ряду різних ліній ракових клітин: колоректальна аденокарцинома людини; рак нирки людини; хронічний мієлогенний рак людини (лейкемія); рак шийки матки людини (Raghunandan et al., 2011).

Таблиця 2.5. Протипухлинна дія біогенних наночасток срібла

| Дріжджі, які були використані для біосинтезу | Модель пухлини | Показник протипухлинної активності (IC ₅₀ , мкг/мл) | Джерело |
|--|---|--|------------------------|
| <i>Cryptococcus laurentii</i> BNM 0525 | Клітини карциноми молочної залози MCF-7 | 5 | Ortega et al., 2015 |
| | Клітини карциноми молочної залози T47D | | |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | Клітини хоріокарциноми плаценти людини BeWo | 150 | Salvadori et al., 2019 |
| <i>Metschnikowia</i> sp. HX-YS | Клітини карциноми легень A549 | 0,25 | Liu et al., 2021 |
| | Клітини карциноми легень H1975 | | |

Rajeshkumar для синтезу наночасток срібла використав як відновник білковий пігмент фікоціанін, що було виділено з ціанобактерій *Nostoc linckia*. Отримані наночастки виявляли ефективну цитотоксичну активність щодо клітинної лінії MCF-7 (аденокарцинома молочної залози людини), інгібуюча концентрація (IC₅₀) склала 27,79±2,3 мкг/мл (Rajeshkumar, 2016). Крім того, є дані щодо багатообіцяючої протипухлинної активності AgNPs проти клітин A549 (карцинома легені людини), HeLa (аденокарцинома шийки матки людини), MDAMB231 (аденокарцинома молочної залози людини) (El-Naggar, Hussein & El-Sawah, 2017).

2.5. Інші властивості біогенних наночасток срібла

Наночастки срібла також володіють каталітичною дією. Цю властивість наночасток можна використати для пришвидшення деградації у навколишньому середовищі таких токсичних речовин, як нітрофеноли та різноманітні барвники.

Фотокаталітичну активність AgNPs, які були отримані з використанням *Saccharomyces cerevisiae* оцінили шляхом деградації метиленового синього під дією сонячного опромінення, адже встановлено, що сонячне світло є більш ефективним, ніж інші методи опромінення для деградації барвників. Під час перебування на сонці, коли фотони потрапляють на наночастки, що присутні в колоїдній суміші, електрони на поверхні часток збуджуються. Розчинені молекули кисню в реакційному середовищі приймають збуджені електрони з поверхні наночасток і перетворюються в аніонні радикали кисню. Ці радикали руйнують органічний барвник на більш прості органічні молекули. Тому біосинтезовані наночастки срібла можуть діяти як стабільний та ефективний фотокаталізатор для деградації метиленового синього під час опромінення видимим світлом (Roy, Sarkar & Ghosh, 2015).

Серед перспективних напрямів застосування наночасток срібла треба відзначити використання у конструюванні біосенсорів. Che зі співробітниками сконструювали новий амперометричний імуносенсор для визначення α -1 фетопротейну (АФП). По-перше, багатошарову композитну вуглецево-срібну нанотрубку (MWNT–Ag) було іммобілізовано на поверхні скловугільного електроду, який потім покривали хітозан-MnO₂ (CS-MnO₂) з високою плівкоутворювальною здатністю. Останнім шаром на електрод наносили наночастки золота що утворювали шар для іммобілізації анти-AFP. Дана композитна система була оптимізована для реалізації надійного визначення АФП у діапазоні 0,25-250 нг/мл з межею виявлення 0,08 нг/мл (S/N = 3). Запропонований імуносенсор продемонстрував швидку та високочутливу амперометричну відповідь на АФП із прийнятною стабільністю та відтворюваністю (Che et al., 2010).

Висновки до розділу 2

Отже, на сьогодні є ряд публікацій, в яких показано можливість отримання наночасток срібла та золота з використанням безклітинного водного екстракту, культуральної рідини або супернатанту, а також біомаси дріжджів. При цьому у

процесі біосинтезу наночастинок задіяні різноманітні біологічні речовини, що локалізуються у клітині або виділяються у культуральну рідину. Біогенні наночастки срібла володіють антимікробною та протипухлинною дією. Вони показали свою дієвість щодо збудників таких захворювань, як пневмонія, шигельоз, дерматити, кандидоз та інші. При цьому наночастки срібла мають низьку цитотоксичність для нормальних клітин людини та тварин. Що стосується механізму їх біологічної дії, то припускається, що вони пригнічують реплікацію ДНК, активують синтез каспаз, збільшують кількість активних форм кисню, блокують різницю електричного потенціалу, який утворюється в цитоплазматичних мембранах, а також пригнічують дихальний ланцюг у мікробних клітинах. Механізм дії наночастинок срібла відрізняється в залежності від характеристик (форма, розміри), а також від біологічного об'єкту. Антивірусна активність наночастинок срібла може бути обумовлена блокуванням зв'язування вірусу з клітиною за рахунок зміни структури вірусних капсидних білків, а також блокуванням етапу проникнення вірусу в клітину через зміну мембранного потенціалу. Механізм ж протибактеріальної дії наночастинок срібла заключається у безпосередньому контакті наночастинок з пептидогліканом, що призводить до порушення структури клітинної стінки та загибелі клітини.

Найбільший практичний інтерес для біосинтезу наночастинок срібла викликають дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, що є одним з найбільш досліджених і широко використовуваних у промисловості мікроорганізмів. Біотехнологічний синтез наночастинок має великі перспективи до промислового впровадження, адже є економічною та екологічною альтернативою хімічним та фізичним підходам.

Наукові результати даного розділу дисертації висвітлені у статті (Харченко, Лазюка, Скроцька, & Пенчук, 2021; Скроцька, Лазюка, & Харченко, 2022).

РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Об'єкти дослідження

Основними об'єктами дослідження були дріжджі:

1. *Saccharomyces cerevisiae* M437 з колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій;
2. *Saccharomyces cerevisiae* 71В з колекції живих культур кафедри біотехнології, шкіри та хутра Київського національного університету технології та дизайну.

Наночастки срібла отримували біогенним способом з використанням *S. cerevisiae* M437 та *S. cerevisiae* 71В.

Для дослідження біологічних властивостей (антибактеріальна та антиадгезивна активність) біогенних наночасток срібла використовували тест-культури мікроорганізмів – референс-штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 та *Escherichia coli* ATCC 25922 (типові культури мікроорганізмів для визначення антибактеріальної активності) з колекції Державної Установи «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського» НАМН України; клінічні ізоляти *Staphylococcus aureus* 1536 та *Klebsiella pneumoniae* 520 отримані з Київської обласної клінічної лікарні. Штами виділені з ранових поверхонь пацієнтів стаціонару. Вміст ран збирали шприцом або тампоном перед антимікробною терапією. Ідентифікацію мікроорганізмів проводили за допомогою мікробіологічного аналізатора VITEK 2 compact 15 (BIOMERIEUX, Франція).

3.2. Поживні середовища та матеріали

Середовище 1. Середовище Сабуро (декстроза – 40,0 г/л, агар бактеріологічний – 15,0 г/л, суміш (1:1) ферментованої тваринної тканини та гідролізату панкреатичного казеїну – 10,0 г/л, рН = 5,6). Середовище

використовували для зберігання та вирощування *S. cerevisiae* M437 та *S. cerevisiae* 71В (у пробірках на скошеному агарі).

Середовище 2. Середовище YPD (глюкоза – 20 г/л, пептон – 20 г/л, дріжджовий екстракт – 10 г/л). Використовували для культивування *S. cerevisiae* M437 з метою подальшого використання для біосинтезу наночасток срібла.

Середовище 3. 20 % розчин глюкози. Використовували для культивування *S. cerevisiae* 71В з метою подальшого використання для біосинтезу наночасток срібла.

Середовище 4. M9 (Na_2HPO_4 – 24 г/л, KH_2PO_4 – 12 г/л, NaCl – 2 г/л, NH_4Cl – 4 г/л). Використовували для культивування штамів бактерій, які використовували при дослідженні біологічних властивостей наночасток срібла, отриманих з використанням *S. cerevisiae* 71В.

МТТ (3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолію бромід; тіазоліловий синій) Sigma Aldrich (Сент-Луїс, Міссурі, США).

ДМСО (диметилсульфоксид, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, 99.99%) Xingfa Chemicals (Hubei, China).

Кристалічний фіолетовий ($\text{C}_{25}\text{N}_3\text{H}_{30}\text{Cl}$) 30% спиртовий розчин Jiangsu Hongyuan Pharmaceutical (Jiangsu, China).

Сіль нітрату срібла (AgNO_3 , 99.99%) Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Спирт етиловий 70% ТОВ «Медлев» (Дніпро, Україна).

3.3. Культивування дріжджів

3.3.1. *Saccharomyces cerevisiae* M437. Культуру підтримували у пробірках зі скошеним сусло-агаром при 4 °С. Для приготування інокуляту робили змив культури з поверхні агаризованого скошеного середовища та вносили в колбу з 150 мл стерильного середовища YPD (інокулят становив 5 % від об'єму середовища, концентрація інокуляту 10^4 - 10^5 клітин/мл). Культивування здійснювали у 750 мл колбах (150 мл середовища) при 30 °С, 200 об/хв упродовж 24 год. Культивували дріжджі до досягнення $\text{OD}_{600} = 2$.

3.3.2. *Saccharomyces cerevisiae* 71B. Культуру підтримували у пробірках зі скошеним агаризованим середовищем Сабуро при 4 °С. Для приготування інокуляту робили змив культури з поверхні агаризованого скошеного середовища (інокулят становив 5 % від об'єму середовища, концентрація інокуляту 10^4 - 10^5 клітин/мл), вносили в 150 мл стерильного середовища (середовище 3), в склад якого входила лише глюкоза (20%). І одразу вносили нітрат срібла у досліджуваних концентраціях (підпункт 3.4.2).

3.4. Біосинтез наночасток срібла

3.4.1. Використання *Saccharomyces cerevisiae* M437 для отримання наночасток срібла. Отримання супернатанту: після культивування дріжджів упродовж 24 годин культуральну рідину центрифугували при 5000 об/хв упродовж 30 хв для відділення дріжджових клітин. Після чого супернатант зливали у стерильну колбу і фільтрували через стерильний шприцевий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Отримання безклітинного водного екстракту: культуральну рідину центрифугували при 5000 об/хв упродовж 30 хв, далі зливали супернатант, а осад клітин тричі промивали стерильною бідистильованою водою від залишків компонентів поживного середовища. Відмиті клітини ресуспендували у 150 мл стерильної бідистильованої води та інкубували при 30 °С, 320 об/хв упродовж 72 годин. Після інкубації проводили центрифугування при 5000 об/хв упродовж 30 хв. Осад відділяли, а супернатант використовували для подальших досліджень як безклітинний водний екстракт. Його фільтрували через стерильний шприцевий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Умови біосинтезу: до супернатанту або безклітинного водного екстракту вносили розчин нітрату срібла до кінцевої концентрації 1 мМ. Проби витримували при 45 °С в статичних умовах упродовж 72 год. У якості контрольних зразків використовували: 1 мМ водний розчин нітрату срібла, поживне середовище YPD з додаванням 1 мМ нітрату срібла, водний безклітинний дріжджовий екстракт без додавання розчину нітрату срібла, та супернатант без додавання розчину нітрату срібла. Контрольні зразки

витримували за тих же умов, що і дослідні. Виділення наночастинок срібла: центрифугування зразків при 14 000 об/хв упродовж 20 хв, надосадову рідину зливали, а осад наночастинок промивали деіонізованою водою. Вказані дії повторювали тричі (Jalal et al., 2018).

3.4.2. Синтез наночастинок з використанням *Saccharomyces cerevisiae* 71В.

Біосинтез наночастинок срібла здійснювали у культуральній рідині *S. cerevisiae* 71В. Після змиву культури з агаризованого середовища і внесення у 20 % розчин глюкози (підпункт 3.3.2) одразу вносили нітрат срібла. Досліджували вплив різних концентрацій нітрату срібла на біосинтез наночастинок у культуральній рідині. Нітрат срібла вносили до кінцевих концентрацій: 0,5 мМ, 1,0 мМ, 1,5 мМ і 2,0 мМ. Параметри біосинтезу наночастинок срібла: 30 °С, 130 об/хв, упродовж 120 год. Далі працювали з двома розчинами наночастинок срібла. Перший розчин наночастинок: культуральну рідину центрифугували при 3000 об/хв упродовж 15 хв для відділення клітин. Супернатант із біосинтезованими наночастинами срібла фільтрували послідовно через стерильні шприцеві фільтри з діаметром пор 0,8 мкм та 0,22 мкм і в подальшому використовували для проведення біологічних досліджень. Другий розчин наночастинок: осад клітин, який отримали при центрифугуванні культуральної рідини промивали стерильною бідистильованою водою від залишків неспожитої клітинами глюкози. Відмиті клітини ресуспендували у 150 мл стерильної бідистильованої води та інкубували при 4 °С упродовж 96 годин. Після інкубації проводили центрифугування при 3000 об/хв упродовж 15 хв. Осад відділяли, а супернатант фільтрували послідовно через стерильні шприцеві фільтри з діаметром пор 0,8 мкм та 0,22 мкм і використовували для подальших досліджень як безклітинний водний екстракт з біогенними наночастинами срібла.

3.5. UV-vis спектроскопія синтезованих наночастинок срібла

Спектри поглинання зразків реєстрували з використанням UV-Vis спектрофотометра Thermo Spectronic UV300 (Unicam, England) та

спектрофотометра DS-11 FX+ (DeNovix, USA) в діапазоні довжин хвиль 200-700 нм. Поглинання вимірювали з роздільною здатністю 2 нм. Вимірювання здійснювали через 24, 48 та 72 год після внесення нітрату срібла до досліджуваних зразків (безклітинний водний екстракт, супернатант). В якості холостого досліду використовували бідистильовану воду.

3.6. Аналіз розміру і зета-потенціалу наночастинок срібла

Аналіз розміру наночастинок, синтезованих з використанням *S. cerevisiae* M437 проводили шляхом визначення гідродинамічного діаметру (HD) (Foujdar, Chopra, Vera, Chauhan & Mahajan, 2021). HD контролювали за методом динамічного розсіювання світла (DLS) за допомогою двокутового аналізатора розмірів частинок та молекул Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобританія). Всі виміри проводили при постійній температурі (25 °C) у нейтральному середовищі (pH = 7,0). Експеримент проводили тричі. Подальші статистичні розрахунки проводили із використанням програмного забезпечення Stat Plus Pro 5.9.8. Software та STATISTICA, version 8.0 (StatSoft, Inc. 2007).

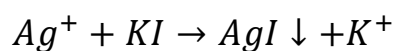
3.7. Електронна мікроскопія

Визначення розмірів наночастинок срібла, синтезованих з використанням *S. cerevisiae* M437, їх загальної морфології проводили методом електронної мікроскопії (Kthiri et al., 2021). Для цього готували спиртові суспензії наночастинок, які висушували при кімнатній температурі. Потім наносили на мідні сіточки із вуглецевим покриттям. Після цього зразки аналізували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу JEM-1400 (Jeol, Японія) при прискорюючій напрузі 80 кВ і інструментальному збільшенні $\times 50$ тис. – $\times 100$ тис.

3.8. Визначення концентрації іонів срібла

Для встановлення правильних концентрацій колоїдного срібла був застосований кількісний метод визначення іонів срібла в розчині за допомогою

якісної реакції з йодистим калієм. Для визначення концентрації іонів срібла в якості реагенту використали йодид калію (KI). Суть реакції полягає в утворенні йодиду срібла, що випадає в осад сіро-жовтого кольору:



Для побудови калібрувальної кривої використали 10 мМ розчин нітрату срібла. Готували десятикратні розведення від концентрації 10^{-5} до 10 мМ. Аналіз проводили в 96-лунковій платі, визначення оптичної густини проводили за допомогою планшетного рідера при довжині хвилі 620 нм.

3.9. Визначення біологічної активності біогенних наночасток срібла

3.9.1. Дослідження антибактеріальної дії. Цитотоксичність зразків для бактеріальних клітин визначали за допомогою аналізу МТТ, який заснований на здатності дегідрогеназ живих клітин відновлювати незабарвлені форми МТТ до блакитного кристалічного формагану, розчинного в ДМСО (диметилсульфоксид).

Аналіз проводили з використанням 96-лункових планшетів (Sarstedt, Nümbrecht, Німеччина). Кожен зразок додавали в трьох повторах, потім вносили референс-штами (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 та *Escherichia coli* ATCC 25922) або клінічні ізоляти (*Staphylococcus aureus* 1536 та *Klebsiella pneumoniae* 520), бактеріальну культуру інкубували упродовж 18 годин. До клітин додавали розчин МТТ у концентрації 0,1 мг/мл по 50 мкл у лунку та інкубували при температурі 37 °С упродовж 1,5 год. Після інкубації реагент, що не прореагував видаляли та відмивали клітини від його залишків бідистильованою водою. Потім, до клітин додавали ДМСО по 50 мкл у лунку, та вимірювали оптичну густину зразків на планшеті-спектрофотометрі з вертикальним променем (Thermo Labsystems, Вантаа, Фінляндія) при довжині хвилі 490 нм (Präbst et al., 2017).

Бактерицидну активність зразків оцінювали по відношенню до індексу виживаності клітин. Крім того, клітини, вирощені у середовищі М9, приймали за

100% виживання клітин (контрольний зразок). Виживаність клітин у зразках розраховували відносно контролю.

Усі досліді проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3-5.

3.9.2. Встановлення антиадгезивної активності. Значення адгезованих клітин вимірювали шляхом фіксації бактеріальних клітин (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* 1536 та *Klebsiella pneumoniae* 520) у платах (96-лункові планшети) 30 % спиртовим розчином кристалічного фіолетового барвника. Тест проводився подібно до тесту МТТ. Через 18 год інкубації при температурі 37 °С клітини на платах фіксували та фарбували спиртовим розчином кристалічного фіолетового. Потім видаляли надлишок барвника, а планшети промивали деіонізованою стерильною водою та сушили. Адсорбований клітинами барвник розчиняли в 70% розчині етилового спирту. Оптичну густину отриманого розчину вимірювали на вертикальному спектрофотометрі Multiskan Ascent (Thermo LabSystems, Вантаа, Фінляндія) при довжині хвилі 540 нм. Адгезивну активність зразків оцінювали за відношенням оптичної густини досліджуваних розчинів до оптичної густини контролю, і виражали як відсоток адгезованих клітин у порівнянні з контрольними клітинами, вирощеними в середовищі М9 (Corte et al., 2019; Elengoe & Hamdan, 2017).

Усі досліді проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3-5.

3.10. Статистичний аналіз

Всі результати представлені як медіана значень з інтерквартильним розкидом Me (LQ–UQ), де Me = медіана (50 % центиль), LQ = 25 % центиль і UQ = 75 % центиль. Перевірку правильності нульової гіпотези проводили з використанням непараметричного критерію Манна-Уїтні та критерію порівняння пар Вілкоксона (Wilcoxon matched pairs test (WMP-test)). Різницю між групами, що порівнювалися, визнавали статистично достовірною

при значенні $p < 0,05$ (Fay & Malinovsky, 2017). Розрахунки значень медіан з інтерквартильним розкидом проводили з використанням програмного забезпечення Microsoft Office Excel, 2019. Всі статистичні розрахунки проводили із використанням програмного забезпечення Stat Plus Pro 5.9.8. Software та STATISTICA, version 8.0 (StatSoft, Inc. 2007).

Висновок до розділу 3

Визначено та охарактеризовано об'єкти дослідження. Наведено способи культивування *S. cerevisiae* M437 та *S. cerevisiae* 71В. Описані різні шляхи біогенного синтезу наночастинок срібла: з використанням культуральної рідини, супернатанту культуральної рідини, чи безклітинного водного екстракту дріжджів. У розділі вказані методи, які використовували для аналізу та характеристики наночастинок срібла, отриманих з використанням *S. cerevisiae* M437. Наведені методи дослідження біологічних властивостей наночастинок срібла, отриманих з використанням *S. cerevisiae* 71В.

РОЗДІЛ 4.
БІОСИНТЕЗ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОЧАСТОК СРІБЛА
ОТРИМАНИХ З ВИКОРИСТАННЯМ
***SACCHAROMYCES CEREVISIAE* M437**

4.1. Біосинтез наночастинок срібла та UV-vis спектроскопія

Після додавання нітрату срібла до безклітинного водного екстракту *S. cerevisiae* M437 колір реакційної суміші з прозорого почав змінюватись на світло-коричневий і до кінця біосинтезу (72 год при 45 °С в статичних умовах) став темно-коричневим (рис. 4.1, А). У випадку додавання нітрату срібла до супернатанту культуральної рідини *S. cerevisiae* M437 колір реакційної суміші на кінець біосинтезу змінився зі світло-коричневого на майже чорний колір (рис. 4.1, Б). Зміна кольору слугує першим доказом успішного формування наночастинок срібла під час їх біогенного синтезу (Kthiri et al., 2021). Вказана зміна кольору реакційної суміші (безклітинний водний екстракт, супернатант) при додаванні нітрату срібла пояснюється збудженням поверхневого плазмонного резонансу (SPR), що свідчить про зменшення іонів срібла (Ag^+) та їх біовідновлення до AgNPs (Rosman et al., 2020).

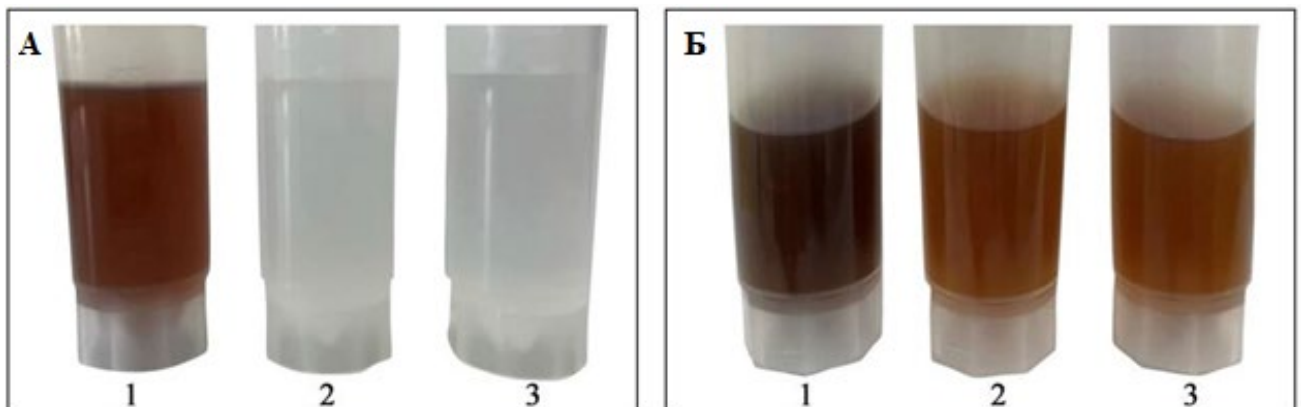


Рис. 4.1. Біосинтез AgNP (А: безклітинний водний екстракт *S. cerevisiae* M437 (1 – з AgNO_3 , 2 – без AgNO_3 ; 3 – розчин AgNO_3), Б: супернатант культуральної рідини *S. cerevisiae* M437 (1 – з AgNO_3 , 2 – без AgNO_3 ; 3 – середовище YPD з AgNO_3)

Формування AgNPs у досліджуваних розчинах підтверджено UV-vis спектроскопічними дослідженнями (рис. 4.2). Як показано на спектрах інтенсивність поглинання збільшувалась з часом без зсуву довжини хвилі, при якій спостерігали максимальне поглинання. Це говорить про безперервне зменшення іонів срібла та збільшення концентрації AgNPs, а також рівномірний розподіл наночасток за розмірами (Хуе et al., 2016; Win et al., 2020).

При використанні для біосинтезу AgNPs безклітинного водного екстракту дріжджів (рис. 4.2, А) спостерігати виражений пік поглинання у діапазоні довжин хвиль від 300 до 540 нм з середньою довжиною хвилі, на якій відбувся пік близько 425 нм. Подібний пік поверхневого плазмонного резонансу описано для AgNPs з розмірами менше 50 нм (Win et al., 2020). При використанні супернатанту культуральної рідини *S. cerevisiae* M437 для біосинтезу AgNPs спостерігали розширення спектрів поглинання (рис. 4.2, Б). Це може бути пов'язано із агрегацією AgNPs або із збільшенням їх розміру (Kumari et al., 2020).

Іншими авторами також було показано можливість біосинтезу AgNPs з використанням дріжджів. При використанні психротрофних дріжджів *Yarrowia lipolytica* NCYC 789 максимальний пік поглинання становив 410 нм, а середній розмір наночасток – 15 нм (Apte et al., 2013). Пік поглинання AgNPs при їх синтезі за допомогою екстремофільних дріжджів (рід та вид авторами не вказано) становив 420 нм, а розмір – 4-15 нм (Mourato et al., 2011). При аналогічному піку поглинання з використанням *Saccharomyces cerevisiae* для біосинтезу AgNPs були отримані наночастки з розмірами 60-110 нм (Badhusha & Mohideen, 2016). Вважається, що зміщення піку поглинання світла у сторону червоного діапазону спектру вказує на збільшення розміру AgNPs (Win et al., 2020), при цьому наведені нижче експериментальні дані не завжди це підтверджують. Так, при піку 430 нм розмір AgNPs синтезованих з використанням *Saccharomyces cerevisiae* становив 2-20 нм (Korbekandi et al., 2016) і 60-80 нм (Saravanan et al., 2013), при піку 440 нм – 10-60 нм (Sowbarnika et al., 2018), при піку 450 нм – 10 нм (Roy et al., 2015). При використанні дріжджів

Rhodotorula sp. ATL72 для біосинтезу AgNPs отримали наночастки розміром 8-21 нм, при цьому пік поглинання світла становив 450 нм (Soliman et al., 2018).

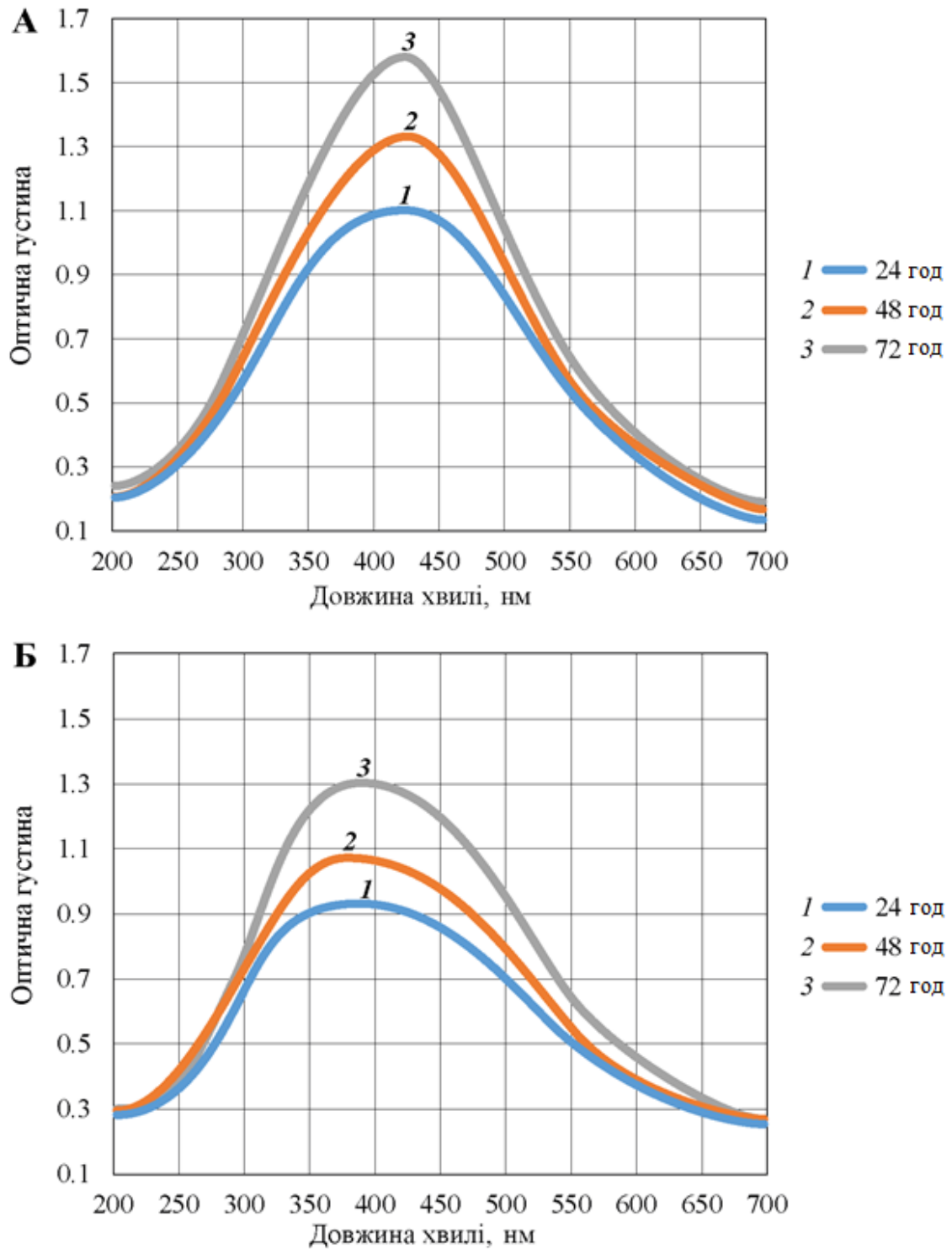


Рис. 4.2. Спектр поглинання біосинтезованих AgNPs з використанням безклітинного дріжджового екстракту (А) і супернатанту культуральної рідини (Б)

4.2. Розмір, зета-потенціал та стабільність біосинтезованих наночастинок

Первинними результатами, отриманими за допомогою DLS, є значення розподілу часток за інтенсивністю. Значення інтенсивності розподілу часток в розчині пропорційне значенню квадрату молекулярної маси. Такий розподіл використовують для визначення збільшення розміру часток у зразку. Для аналізу достовірності утворення наноконкомплексів порівнювали показники PDI (індекс полідисперсності) та Z-Average (середній напівваріант). Останній є основним та найбільш стабільним параметром даного методу. Z-Average визначає середнє значення розміру часток як «середнє значення гармонічного середнього діаметра часток». За індексом полідисперсності можна визначити розподіл частинок за розмірами або масою. PDI визначається як співвідношення середньовагової молекулярної маси до середньочислової молекулярної маси. Це є безрозмірна величина ширини розподілу часток за розмірами. Розрахунки, які використовуються для визначення розміру наночастинок і PDI, визначені в стандартних документах ISO 13321: 1996 E і ISO 22412: 2008 (Malvern Instruments Limited, 2011). Якщо PDI має значення більше 0.7, то зразок має дуже широкий розподіл часток за розмірами і, ймовірно, не може бути проаналізований методом динамічного розсіювання світла (Danaei et al., 2018). Чим більшим є значення PDI, тим менш монодисперсними є наночастки у розчині. Виходячи з цього, чим менше значення PDI, тим наночастки в зразку є менш здатними до агрегації та їх розмір знаходиться у вузькому діапазоні значень (Skóra et al., 2021).

Виділені наночастки диспергували у бідистильованій воді при нейтральному рН і проводили дослідження з використанням Zetasizer Nano ZS. При аналізі розміру AgNPs, які були синтезовані з використанням супернатанту культуральної рідини *S. cerevisiae* M437 встановлено, що найбільша кількість наночастинок має розміри 152,2 нм, що є близьким до значення Z-Average (табл. 4.1). При перевірці правильності нульової гіпотези з використанням критерію Вілкоксона було встановлено, що значення розподілу за розміром у

Піку 1 та Z-Average достовірно відрізняються ($p < 0,05$). Значення PdI становить 0,3, що відповідає досить вузькому діапазону розподілу часток за розміром.

Таблиця 4.1. Характеристика синтезованих AgNPs при використанні супернатанту культуральної рідини *S. cerevisiae* M437

| Показник | <i>Виміри проведені одразу після біосинтезу</i> | | |
|---------------|--|-------------------------|-------------------|
| | Пік 1 | Пік 2 | Пік 3 |
| Розподіл, нм | 152,2 [146,1; 154,2] | 4848,0 [4519,0; 4997,0] | 0,0 [0,0; 13,1] |
| Розподіл, % | 94,4 [91,2; 96,2] | 5,1 [3,9; 7,2] | 0,0 [0,0; 1,9] |
| Z-Average, нм | 129,6 [127,5; 132,0] | | |
| PdI | 0,3 [0,3; 0,4] | | |
| | <i>Виміри проведені через 45 діб зберігання при 4 °С</i> | | |
| | Пік 1 | Пік 2 | Пік 3 |
| Розподіл, нм | 204,4 [176,5; 229,1] | 3779,0 [2448,5; 4504,0] | 0,0 [0,0; 2148,0] |
| Розподіл, % | 91,2 [80,7; 91,9] | 8,8 [8,2; 15,6] | 0,0 [0,0; 3,8] |
| Z-Average, нм | 156,1 [153,3; 163,8] | | |
| PdI | 0,5 [0,5; 0,6] | | |

Стабільність диспергованих у бідистильованій воді наночастинок оцінювали через 45 днів після їх зберігання при 4 °С (табл. 4.1). Після зберігання спостерігались певні зміни у розмірах AgNPs. При перевірці правильності нульової гіпотези з використанням критерію Вілкоксона було встановлено, що значення розподілу за розміром у Піку 1 та Z-Average достовірно не відрізняються ($p > 0,05$). Це вказує на те, що після зберігання за вказаних умов AgNPs мають сферичну форму. Значення PdI становить 0,5, що відповідає середньому діапазону розподілу наночастинок за розміром. Отже, AgNPs після зберігання ймовірно піддаються деградації, або у суспензії відбуваються безперервні процеси перетворення, що призводять до розширення діапазону значень гідродинамічного діаметру. Варто зазначити, що після зберігання розподіл за об'ємом суттєво не змінився (табл. 4.1) і ці зміни є недостовірними ($p > 0,05$). Проте відбувається достовірне ($p < 0,01$) збільшення показника PdI на 40 %, що безпосередньо вказує на розширення діапазону значень

гідродинамічного діаметру. Це в свою чергу підтверджує наявність реакцій розпаду та агрегації сформованих наночастинок.

Після зберігання відбувається збільшення на 34 % ($p < 0,05$) гідродинамічного діаметру синтезованих AgNPs (Пік 1, рис. 4.3) та на 17 % ($p < 0,01$) збільшується значення Z-Average.

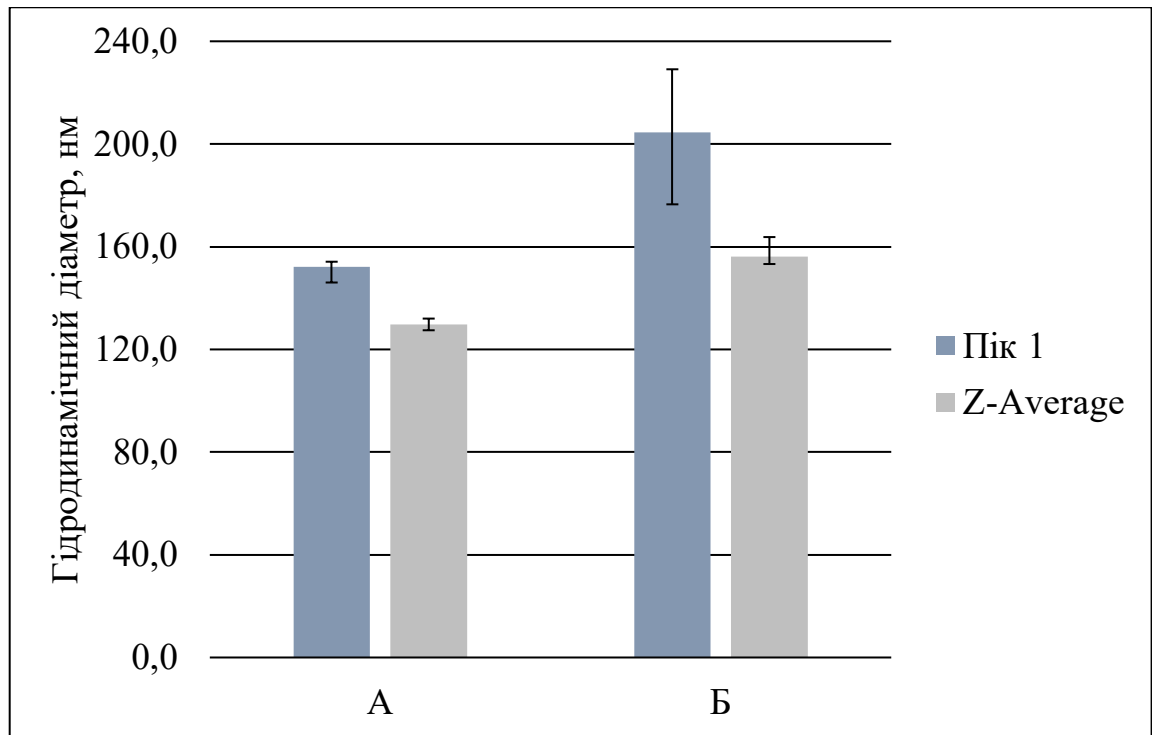


Рис. 4.3. Розміри щойно синтезованих (А) AgNPs з використанням супернатанту *S. cerevisiae* M437 та після їх зберігання 45 діб (Б)

Характеристика AgNPs, які були отримані при використанні безклітинного водного екстракту *S. cerevisiae* M437 наведена у табл. 4.2. Значення розподілу наночастинок за розміром у Піку 1 та Z-Average достовірно не відрізняються ($p > 0,05$). Значення PdI відповідає вузькому діапазону розподілу часток за розміром. Після зберігання AgNPs упродовж 45 діб відбулись певні зміни у розмірах та розподілі наночастинок (табл. 4.2). Значення PdI після зберігання збільшується на 25 %, але дане збільшення не є достовірним ($p > 0,05$). Це говорить про те, що AgNPs залишаються стабільними у колоїдному розчині.

Таблиця 4.2. Розподіл за розмірами AgNPs отриманих при використанні безклітинного водного екстракту *S. cerevisiae* M437

| Показник | <i>Виміри проведені одразу після біосинтезу</i> | | |
|---------------|--|----------------------|-------------------|
| | Пік 1 | Пік 2 | Пік 3 |
| Розподіл, нм | 163,4 [144,2; 186,1] | 0,0 [0,0; 4444,5] | 0,0 [0,0; 0,0] |
| Розподіл, % | 100,0 [97,8; 100,0] | 0,0 [0,0; 2,2] | 0,0 [0,0; 0,0] |
| Z-Average, нм | 143,6 [138,4; 164,1] | | |
| PdI | 0,3 [0,3; 0,4] | | |
| | <i>Виміри проведені через 45 діб зберігання при 4 °C</i> | | |
| | Пік 1 | Пік 2 | Пік 3 |
| Розподіл, нм | 175,7 [173,7; 183,9] | 4561,0 [343; 4714,0] | 0,0 [0,0; 2485,5] |
| Розподіл, % | 95,2 [90,8; 96,4] | 4,8 [3,6; 6,1] | 0,0 [0,0; 1,6] |
| Z-Average, нм | 133,3 [132,0; 133,9] | | |
| PdI | 0,4 [0,4; 0,4] | | |

При порівнянні розмірів AgNPs, отриманих з використанням безклітинного водного екстракту *S. cerevisiae* M437 до та після зберігання (Пік 1, рис. 4.4) бачимо, що зміна їх гідродинамічного діаметру є статистично недостовірною ($p > 0,05$). Відбувається зменшення Z-Average на 7 % ($p > 0,05$), що є теж недостовірним. Тобто змін у формі наночастинок не відбувається.

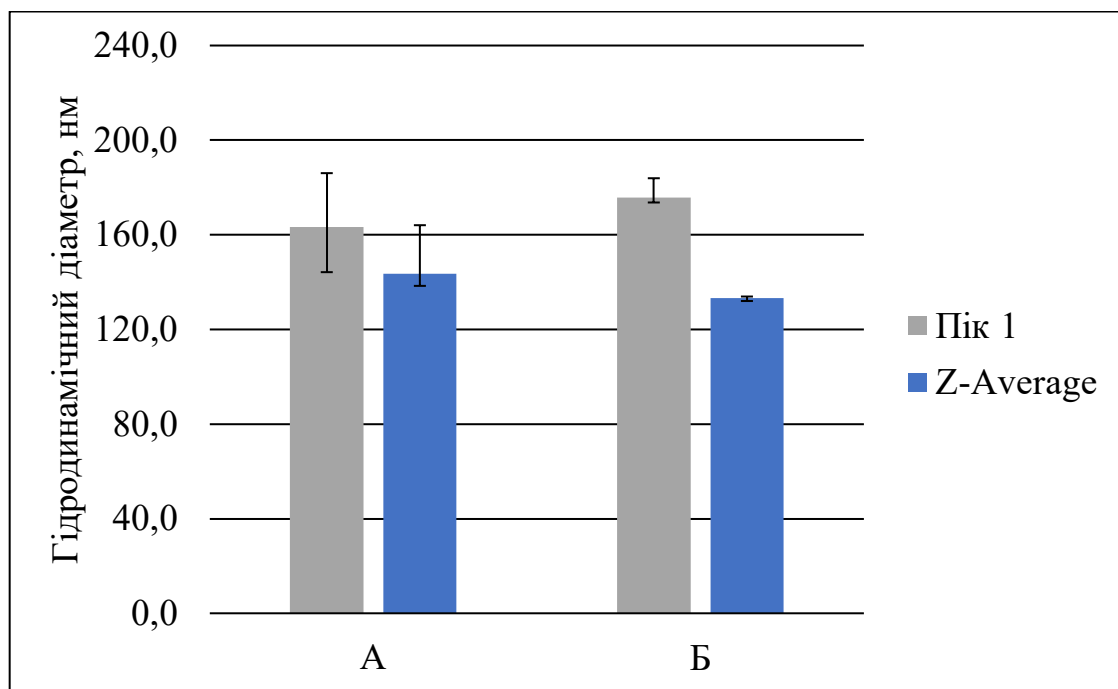


Рис. 4.4. Розміри щойно синтезованих (А) AgNPs з використанням безклітинного водного екстракту дріжджів та після їх зберігання 45 діб (Б)

Порівнюючи розміри біогенних AgNPs, отриманих за допомогою вказаних двох способів, бачимо, що значення їх гідродинамічного діаметру статистично не відрізняється (рис. 4.5). Достовірною є різниця між значеннями Z-Average ($p < 0,01$). Це говорить про те, що форма AgNPs отриманих різними способами є різною, що і підтвердили дані TEM.

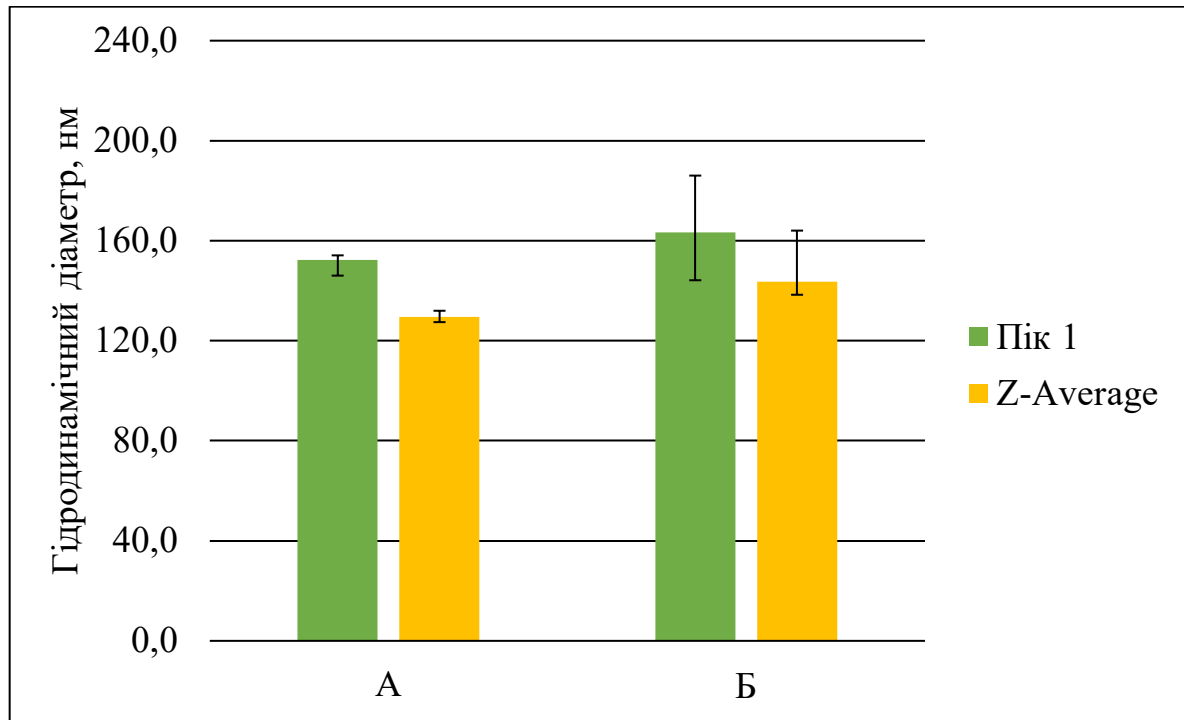


Рис.4.5. Гідродинамічний діаметр AgNPs, отриманих при використанні супернатанту (А) та безклітинного водного екстракту (Б) *S. cerevisiae* M437

Ми також порівняли характеристики AgNPs, що були отримані при використанні безклітинного водного екстракту та супернатанту культуральної рідини *S. cerevisiae* M437 після зберігання упродовж 45 діб при 4 °C (рис. 4.6). Гідродинамічний діаметр наночасток та значення Z-Average статистично не відрізняються ($p > 0,05$).

Щодо порівняння полідисперсності досліджуваних AgNPs, то наночастки отримані при використанні безклітинного водного екстракту *S. cerevisiae* M437 є на 27,2 % ($p < 0,01$) менш полідисперсними, ніж наночастки отримані при використанні супернатанту культуральної рідини *S. cerevisiae* M437 (табл. 4.1 і

4.2). Це говорить про те, що вони після вказаних умов зберігання мають більш рівномірний розподіл наночастинок за розміром.

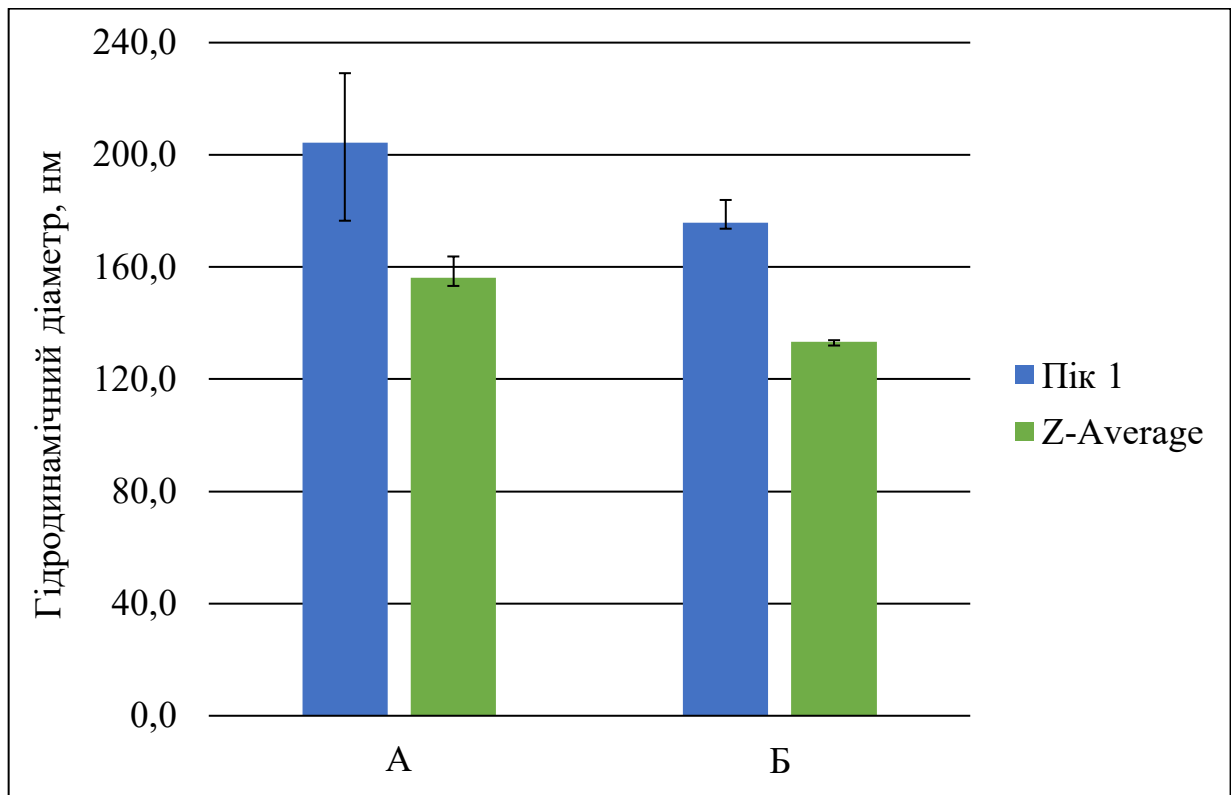


Рис. 4.6. Гідродинамічний діаметр AgNPs, отриманих при використанні супернатанту (А) та безклітинного водного екстракту (Б) *S. cerevisiae* M437 після зберігання 45 діб

Дзета-потенціал є важливим показником поверхневого заряду наночастинок. Саме з поверхневим зарядом AgNPs пов'язана їх дисперсність та стабільність (Leo et al., 2013). Велике значення негативного дзета-потенціалу свідчить про тривалу стабільність та дисперсність, відсутність флокуляції та тенденції до утворення агломератів біогенними AgNPs через відштовхування негативно заряджених часток (Skoglund et al., 2017; Foujdar et.al., 2021).

Значення дзета-потенціалу для AgNPs, що були отримані при використанні супернатанту культуральної рідини *S. cerevisiae* M437 становило -13,6 [13,8; 13,1] мВ. Після 45 діб зберігання при 4 °С дзета-потенціал збільшився на 11,7 % і становив -12,0 [-12,6; -11,0] мВ. Для AgNPs, які були отримані з використанням

безклітинного водного екстракту *S. cerevisiae* M437 значення дзета-потенціалу становило -13,7 [-14,5; -13,5] мВ, а після зберігання цей показник становив -19,3 [-20,1; -18,6] мВ. Тобто бачимо зменшення дзета-потенціалу на 29 %.

Отримані нами результати свідчать, що на поверхні AgNPs присутні негативно заряджені іони. За рахунок відштовхування між ними біогенні AgNPs є стабільними у розчині упродовж 45 діб зберігання. При цьому наночастки, які отримані із використанням безклітинного водного екстракту *S. cerevisiae* M437 є більш стабільними через більший негативний заряд їх поверхні.

4.3. Електронна мікроскопія

Морфологію та розміри біогенних AgNPs досліджували за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ). Наночастки срібла були відносно однорідними та близькими до сферичної форми (рис. 4.7) з розмірами менше 30 нм та мали тенденцію до утворення угруповань або агрегатів.

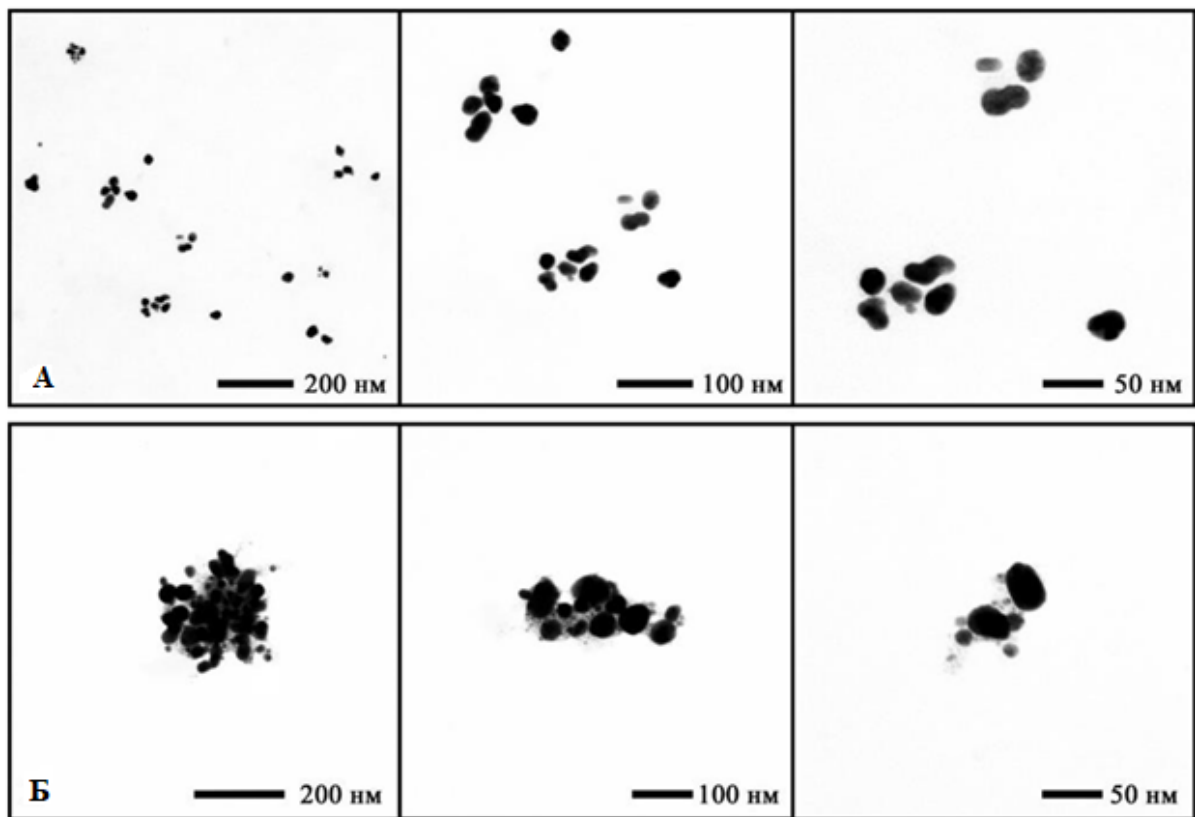


Рис. 4.7. Електронні мікрофотографії AgNPs отриманих з використанням безклітинного водного екстракту(А) та супернатанту культуральної рідини *S. cerevisiae* M437 (Б)

Відповідно до позначки внутрішнього масштабу (bar), зазначеного на мікрофотографіях, було розраховано медіанний розмір наночастинок та їх агрегатів (табл. 4.3).

Таблиця 4.3. Розмір біогенних наночастинок срібла

| Походження наночастинок | Агрегати наночастинок | | Окрема наночастилка | |
|---|-------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| | Ширина, нм | Довжина, нм | Ширина, нм | Довжина, нм |
| Отримані при використанні безклітинного водного екстракту <i>S. cerevisiae</i> M437 | 39,1 [23,1; 69,2] | 32,0 [23,1; 47,9] | 21,3 [14,2; 24,9] | 14,2 [14,2; 21,3] |
| Отримані при використанні супернатанту культуральної рідини <i>S. cerevisiae</i> M437 | 237,6 [132,0; 257,4] | 109,2 [60,6; 195,0] | 15,6 [10,8; 32,4] | 15,6 [10,8; 27,0] |

Суттєвих відмінностей у розмірах між AgNPs синтезованими з використанням супернатанту та безклітинного водного екстракту досліджуваних дріжджів не має (табл. 4.3). При синтезі AgNPs з використанням безклітинного екстракту проглядається тенденція до формування наночастинок близьких до овальної форми, а при синтезі з використанням супернатанту *S. cerevisiae* M437 – сферичних. Також помітною є особливість AgNPs, синтезованих з використанням супернатанту культуральної рідини *S. cerevisiae* M437, формувати відносно великі агрегати наночастинок.

За допомогою електронної мікроскопії встановлено, що, здебільшого, наночастки срібла, отримані біогенним шляхом з використанням дріжджів мають сферичну форму. Розмір AgNPs залежить від параметрів біосинтезу.

Представлені у даному розділі результати корелюють з результатами Korbekandi з колегами, які отримали наночастки срібла з такими самими характеристиками з використанням біомаси. При цьому біосинтез проходив при

менших температурах, а також реакційна суміш піддавалась перемішуванню (Leo et al., 2013).

Використовуючи безклітинний екстракт дріжджів ряд авторів (Soliman et al., 2018; Zahran, Mohamed, Mohamed & El-Rafie, 2013; Roy et al., 2015; Salvadori et al., 2019; Shu et al., 2020) отримали наночастки срібла сферичної форми з розміром у діапазоні 1,5-21 нм, що корелює з результатами трансмісійної електронної мікроскопії наночасток срібла синтезованих за допомогою безклітинного водного екстракту *S. cerevisiae* M437.

З використанням безклітинного екстракту червоних дріжджів *Phaffia rhodozyma* були отримані квазісферичні AgNPs діаметром 4,1 нм. До реакційної суміші додавали нітрат срібла в кінцевій концентрації 0,1 М (Rónavári et al., 2018). Синтез AgNP з використанням безклітинного водного екстракту *S. cerevisiae* продемонстровано Skora зі співавторами. Автори отримали сферичні AgNP із середнім діаметром 20,1 нм. Температура біосинтезу становила 60 °C (Skora et al., 2021).

Таким чином, залежно від вибору умов біогенного синтезу наночастинок можна отримати різні розміри AgNPs. Розміри AgNPs, які були визначені за допомогою TEM є меншими, ніж при використанні Zetasizer Nano ZS. Це можна пояснити наявністю поверхневих білків, вуглеводів та інших клітинних сполук, що можуть приймати участь у стабілізації біогенних наночасток, які були виміряні Zetasizer. Проте ці сполуки не утримуються у вакуумі під електронним променем при TEM (Xue et al., 2016). Також, слід сказати, що прилад Zetasizer Nano не може диференціювати окремі наночастки від їх агрегатів, тому сприймає окремо взятий агрегат як окрему частинку.

Отримані різні значення розмірів біогенних AgNPs також можна пояснити постійно перебігаючими процесами розпаду та утворення нових агрегатів наночасток, що відбуваються одночасно. Дана гіпотеза може бути уточнена у майбутніх дослідженнях з використанням стабілізаторів та дослідження зразків за допомогою Zetasizer Nano у динаміці протягом тривалого часу.

Висновки до розділу 4

Показана можливість опосередкованого синтезу AgNPs за допомогою дріжджів *S. cerevisiae* M437 з колекції живих культур кафедри біотехнології та мікробіології Національного університету харчових технологій. При цьому синтез AgNPs спостерігали як при використанні супернатанту культуральної рідини, так і при використанні безклітинного водного екстракту *S. cerevisiae* M437. Розмір і форма наночастинок, отриманих цими двома методами, фактично не відрізнялися. Але ми виявили різницю в конкретних розмірах AgNPs, використовуючи різні методи (Zetasizer Nano ZS і TEM). Можливо, ця різниця пов'язана з органічними сполуками, які беруть участь у формуванні та стабілізації наночастинок. Однак при використанні методу TEM ці сполуки не фіксуються, оскільки вони не можуть утримуватися на поверхні наночастинок у вакуумі під електронним променем. Також спостерігалася різниця в стабільності біогенних AgNPs після зберігання в розчині протягом 45 днів. У той же час наночастинок, отриманих з використанням безклітинного водного дріжджового екстракту, виявилися більш стабільними.

Наукові результати даного розділу дисертації висвітлені у статті (Skrotska, Kharchenko, Laziuka, Marynin & Kharchuk, 2021).

РОЗДІЛ 5.

НАНОЧАСТКИ СРІБЛА, СИНТЕЗОВАНІ З ВИКОРИСТАННЯМ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* 71В ТА ЇХ БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ

5.1. Спектроскопічні дослідження

Працюючи з дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* 71В, досліджували відмінні способи синтезу наночастинок, ніж з клітинами *Saccharomyces cerevisiae* М437 (розділ 3, підпункт 3.4.2). Результати спектроскопічних досліджень розчину наночастинок срібла у безклітинному дріжджовому екстракті (другий розчин наночастинок) представлено на рисунку 5.1. Усі спектри мали пік поглинання приблизно 400 нм. Однак, найвищі піки продемонстрували зразки, до яких нітрат срібла був доданий у концентраціях 0,5 мМ та 1,0 мМ. Значення оптичної густини в цих піках становили 1,17 і 1,34 відповідно, що в 1,8 і 2,2 рази вище контрольного зразка.

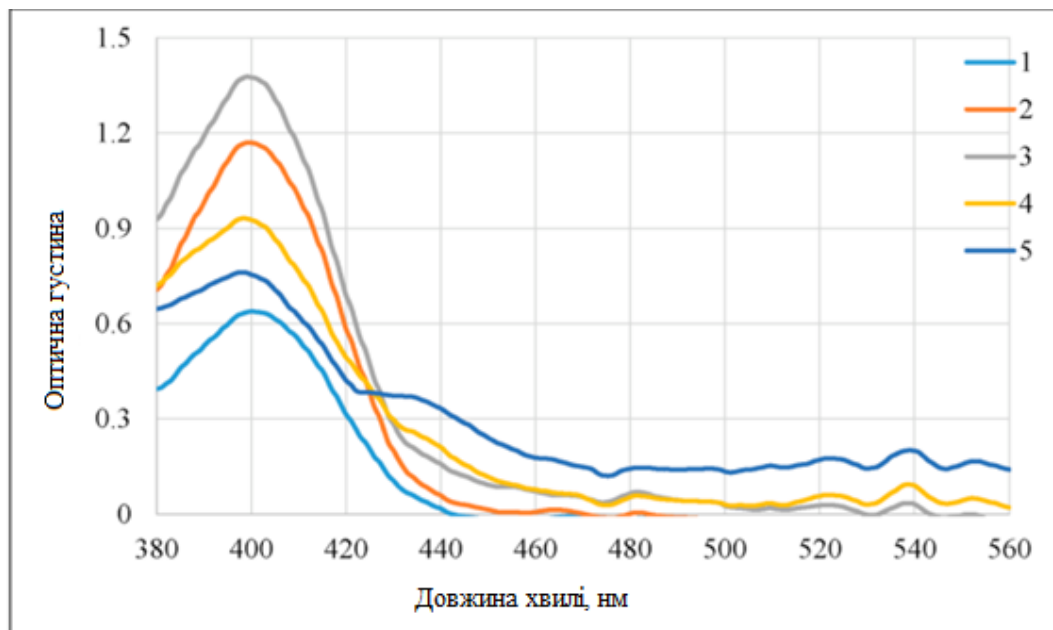


Рис. 5.1. Спектр поглинання зразків безклітинного дріжджового екстракту *S. cerevisiae* 71В з додаванням до дріжджів на початку культивування: 1 – стерильної dH_2O (контроль), 2 – 0,5 мМ AgNO_3 , 3 – 1,0 мМ AgNO_3 , 4 – 1,5 мМ AgNO_3 , 5 – 2,0 мМ AgNO_3

Результати спектроскопічних досліджень зразків супернатанту (перший розчин наночасток) представлено на рисунку нижче (рис. 5.2). Цікавим фактом виявилось те, що рівні оптичного поглинання зразків у цьому дослідженні були значно вищими, ніж у дослідженні зразків дріжджового екстракту (рис. 5.1). Знову ж таки, найвищі піки були показані в зразках, де використовувалися концентрації нітрату срібла 0,5 мМ і 1,0 мМ. У цих зразках значення оптичної густини становили 9,88 і 8,52 відповідно, що на 1,8 і 1,7 було вище, ніж у контрольному зразку. Крім того, слід зазначити, що значення оптичної густини зразків, до яких було додано нітрат срібла в концентраціях 1,5 мМ та 2,0 мМ, були нижчими від контрольного зразка.

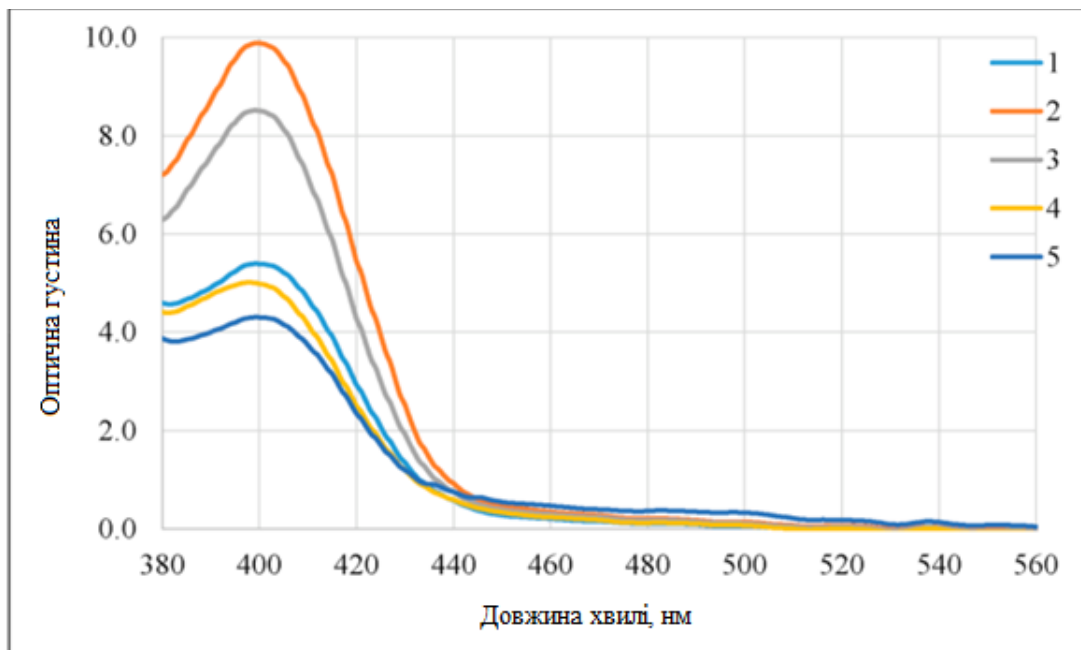


Рис. 5.2. Спектр поглинання зразків супернатанту *S. cerevisiae* 71B з додаванням до дріжджів на початку культивування: 1 – стерильної dH₂O (контроль), 2 – 0,5 мМ AgNO₃, 3 – 1,0 мМ AgNO₃, 4 – 1,5 мМ AgNO₃, 5 – 2,0 мМ AgNO₃

Значення оптичної густини в піках порівнювали у зразках, які виділено з культур дріжджів, культивування яких проходило у присутності нітрату срібла в концентраціях 0,5 мМ та 1,0 мМ. Оптична густина супернатанту була у 8,5 разів

вищою для концентрації 0,5 мМ і в 6,2 рази вищою для концентрації 1,0 мМ. Отримані дані показали, що супернатант (перший розчин наночасток) містить більшу кількість AgNPs, ніж дріжджовий екстракт (другий розчин наночасток). Крім того, було виявлено, що найбільш ефективні концентрації нітрату срібла для біосинтезу AgNPs становлять 0,5 мМ і 1,0 мМ.

Результати досліджень спектрів зразків корелюють з численними дослідженнями біосинтезу наночасток срібла. Наприклад, AgNPs, отримані шляхом біосинтезу з використанням дріжджового екстракту як відновника, мали пік поглинання 400 нм (Shu et al., 2020). В іншому дослідженні наночастки були отримані з екстракту *Rumex hymenosepalus* – рослини, широко розповсюдженої на територіях Північної Америки. Пік поглинання цих наночасток складав 425 нм, що відповідає поглинанню поверхневого плазмонного резонансу наночасток срібла (Rodríguez-León et al., 2013). В іншій роботі описано синтез AgNPs дріжджовим штамом *Saccharomyces* sp. BDU-XR1, який був виділений з йогурту, що його споживають в Азербайджані. Пік спектру поглинання наночасток виявлено в діапазоні 410-420 нм на УФ спектрофотометрі (Jafarov, Ramazanov, Agamaliyev & Eyvazova, 2017). Таким чином, порівнюючи дані літературних джерел з отриманими нами результатами, можна зробити висновок, що отримані супернатанти та дріжджові екстракти містили наночастки срібла. При цьому встановлено, що у супернатанті *S. cerevisiae* 71В (перший розчин наночасток) містилась більша кількість біосинтезованих наночасток срібла, ніж у дріжджовому екстракті (другий розчин наночасток).

5.2. Визначення концентрації іонів срібла

Використовуючи методику, яку наведено у розділі 3 (підрозділ 3.8), ми визначали концентрацію іонів срібла в кожному із зразків (перший та другий розчин наночасток, підпункт 3.4.2). Зведені результати представлені в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1. Кінцева концентрація іонів срібла у досліджуваному розчині

| Концентрація іонів срібла, мМ | | | | | |
|---|------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| AgNO ₃ , мМ** | dH ₂ O | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 |
| Супернатант (перший розчин наночасток) | -0,01 [-0,01; 0,00] | 0,03 [0,01; 0,03] | 0,05 [0,03; 0,06] | 0,04 [0,03; 0,08]* | 0,11 [0,11; 0,14]* |
| Дріжджовий екстракт (другий розчин наночасток) | 0,01 [0,01; 0,01] | 0,02 [0,02; 0,03] | 0,04 [0,04; 0,04] | 0,07 [0,06; 0,10]* | 0,16 [0,15; 0,17]* |

* $p < 0,05$. **концентрація AgNO₃ що була додана до *S. cerevisiae* 71В на початку культивування

Представлені у таблиці результати було перевірено на ймовірність за допомогою тесту Вілкоксона. Встановлено, що концентрація іонів срібла у зразках дріжджового екстракту (другий розчин наночасток) та супернатанту (перший розчин наночасток) при внесенні на початку культивування дріжджів 0,5 мМ AgNO₃ достовірно не відрізнялася ($p = 0,77$), тобто як дріжджовий екстракт, так і супернатант містили однакову кількість іонів срібла. Подібна ситуація спостерігається і у зразках, де вносили концентрацію AgNO₃ 1,0 мМ. Однак у цьому випадку не було істотної різниці між концентрацією іонів срібла в супернатанті та дріжджовому екстракті, оскільки $p = 0,07$. У зразках, де застосовували концентрації AgNO₃ 1,5 мМ і 2,0 мМ, були вищі концентрації іонів срібла в дріжджовому екстракті, ніж у супернатанті ($p = 0,01$ і $p = 0,03$ відповідно): у 1,75 [1,33; 3,33] та у 1,45 [1,07; 1,55] рази вище відповідно.

Отримані результати показали, що при концентраціях 0,5 мМ і 1,0 мМ не було різниці в накопиченні іонів срібла в різних типах зразків дріжджового екстракту та супернатанту. Лише при високих концентраціях (1,5 мМ і 2,0 мМ) можна було спостерігати істотну різницю.

5.3. Антибактеріальна дія

Для встановлення антибактеріальних властивостей досліджуваних розчинів біосинтезованих AgNPs, проводили інкубування бактеріальних тест-культур з досліджуваними зразками (перший і другий розчин наночасток). Після

24 год інкубації бактеріальних тест-культур із зразками дріжджового екстракту (другий розчин наночасток) спостерігали достовірне зниження метаболічної активності клітин *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 1536 та *K. pneumoniae* 520 для розчинів наночасток, для біосинтезу яких на початку культивування до дріжджів додавали нітрат срібла у кінцевій концентрації 1,0 мМ, 1,5 мМ і 2,0 мМ. Зниження метаболічної активності клітин *E. coli* ATCC 25922 спостерігали лише у двох концентраціях: внесення нітрату срібла до дріжджів на початку культивування у концентрації 1,5 мМ та 2,0 мМ (рис. 5.3).

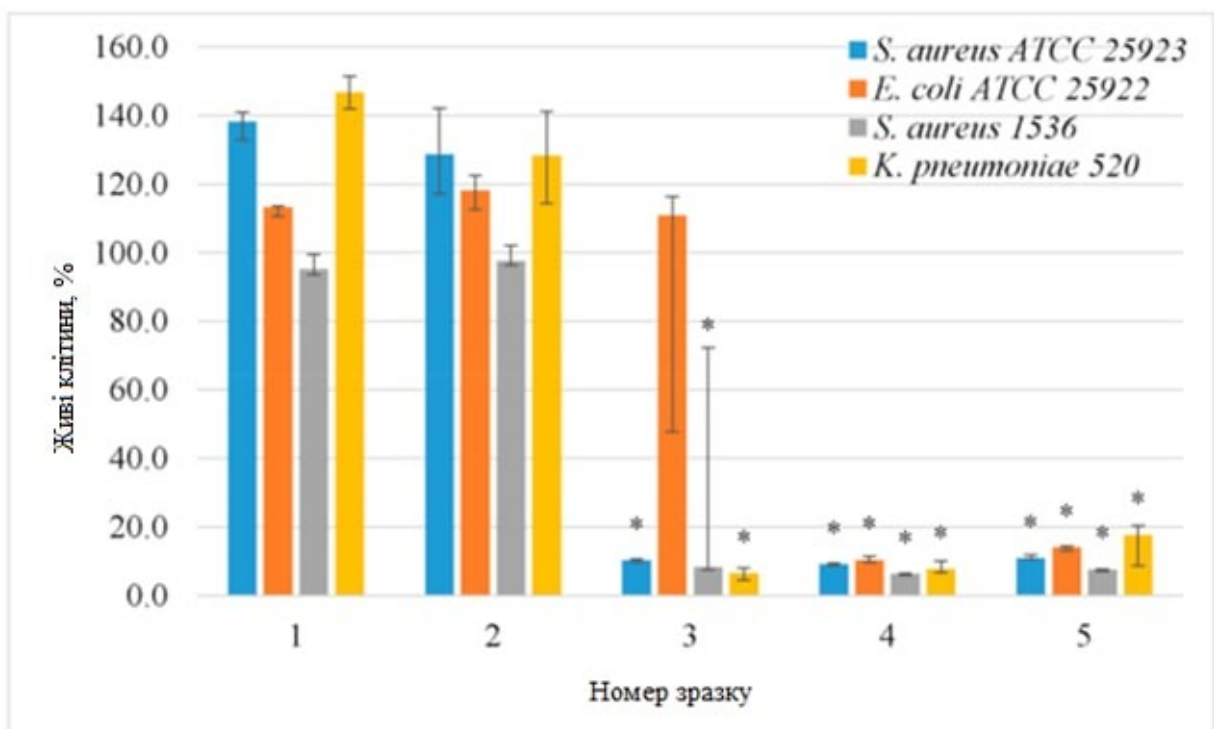


Рис. 5.3. Антибактеріальна дія наночасток срібла у безклітинному екстракті дріжджів за МТТ-тестом (до дріжджів на початку культивування додавали:

1 – стерильну dH₂O (контроль), 2 – 0,5 мМ AgNO₃, 3 – 1,0 мМ AgNO₃,
4 – 1,5 мМ AgNO₃, 5 – 2,0 мМ AgNO₃. * p < 0,05)

Середня життєздатність досліджуваних бактеріальних тест-культур при додаванні дріжджового екстракту, отриманого із зразків 4 і 5 (рис. 5.3) становила близько 10 %. Цікавий факт, що відбулося різке зниження метаболічної

активності усіх тест-культур без плавного переходу. Крім того, слід зазначити, що антибактеріальна дія наночастинок срібла у дріжджовому екстракті була ефективнішою по відношенню до клінічних ізолятів – *S. aureus* 1536 та *K. pneumoniae* 520, що є позитивним результатом.

При вивченні антибактеріальної дії AgNPs у супернатанті (перший розчин наночастинок) було встановлено цікавий факт. При додаванні до бактеріальних тест-культур зразків супернатанту, отриманих з культуральної рідини дріжджів, в яку вносили 0,5 мМ AgNO₃, спостерігали значне підвищення метаболічної активності патогенних штамів після 24 годин інкубації (рис. 5.4). При цьому спостерігали високу антибактеріальну дію при додаванні до бактеріальних тест-культур розчинів наночастинок, отриманих при внесенні нітрату срібла на початку культивування дріжджів *S. cerevisiae* 71В у концентраціях в концентраціях 1,0 мМ, 1,5 мМ та 2,0 мМ.

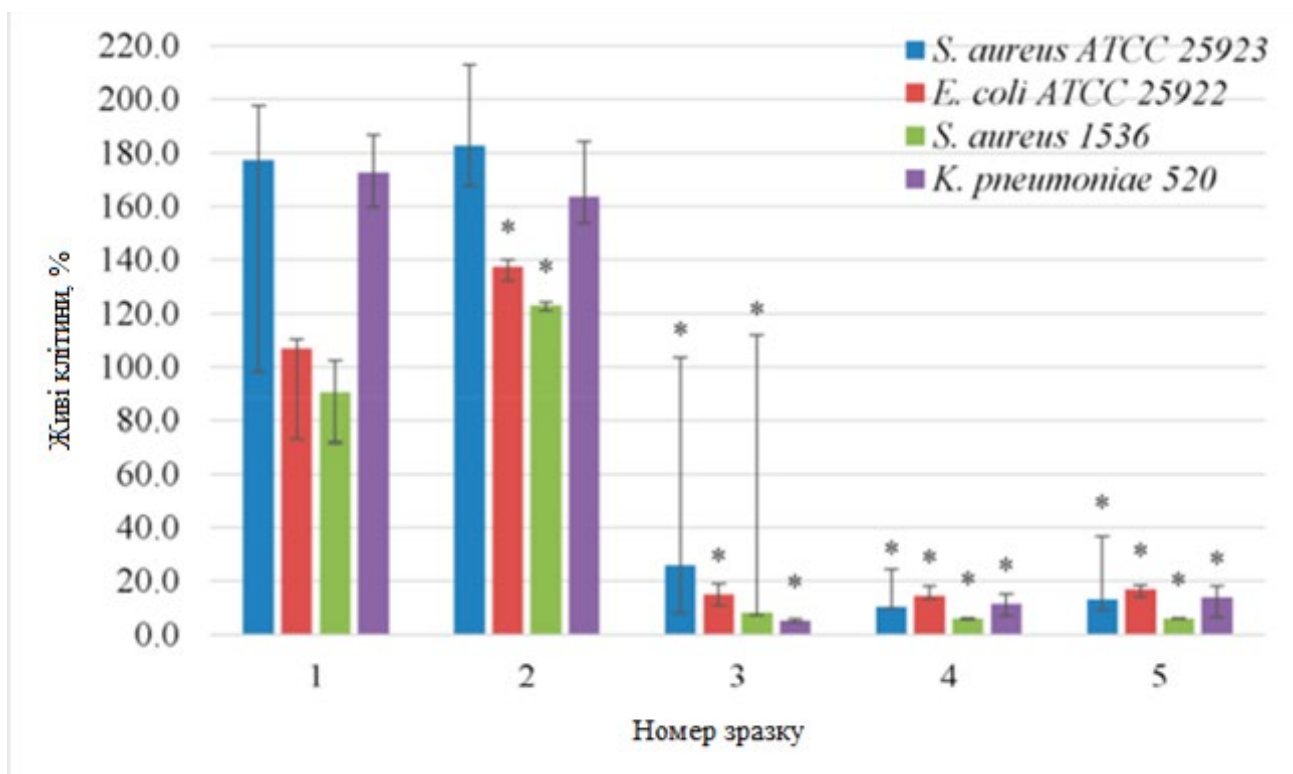


Рис. 5.4. Антибактеріальна дія наночастинок срібла у супернатанті за МТТ-тестом (до дріжджів на початку культивування додавали: 1 – стерильну dH₂O (контроль), 2 – 0,5 мМ AgNO₃, 3 – 1,0 мМ AgNO₃, 4 – 1,5 мМ AgNO₃, 5 – 2,0 мМ AgNO₃. * p < 0,05)

Для визначення МІК розчинів наночастинок срібла (табл. 5.2) використовували усереднені дані щодо антибактеріальної активності, а за якісно-кількісною реакцією (розділ 3, підрозділ 3.8) визначали кінцеві концентрації наночастинок срібла у зразках.

Таблиця 5.2. Мінімальна інгібуюча концентрація розчинів наночастинок срібла за МТТ-тестом

| Референтні штами | | Клінічні ізоляти | |
|--|---------------------------|-----------------------|--------------------------|
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>S. aureus</i> 1536 | <i>K. pneumoniae</i> 520 |
| МІК наночастинок у супернатанті (перший розчин наночастинок), мМ | | | |
| 0,03 | менше 0,02 | менше 0,02 | 0,03 |
| МІК наночастинок у дріжджовому екстракті (другий розчин наночастинок), мМ | | | |
| 0,02 | 0,04 | 0,02 | 0,02 |

Встановлено, що найменша концентрація іонів срібла була достатньою для прояву ефективної антибактеріальної дії, незважаючи на те, що в попередніх дослідках між зразками була виявлена значна різниця. Це вказує на те, що може бути певний вплив умов експерименту, а саме концентрації розчину нітрату срібла, доданого на початку дослідження. Слід зазначити, що проти клінічних штамів *S. aureus* 1536 та *K. pneumoniae* 520 наночастки срібла мали антибактеріальну активність у нижчих концентраціях, ніж щодо тест-культур *S. aureus* ATCC 25923 та *E. coli* ATCC 25922.

При дослідженні антибактеріальної дії AgNPs у дріжджовому екстракті, можна зробити висновки про те, що наночастки мають меншу антибактеріальну активність порівняно з тими що у супернатанті. Це можна пояснити тим, що склад дріжджового екстракту та супернатанту різний, що може вплинути на стабілізацію наночастинок. Крім того, є літературні дані, у яких автори вказують на залежність властивостей наночастинок срібла від того, який ресурс використовується для синтезу наночастинок. Наприклад, визначається тип антибактеріальної дії – бактеріостатична чи бактерицидна (Daphne, Francis, Mohanty Ojha & Das, 2018). Це безпосередньо залежить від типу використовуваних кепуючих і стабілізуючих речовин в біоб'єкті. Описано

багато варіантів біосинтезу наночастинок срібла – водорості або рослини або їх екстракти, клітинні лінії гетеротрофних еукаріот і численні прокариоти. Форма, ступінь дисперсності отриманих колоїдів, а також біологічні властивості та їх прояв можуть варіюватися від одного зеленого підходу синтезу наночастинок до іншого (Narayanan & Sakthivel, 2011; Poulouse, Panda, Nair & Theodore, 2014).

Хоча біологічні речовини, що використовуються для синтезу наноматеріалів, складаються з подібних або ідентичних активних інгредієнтів, дуже часто вплив отриманих наночастинок, особливо на живі клітини, може істотно відрізнитися (Rónavári et al., 2017). Залежно від умов культивування, значення рН, складу середовища та температури при використанні дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* до складу стабілізаторів можуть входити етанол і феноли, карбонові кислоти та ароматичні аміни. Оскільки описані наночастки показали антибактеріальну активність проти *Staphylococcus aureus*, можна припустити, що в цьому дослідженні саме вказані сполуки зіграли роль у стабілізації частинок (Olobayotan & Akin-Osanaiye, 2019). Це також може пояснити різницю в антибактеріальній дії наночастинок в дріжджовому екстракті та супернатанті.

5.4. Антиадгезивна активність

Дослідження антиадгезивної активності розчинів AgNPs отриманих двома способами (розділ 3, підпункт 3.4.2) проводили так як описано у розділі 3 (підпункт 3.9.2). Аналізуючи результати, отримані при використанні розчину наночастинок у дріжджовому екстракті (другий розчин наночастинок) для дослідження їх антиадгезивної активності при використанні клінічного штаму *K. pneumoniae* 520, бачимо, що отримані дані фактично не відрізняються від контролю (рис. 5.5). У зразку з 0,5 мМ AgNO₃ спостерігалось незначне зменшення кількості адгезованих клітин у порівнянні з контролем, але це значення все ще було в межах 97%. Це означає, що отримані зразки наночастинок срібла могли знижувати метаболічну активність *K. pneumoniae* 520, але відсоток адгезованих клітин залишався високим. У цьому випадку використання такого

колоїдного розчину не можна назвати ефективним проти штаму *K. pneumoniae* 520. Цей же зразок з наночастками срібла не показав антиадгезивної дії по відношенню до клітин *S. aureus* ATCC 25923. Проте при дослідженні дріжджових екстрактів за внесення нітрату срібла на початку культивування *S. cerevisiae* 71В у більших концентраціях (1,0 мМ, 1,5 мМ і 2,0 мМ) ми спостерігали їх ефективну дію на ступінь адгезії *S. aureus* ATCC 25923 (рис. 5.5).

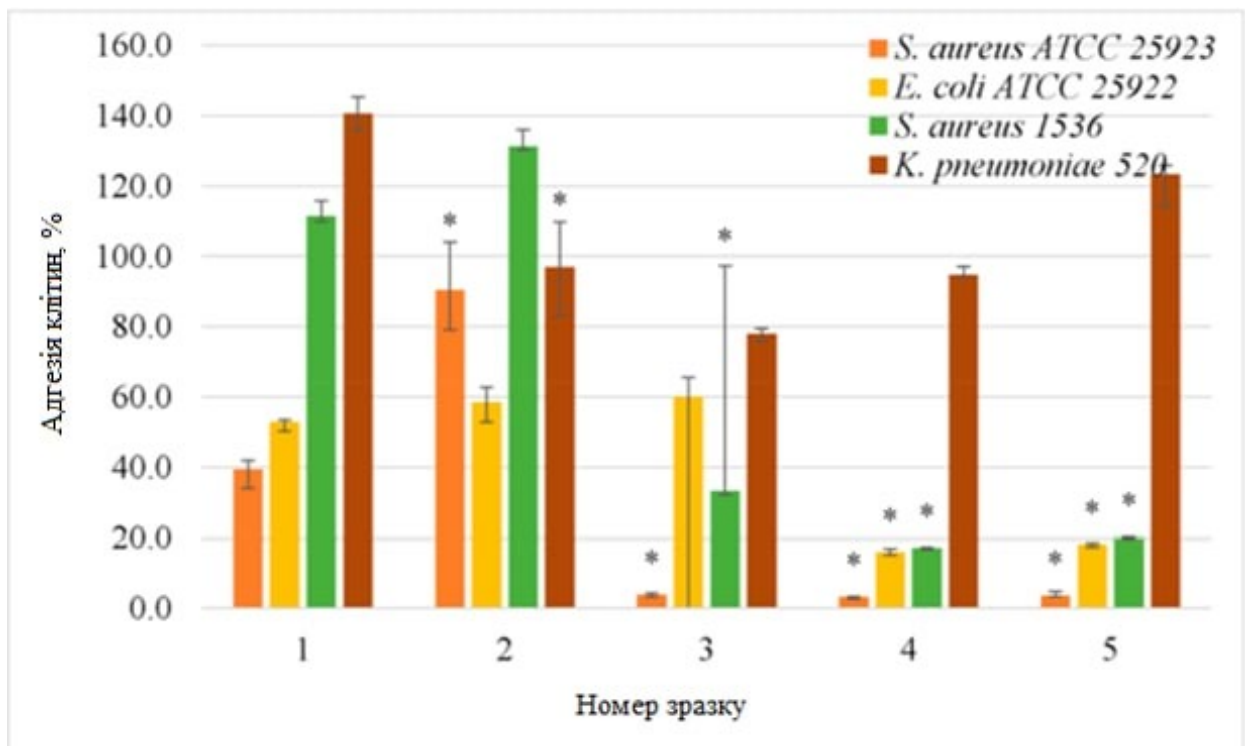


Рис. 5.5. Антиадгезивна активність наночасток срібла у безклітинному

екстракті дріжджів (до дріжджів на початку культивування додавали:

1 – стерильну dH₂O (контроль), 2 – 0,5 мМ AgNO₃, 3 – 1,0 мМ AgNO₃,

4 – 1,5 мМ AgNO₃, 5 – 2,0 мМ AgNO₃. * p < 0,05)

Антиадгезивна дія AgNPs у супернатанті (перший розчин наночасток) була вищою, ніж при використанні наночасток срібла у дріжджовому екстракті (другий розчин наночасток). Ми спостерігали зниження адгезії клітин *K. pneumoniae* 520 при дослідженні усіх зразків наночасток у супернатанті дріжджів. Порівняно з результатами метаболічної активності, найбільш ефективними були зразки, які отримали при внесенні на початку культивування

S. cerevisiae 71В нітрату срібла у концентрації 1,0 мМ, 1,5 мМ і 2,0 мМ AgNO₃ (рис. 5.6). Ці зразки наночастинок ефективно знижували адгезію клітин *S. aureus* 1536 і *S. aureus* ATCC 25923, що корелювало з результатами антимікробної активності (рис. 5.4). Щодо клітин *E. coli* ATCC 25922, то вони втрачали здатність до прикріплення лише при використанні зразків з додаванням 1,5 мМ та 2,0 мМ AgNO₃, тоді як у зразку з використанням 1,0 мМ AgNO₃ виявлено зниження метаболічної активності (рис. 5.6).

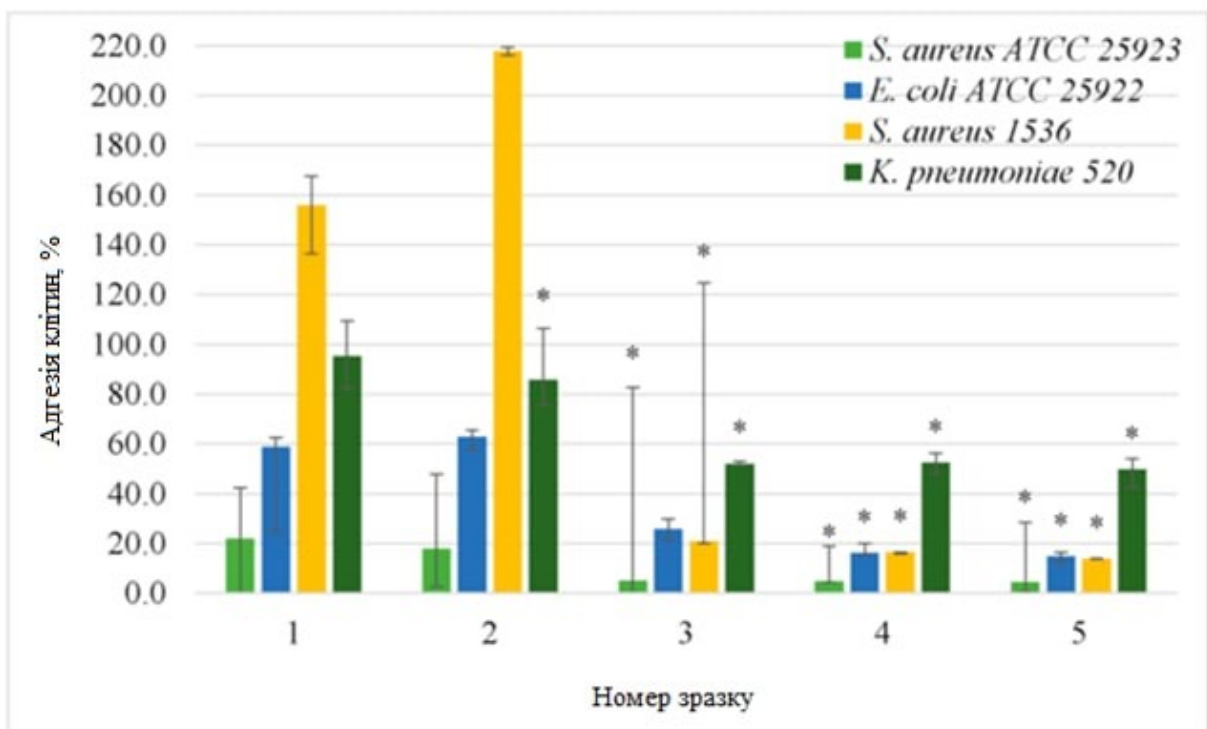


Рис. 5.6. Антиадгезивна активність наночастинок срібла у супернатанті (до дріжджів на початку культивування додавали: 1 – стерильну dH₂O (контроль), 2 – 0,5 мМ AgNO₃, 3 – 1,0 мМ AgNO₃, 4 – 1,5 мМ AgNO₃, 5 – 2,0 мМ AgNO₃. * p < 0,05)

Біогенний синтез AgNPs здійснюється при використанні різних біологічних об'єктів. При цьому діапазон їх антибактеріальної активності є досить подібним для наночастинок, які були отримані зеленим синтезом. Наприклад, AgNPs, синтезовані з використанням екстракту насіння *Pimpinella anisum*, мали антимікробну дію проти *Staphylococcus pyogenes*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* та *Pseudomonas aeruginosa*

(Alsalmi et al., 2016). В іншому дослідженні описано біогенний синтез AgNPs з використанням комерційного екстракту зеленого чаю (*Camellia sinensis*). Синтезовані наночастки мали антибактеріальну активність щодо *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Escherichia coli* та *Salmonella enterica* (Rolim et al., 2019).

Також була описана спроба використати водний екстракт шкірки граната (*Punica granatum*) як модель для синтезу AgNPs, причому синтезовані наночастинки виявляли високу антимікробну активність щодо *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*. та *K. pneumonia* (Devanesan et al., 2018). Наночастки, синтезовані при використанні *Pichia kudriavzevii* HA-NY2 та *Saccharomyces uvarum* HA-NY3, показали значну антимікробну активність проти *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* та *Candida tropicalis* (Ammar, El Aty & El Awdan, 2021).

Далі ми визначали МІК досліджуваних розчинів наночасток срібла з використанням спиртового розчину барвника кристалічного фіолетового (підпункт 3.9.2). Усереднені результати дослідження МІК представлені в таблиці 5.3.

Таблиця 5.3. Мінімальна інгібуюча концентрація розчинів наночасток срібла з використанням барвника кристалічного фіолетового

| Референтні штами | | Клінічні ізоляти | |
|---|---------------------------|-----------------------|--------------------------|
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>S. aureus</i> 1536 | <i>K. pneumoniae</i> 520 |
| МІК наночасток у супернатанті (перший розчин наночасток), мМ | | | |
| 0,05 | 0,04 | 0,04 | 0,03 |
| МІК наночасток у дріжджовому екстракті (другий розчин наночасток), мМ | | | |
| 0,04 | 0,07 | 0,04 | – |

Аналізуючи значення МІК з таблиці 5.3., можемо зробити висновок, що зразки AgNPs у супернатанті показали кращі результати відносно зразків наночасток у дріжджовому екстракті. Причому це збігається з результатами визначення МІК за МТТ-тестом. Порівнюючи результати, отримані в результаті двох досліджень антибактеріальної активності розчинів наночасток срібла у

супернатанті, ми виявили, що ефективні концентрації внесених наночасток срібла становили 0,04 мМ. Саме такі розчини AgNPs були ефективними проти *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* 1536 і *K. pneumoniae* 520.

Таким чином, результати представлені у даній роботі показують, що антибактеріальна активність корелює з результатами, описаними в інших дослідженнях. Крім того, це дослідження розширило інформацію про антибактеріальну дію наночасток срібла синтезованих з використанням дріжджів.

Висновки до розділу 5

Метою цього дослідження було продемонструвати біологічні властивості наночасток срібла, отриманих з використанням *Saccharomyces cerevisiae* 71В. Визначення або підтвердження фізико-хімічних властивостей наночастинок срібла та супернатанту в цьому контексті не було об'єктом дослідження. З цієї причини для підтвердження наявності у досліджуваних зразках наночасток ми обмежилися найпростішим методом – спектроскопією. У цьому дослідженні для отримання наночасток срібла використовували живу культуру дріжджів, з якої потім отримували дріжджовий екстракт і супернатант. З усіх концентрацій нітрату срібла, доданих для біосинтезу наночасток, найкращі результати були отримані при концентраціях 0,5 мМ і 1,0 мМ і підтверджені за допомогою спектрофотометричного методу. Крім того, це дослідження показало, що піки поглинання при 400 нм відповідають спектру поглинання наночасток срібла. Наночастки у супернатанті (перший розчин наночасток) мають вищу антибактеріальну активність, ніж наночастки в безклітинному екстракті *S. cerevisiae* 71В (перший розчин наночасток). Наночастки срібла, отримані шляхом зеленого синтезу, можуть бути використані як потенційні лікувальні сполуки від бактеріальних інфекцій, що викликаються небезпечними госпітальними штамами. Важливо відзначити, що наночастки у першу чергу є альтернативою антибіотикам. Проблема полягає в стійкості бактерій до

антибіотиків, а значить, потрібно шукати інші джерела препаратів з антибактеріальною дією.

Наукові результати даного розділу дисертації висвітлені у статті (Kharchenko et al., 2022).

ВИСНОВКИ

1. Встановлено можливість біосинтезу наночастинок срібла з використанням двох штамів хлібопекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* M437 і *Saccharomyces cerevisiae* 71В. При цьому показано синтез AgNPs у супернатанті та безклітинному водному екстракті *S. cerevisiae* M437 (нітрат срібла для біосинтезу наночастинок вносили безпосередньо у супернатант і безклітинний екстракт). Для штаму 71В показано, що синтез наночастинок срібла відбувається у культуральній рідині (для біосинтезу AgNPs нітрат срібла вносили на початку культивування *S. cerevisiae* 71В).

2. Показано безперервне зменшення іонів срібла та збільшення концентрації AgNPs, а також рівномірний розподіл наночастинок за розмірами при їх біосинтезі з використанням *S. cerevisiae* M437, що підтверджено спектроскопічним дослідженням в діапазоні довжин хвиль 200-700 нм. Пік поверхневого плазмонного резонансу при синтезі AgNPs у безклітинному екстракті спостерігали при 425 нм, а при синтезі у супернатанті – 400 нм. Для наночастинок отриманих з використанням супернатанту спостерігали розширення спектрів поглинання, що може бути пов'язано із агрегацією AgNPs.

3. Синтезовані з використанням супернатанту *S. cerevisiae* M437 AgNPs мали сферичну форму з діаметром близько 15 нм. PdI їх розчинів становив 0,3; дзета-потенціал -13,6. Після зберігання упродовж 45 діб при 4 °C значення PdI збільшилось в 1,6 разів, а дзета-потенціалу на 11,7 %. Це говорить про можливу зміну форми AgNPs, формування агломератів або інші процеси, які протікають у колоїдному розчині у процесі зберігання. Наночастки срібла, які були отримані при використанні безклітинного водного екстракту *S. cerevisiae* M437 мали овальну форму з розмірами 21,3×14,2 нм. Індекс полідисперсності розчину – 0,3, а дзета-потенціал – -13,7. Після зберігання спостерігали збільшення значення PdI лише в 1,3 рази та зменшення показника дзета-потенціалу на 29 %. Таким чином розчин наночастинок срібла, які були синтезовані з використанням безклітинного екстракту є більш стабільним після зберігання за вказаних вище умов.

4. При використанні дріжджів *S. cerevisiae* 71В нітрат срібла вносили на початку культивування і наночастки срібла були синтезовані у культуральній рідині. Після чого працювали з розчинами AgNPs у супернатанті та дріжджовому екстракті. Максимальне значення оптичної густини досліджуваних розчинів AgNPs в діапазоні довжин хвиль 380-560 нм спостерігали при 400 нм. Встановлено, що найбільш ефективні концентрації нітрату срібла для біосинтезу AgNPs становлять 0,5 мМ і 1,0 мМ: для наночасток у безклітинному екстракті спостерігали збільшення у порівнянні з контролем оптичної густини у піку поглинання на 90 % та 118 %, а для наночасток у супернатанті – на 95 % та 68 % відповідно.

5. Встановлено антимікробну активність AgNPs, отриманих з використанням *S. cerevisiae* 71В. Найбільш ефективними виявились розчини наночасток, отримані при внесенні 1,5 мМ та 2,0 мМ нітрату срібла на початку культивування дріжджів. Антибактеріальна дія по відношенню до референс-штамів *S. aureus* ATCC 25923 та *E. coli* ATCC 25922, а також клінічних ізолятів *S. aureus* 1536 та *K. pneumoniae* 520 при використанні розчину AgNPs у супернатанті була у 6-36, а у безклітинному екстракті у 9-21 разів більшою у порівнянні з контролем.

6. Показано антиадгезивну дію розчинів наночасток, що були отримані при використанні *S. cerevisiae* 71В. У діапазоні досліджуваних концентрацій нітрату срібла (0,5-2 мМ) для біосинтезу AgNPs високу антиадгезивну дію мали розчини наночасток, що були отримані при внесенні 1,5 мМ та 2,0 мМ нітрату на початку культивування *S. cerevisiae* 71В. Розчини наночасток срібла у супернатанті та безклітинному екстракті знижували адгезію *S. aureus* ATCC 25923 та *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* 1536 на 82-96 % та 80-97 % відповідно.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- Ağçeli, G. K., Hammachi, H., Kodal, S. P., Cihangir, N., & Aksu, Z. (2020). A novel approach to synthesize TiO₂ nanoparticles: Biosynthesis by using streptomyces sp. HC1. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 30(8), 3221-3229. doi: 10.1007/s10904-020-01486-w.
- Alamri, S.A., Hashem, M.A., Nafady, N.A., Sayed, M.A., Alshehri, A.A., El-Alshaboury, G.A. (2018). Controllable biogenic synthesis of intracellular silver/silver chloride nanoparticles by *Meyerozyma guilliermondii* KX008616. *J. Microbiol. Biotechnol*, 28 (6): 917–930. doi: 10.4014/jmb.1802.02010.
- Alsalmi, M. S., Devanesan, S., Alfuraydi, A. A., Vishnubalaji, R., Munusamy, M. A., Murugan, K., ... & Benelli, G. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Pimpinella anisum* seeds: antimicrobial activity and cytotoxicity on human neonatal skin stromal cells and colon cancer cells. *International journal of nanomedicine*, 11, 4439. doi: 10.2147/IJN.S113193.
- Amer, S.A., Abushady, H.M., Refay, R.M., & Mailam, M.A. (2021). Enhancement of the antibacterial potential of plantaricin by incorporation into silver nanoparticles, *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 19 (13), 1–16. doi: 10.1186/s43141-020-00093-z.
- Amini, S. M. (2019). Preparation of antimicrobial metallic nanoparticles with bioactive compounds. *Materials Science and Engineering: C*, 103, 109809. doi: 10.1016/j.msec.2019.109809.
- Ammar, H. A., El Aty, A. A. A., & El Awdan, S. A. (2021). Extracellular mycosynthesis of nano-silver using the fermentable yeasts *Pichia kudriavzevii* HA-NY2 and *Saccharomyces uvarum* HA-NY3, and their effective biomedical applications. *Bioprocess and biosystems engineering*, 44(4), 841-854. doi: 10.1007/s00449-020-02494-3.
- Apte, M., Sambre, D., Gaikawad, S., Joshi, S., Bankar, A., Kumar, A., & Zinjarde, S. (2013). Psychrotrophic yeast *Yarrowia lipolytica* NCYC 789 mediates the synthesis of antimicrobial silver nanoparticles via cell-associated melanin. *AMB Express*, 3(1), 32, 1–8. doi:10.1186/2191-0855-3-32.

- Badhusha, M. S. M., & Mohideen, M. M. A. K. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae* with different pH and study of antimicrobial activity against bacterial pathogens. *Chemical Science Transactions*, 5(4), 906-911. doi:10.3109/21691401.2014.937870.
- Bahrulolum, H., Nooraei, S., Javanshir, N., Tarrahimofrad, H., Mirbagheri, V.S., Easton, A.J. & Ahmadian, G. (2021). Green synthesis of metal nanoparticles using microorganisms and their application in the agrifood sector. *J. Nanobiotechnol*, 19, 86. doi: 10.1186/s12951-021-00834-3.
- Bhainsa, K. C., & D'souza, S. F. (2006). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 47(2), 160-164. doi: 10.1016/j.colsurfb.2005.11.026.
- Bocate, K.P., Reis, G.F., Souza, P.C., Admilton, G., Junior, O., Durán, N., ... & Panagio, L.A. (2019). Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. *International Journal of Food Microbiology*, 291, 79–86. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.012.
- Bolbanabad, E.M., Ashengroph, M., Darvishi, F. (2020). Development and evaluation of different strategies for the clean synthesis of silver nanoparticles using *Yarrowia lipolytica* and their antibacterial activity. *Process Biochemistry*, 94: 319–328. doi: 10.1016/j.procbio.2020.03.024.
- Brown, A.N., Smith, K., Samuels, T.A., Lu, J., Obare, S.O., & Scott M.E. (2012). Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 2768–2774. doi: 10.1128/AEM.06513-11.
- Castillo-Henriquez, L., Alfaro-Aguilar, K., Ugalde-Alvarez, J., Vega-Fernandez, L., Oca-Vasquez, G.M. & Vega-Baudrit, J.R. (2020). Green synthesis of gold and silver nanoparticles from plant extracts and their possible applications as antimicrobial agents in the agricultural area. *Nanomaterials*, 10, 1763. doi: 10.3390/nano10091763.

- Castro-Longoria, E., Moreno-Velasquez, S. D., Vilchis-Nestor, A. R., Arenas-Berumen, E., & Avalos-Borja, M. (2012). Production of platinum nanoparticles and nanoaggregates using *Neurospora crassa*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 22(7), 1000-1004. doi: 10.4014/jmb.1110.10085.
- Chandhru, M., Logesh, R., Rani, S.K., Ahmed, N., & Vasimalai, N. (2019). One-pot green route synthesis of silver nanoparticles from jack fruit seeds and their antibacterial activities with *Escherichia coli* and *Salmonella bacteria*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 20, 101241. doi: 10.1016/j.bcab.2019.101241.
- Chang, Y.C., Chen, D.H. (2009). Catalytic reduction of 4-nitrophenol by magnetically recoverable Au nanocatalyst. *Journal of hazardous materials*, 165: 664-669. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.10.034.
- Chauhan, R., Reddy, A., & Abraham, J. (2015). Biosynthesis of silver and zinc oxide nanoparticles using *Pichia fermentans* JA2 and their antimicrobial property. *Applied nanoscience*, 5(1), 63-71. doi: 10.1007/s13204-014-0292-7.
- Che, X., Yuan, R., Chai, Y., Li, J., Song, Z., & Wang, J. (2010). Amperometric immunosensor for the determination of α -1-fetoprotein based on multiwalled carbon nanotube–silver nanoparticle composite. *Journal of colloid and interface science*, 345(2), 174-180. doi: 10.1016/j.jcis.2010.01.033.
- Cheng, Z. Q., Li, Z. W., Xu, J. H., Yao, R., Li, Z. L., Liang, S., ... & Zhong, J. (2019). Morphology-controlled fabrication of large-scale dendritic silver nanostructures for catalysis and SERS applications. *Nanoscale Research Letters*, 14(1), 1-7. doi:10.1186/s11671-019-2923-0.
- Clarance, P., Luvankar, B., Sales, J., Khusro, A., Agastian, P., Tack, J. C., ... & Kim, H. J. (2020). Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using endophytic fungi *Fusarium solani* and its in-vitro anticancer and biomedical applications. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(2), 706-712. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.12.026.
- Corte, L., Casagrande Pierantoni, D., Tascini, C., Roscini, L., & Cardinali, G. (2019). Biofilm specific activity: a measure to quantify microbial biofilm. *Microorganisms*, 7(3), 73. doi: 10.3390/microorganisms7030073.

- Cunha, F. A., Cunha, M. D. C., da Frota, S. M., Mallmann, E. J., Freire, T. M., Costa, L. S., ... & Fachine, P. (2018). Biogenic synthesis of multifunctional silver nanoparticles from *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula mucilaginosa*: antifungal, catalytic and cytotoxicity activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *34*(9), 1-15. doi:10.1007/s11274-018-2514-8.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S. & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, *10*(2), 57. doi: 10.3390/pharmaceutics10020057.
- Daphne, J., Francis, A., Mohanty, R., Ojha, N., & Das, N. (2018). Green synthesis of antibacterial silver nanoparticles using yeast isolates and its characterization. *Res J Pharm Technol*, *11*(1), 83-92. doi: 10.5958/0974-360X.2018.00016.1.
- Das, V. L., Thomas, R., Varghese, R. T., Soniya, E. V., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2014). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS 11 isolated from industrialized area. *3 Biotech*, *4*(2), 121-126. doi: 10.1007/s13205-013-0130-8.
- Devanesan, S., AlSalhi, M. S., Balaji, R. V., Ranjitsingh, A. J. A., Ahamed, A., Alfuraydi, A. A., ... & Othman, A. H. (2018). Antimicrobial and cytotoxicity effects of synthesized silver nanoparticles from *Punica granatum* peel extract. *Nanoscale research letters*, *13*(1), 1-10. doi: 10.1186/s11671-018-2731-y.
- Dong, Z. Y., Narsing Rao, M. P., Xiao, M., Wang, H. F., Hozzein, W. N., Chen, W., & Li, W. J. (2017). Antibacterial activity of silver nanoparticles against *Staphylococcus warneri* synthesized using endophytic bacteria by photo-irradiation. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1090. doi: 10.3389/fmicb.2017.01090.
- Du, J., Hu, Z., Yu, Z., Li, H., Pan, J., Zhao, D., & Bai, Y. (2019). Antibacterial activity of a novel *Forsythia suspensa* fruit mediated green silver nanoparticles against food-borne pathogens and mechanisms investigation. *Mater. Sci. Eng.*, *102*, 247–253. doi: 10.1016/j.msec.2019.04.031.

- Elahian, F., Reisi, S., Shahidi, A., & Mirzaei, S. A. (2017). High-throughput bioaccumulation, biotransformation, and production of silver and selenium nanoparticles using genetically engineered *Pichia pastoris*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(3), 853-861. doi: 10.1016/j.nano.2016.10.009.
- Elengoe, A., & Hamdan, S. (2017). Evaluation of MCF-7 cell viability by LDH, trypan blue and crystal violet staining assays. *Malaysian Journal of Medical Research (MJMR)*, 1(3), 37-42. Retrieved from <https://ejournal.lucp.net/index.php/mjmr/article/view/266>
- El-Naggar, N. E. A., Hussein, M. H., & El-Sawah, A. A. (2017). Bio-fabrication of silver nanoparticles by phycocyanin, characterization, in vitro anticancer activity against breast cancer cell line and in vivo cytotoxicity. *Scientific reports*, 7(1), 1-20. doi: 10.1038/s41598-017-11121-3.
- Eswari, J. S., Dhagat, S., & Mishra, P. (2018). Biosurfactant assisted silver nanoparticle synthesis: A critical analysis of its drug design aspects. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 9(4), 045007. doi: 10.1088/2043-6254/aaec0e.
- Eugenio, M., Müller, N., Frases, S., Almeida-Paes, R., Lima, L. M. T., Lemgruber, L., ... & Sant'Anna, C. (2016). Yeast-derived biosynthesis of silver/silver chloride nanoparticles and their antiproliferative activity against bacteria. *Rsc Advances*, 6(12), 9893-9904. doi: 10.1039/C5RA22727E.
- Faramarzi, S., Anzabi, Y., & Jafarizadeh-Malmiri, H. (2020). Nanobiotechnology approach in intracellular selenium nanoparticle synthesis using *Saccharomyces cerevisiae* – fabrication and characterization. *Archives of microbiology*, 202(5), 1203-1209. doi: 10.1007/s00203-020-01831-0.
- Fay, M.P., Malinovsky, Y. (2017). Confidence intervals of the Mann-Whitney parameter that are compatible with the Wilcoxon-Mann-Whitney test. *Statistics in Medicine*. 37(27), 3991–4006, doi: 10.1002/sim.7890.
- Fernández, J. G., Fernández-Baldo, M. A., Berni, E., Camí, G., Durán, N., Raba, J., & Sanz, M. I. (2016). Production of silver nanoparticles using yeasts and evaluation

- of their antifungal activity against phytopathogenic fungi. *Process Biochemistry*, 51(9), 1306-1313. doi:10.1016/j.procbio.2016.05.021.
- Foujdar, R., Chopra, H. K., Bera, M. B., Chauhan, A. K., & Mahajan, P. (2021). Effect of probe ultrasonication, microwave and sunlight on biosynthesis, bioactivity and structural morphology of punica granatum peel's polyphenols-based silver nanoconjugates. *Waste and Biomass Valorization*, 12(5), 2283-2302. doi: 10.1007/s12649-020-01175-2.
- Galandáková, A., Franková, J., Ambrožová, N., Habartová, K., Pivodová, V., Zálešák, B., ... & Ulrichova, J. (2016). Effects of silver nanoparticles on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Human & Experimental Toxicology*, 35(9), 946-957. doi: 10.1177/0960327115611969.
- Gao, Y., Arokia Vijaya Anand, M., Ramachandran, V., Karthikkumar, V., Shalini, V., Vijayalakshmi, S., & Ernest, D. (2019). Biofabrication of zinc oxide nanoparticles from *Aspergillus niger*, their antioxidant, antimicrobial and anticancer activity. *Journal of Cluster Science*, 30(4), 937-946. doi: 10.1007/s10876-019-01551-6.
- Grasso, G., Zane, D., & Dragone, R. (2020). Microbial nanotechnology: challenges and prospects for green biocatalytic synthesis of nanoscale materials for sensoristic and biomedical applications. *Nanomaterials*, 10(1), 11. doi: 10.3390/nano10010011.
- 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.
- Halder, S., Ahmed, A.N., Gafur, M.A., Seong, G., & Hossain, M.Z. (2021). Size-controlled facile synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and analysis of their antibacterial performance. *ChemistrySelect*, 6 (36), 9714-9720. doi: 10.1002/slct.202101362.
- He, S., Li, D., Zhu, C., Song, S., Wang, L., Long, Y., & Fan, C. (2008). Design of a gold nanoprobe for rapid and portable mercury detection with the naked eye. *Chemical communications*, (40), 4885-4887. doi: 10.1039/b811528a.

- He, S., Zhang, Y., Guo, Z., & Gu, N. (2008). Biological synthesis of gold nanowires using extract of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Biotechnology Progress*, 24(2), 476-480. doi: 10.1021/bp0703174.
- Honary, S., Barabadi, H., Gharaei-Fathabad, E., & Naghibi, F. (2012). Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium citrinum* and *Penicillium waksmanii*. *Dig J Nanomater Bios*, 7(3), 999-1005. Retrieved from https://www.chalcogen.ro/999_Honary.pdf
- Huang, H., Shan, K., Liu, J., Tao, X., Periyasamy, S., Durairaj, S., ... & Jacob J.A. (2020). Synthesis, optimization and characterization of silver nanoparticles using the catkin extract of *Piper longum* for bactericidal effect against food-borne pathogens via conventional and mathematical approaches. *Bioorganic Chemistry*, 103, 104230. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104230.
- Iqtedar, M., Aslam, M., Akhyar, M., Shehzaad, A., Abdullah, R., & Kaleem, A. (2019). Extracellular biosynthesis, characterization, optimization of silver nanoparticles (AgNPs) using *Bacillus mojavensis* BTCB15 and its antimicrobial activity against multidrug resistant pathogens. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49(2), 136-142. doi: 10.1080/10826068.2018.1550654.
- Jafarov, M. M., Ramazanov, M. A., Agamaliyev, Z. A., & Eyvazova, G. M. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces* sp. strain BDU–XR1. *Environment*, 4(6), 11-13. doi:10.19221/201712.
- Jalal, M., Ansari, M. A., Alzohairy, M. A., Ali, S. G., Khan, H. M., Almatroudi, A., & Raees, K. (2018). Biosynthesis of silver nanoparticles from oropharyngeal *Candida glabrata* isolates and their antimicrobial activity against clinical strains of bacteria and fungi. *Nanomaterials*, 8(8), 586. doi: 10.3390/nano8080586.
- Jeremiah, S. S., Miyakawa, K., Morita, T., Yamaoka, Y., & Ryo, A. (2020). Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2. *Biochemical and biophysical research communications*, 533(1), 195-200. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.09.018.
- Johnston, C. W., Wyatt, M. A., Li, X., Ibrahim, A., Shuster, J., Southam, G., & Magarvey, N. A. (2013). Gold biomineralization by a metallophore from a gold-

- associated microbe. *Nature chemical biology*, 9(4), 241-243. doi: 10.1038/nchembio.1179.
- Kalimuthu, K., Babu, R. S., Venkataraman, D., Bilal, M., & Gurunathan, S. (2008). Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 65(1), 150-153. doi: 10.1016/j.colsurfb.2008.02.018.
- Kalpana, V. N., Kataru, B. A. S., Sravani, N., Vigneshwari, T., Panneerselvam, A., & Rajeswari, V. D. (2018). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using culture filtrates of *Aspergillus niger*: Antimicrobial textiles and dye degradation studies. *OpenNano*, 3, 48-55. doi: 10.1016/j.onano.2018.06.001.
- Kasithevar, M., Periakaruppan, P., Muthupandian, S., & Mohan, M. (2017). Antibacterial efficacy of silver nanoparticles against multi-drug resistant clinical isolates from post-surgical wound infections. *Microb. Pathog.*, 107, 327–334. doi: 10.1016/j.micpath.2017.04.013.
- Khan Nida, T. K., & Khan, M. J. (2017). Biogenic nanoparticles: an introduction to what they are and how they are produced. *Int J Biotech Bioeng*, 3, 66-70. doi:10.25141/2475-3432-2017-3.0066.
- Kharchenko, Y., Lastovetska, L., Maslak, V., Sidorenko, M., Vasylenko, V., & Shydlovska, O. (2022). Antibacterial Activity of Green Synthesised Silver Nanoparticles on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Sciences*, 12(7), 3466. doi: 10.3390/app12073466.
- Korbekandi, H., Mohseni, S., Mardani Jouneghani, R., Pourhossein, M., & Iravani, S. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae*. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(1), 235-239. doi: 10.3109/21691401.2014.937870.
- Korbekandi, H., Mohseni, S., Mardani Jouneghani, R., Pourhossein, M., & Iravani, S. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae*. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(1), 235-239. doi: 10.3109/21691401.2014.937870.
- Kowshik, M., Ashtaputre, S., Kharrazi, S., Vogel, W., Urban, J., Kulkarni, S. K., & Paknikar, K. M. (2002). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-

- tolerant yeast strain MKY3. *Nanotechnology*, 14(1), 95. doi: 10.1088/0957-4484/14/1/321/meta.
- Kthiri, A., Hamimed, S., Othmani, A., Landoulsi, A., O'Sullivan, S., & Sheehan, D. (2021). Novel static magnetic field effects on green chemistry biosynthesis of silver nanoparticles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 11(1), 1-9. doi: 10.1038/s41598-021-99487-3.
- Kumar, C.G., & Sujitha, P. (2014). Green synthesis of Kocuran-functionalized silver glyconanoparticles for use as antibiofilm coatings on silicone urethral catheters. *Nanotechnology*, 25, 325101. doi: 10.1088/0957-4484/25/32/325101.
- Kumar, D., Karthik, L., Kumar, G., & Roa, K. B. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles from marine yeast and their antimicrobial activity against multidrug resistant pathogens. *Pharmacologyonline*, 3, 1100-1111. Retrieved from <https://pharmacologyonline.silae.it/files/newsletter/2011/vol3/111.dinesh.pdf>
- Kumar, J.A., Krithiga, T., Manigandan, S., Sathish, S., Renita, A.A., Prakash, P., ... & Crispin, S. (2021). A focus to green synthesis of metal/metal based oxide nanoparticles: Various mechanisms and applications towards ecological approach. *Journal of Cleaner Production*, 324, 129198. doi: 10.1016/j.jclepro.2021.129198.
- Kumari, R. M., Kumar, V., Kumar, M., Pareek, N., & Nimesh, S. (2020). Assessment of antibacterial and anticancer capability of silver nanoparticles extracellularly biosynthesized using *Aspergillus terreus*. *Nano Express*, 1(3), 030011. doi: 10.1088/2632-959X/abc2e4.
- Kuppusamy, P., Ichwan, S. J., Al-Zikri, P. N. H., Suriyah, W. H., Soundharrajan, I., Govindan, N., ... & Yusoff, M. M. (2016). In vitro anticancer activity of Au, Ag nanoparticles synthesized using *Commelina nudiflora* L. aqueous extract against HCT-116 colon cancer cells. *Biological trace element research*, 173(2), 297-305. doi: 10.1007/s12011-016-0666-7.
- Lafta, A. K., Ajah, H. A., Dakhil, O. A. A., & AL-Wattar, W. M. A. (2019). Biosynthesis of silver nanoparticles using biomass of *Cladosporium cladosporioides* and antifungal activity against pathogenic fungi causing

- onychomycosis. *Plant Archives*, 19(2), 4391-4396. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Hamzia-Ali-2/publication/338490657_Biosynthesis_of_Silver_Nanoparticles_using_Biomass_of_Cladosporium_cladosporioides_and_antifungal_activity_against_pathogenic_fungi_causing_Onychomycosis/links/5e3e5035458515072d88d631/Biosynthesis-of-Silver-Nanoparticles-using-Biomass-of-Cladosporium-cladosporioides-and-antifungal-activity-against-pathogenic-fungi-causing-Onychomycosis.pdf
- Lekha, D.C., Shanmugam, R., Madhuri, K., Dwarampudi, L.P., Bhaskaran, M., Kongara, D., ..., & Krishnaraj, R. (2021). Review on silver nanoparticle synthesis method, antibacterial activity, drug delivery vehicles, and toxicity pathways: recent advances and future aspects. *Journal of Nanomaterials*, 2021, 4401829. doi: 10.1155/2021/4401829.
- Leo, B. F., Chen, S., Kyo, Y., Herpoldt, K. L., Terrill, N. J., Dunlop, I. E., ... & Ryan, M. P. (2013). The stability of silver nanoparticles in a model of pulmonary surfactant. *Environmental science & technology*, 47(19), 11232-11240. doi: 10.1021/es403377p.
- Lian, S., Diko, C. S., Yan, Y., Li, Z., Zhang, H., Ma, Q., & Qu, Y. (2019). Characterization of biogenic selenium nanoparticles derived from cell-free extracts of a novel yeast *Magnusiomyces ingens*. *3 Biotech*, 9(6), 1-8. doi: 10.1007/s13205-019-1748-y.
- Liu, X., Chen, J. L., Yang, W. Y., Qian, Y. C., Pan, J. Y., Zhu, C. N., ... & Zhang, D. P. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles with antimicrobial and anticancer properties using two novel yeasts. *Scientific Reports*, 11(1), 1-12. doi: 10.1038/s41598-021-95262-6.
- Mehrotra, N., Tripathi, R. M., Zafar, F., & Singh, M. P. (2017). Catalytic degradation of dichlorvos using biosynthesized zero valent iron nanoparticles. *IEEE transactions on nanobioscience*, 16(4), 280-286. doi: 10.1109/tnb.2017.2700232.
- Mishra, A., Tripathy, S. K., & Yun, S. I. (2011). Bio-synthesis of gold and silver nanoparticles from *Candida guilliermondii* and their antimicrobial effect against

- pathogenic bacteria. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, *11*(1), 243-248. doi: 10.1166/jnn.2011.3265.
- Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances*, *31*(2), 346-356. doi.: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.003.
- Mohd Yusof, H., Mohamad, R., Zaidan, U. H., & Rahman, A. (2019). Microbial synthesis of zinc oxide nanoparticles and their potential application as an antimicrobial agent and a feed supplement in animal industry: a review. *Journal of animal science and biotechnology*, *10*(1), 1-22. doi: 10.1186/s40104-019-0368-z.
- Molnár, Z., Bódai, V., Szakacs, G., Erdélyi, B., Fogarassy, Z., Sáfrán, G., ... & Lagzi, I. (2018). Green synthesis of gold nanoparticles by thermophilic filamentous fungi. *Scientific reports*, *8*(1), 1-12. doi: 10.1038/s41598-018-22112-3.
- Mourato, A., Gadanho, M., Lino, A. R., & Tenreiro, R. (2011). Biosynthesis of crystalline silver and nanoparticles by extremophilic yeasts. *Bioinorganic chemistry and applications*, *2011*, 1-8. doi:10.1155/2011/546074.
- Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S. R., Khan, M. I., ... & Kumar, R. (2001). Bioreduction of AuCl₄⁻ ions by the fungus, *Verticillium* sp. and surface trapping of the gold nanoparticles formed. *Angewandte Chemie International Edition*, *40*(19), 3585-3588. doi: 10.1002/1521-3773(20011001)40:19<3585::AID-ANIE3585>3.0.CO;2-K.
- Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2011). Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Advances in colloid and interface science*, *169*(2), 59-79. doi: 10.1016/j.cis.2011.08.004.
- Niknejad, F., Nabili, M., Ghazvini, R. D., & Moazeni, M. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles: advantages of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Current medical mycology*, *1*(3), 17. doi: 10.18869/acadpub.cmm.1.3.17.
- Noah, N. (2019). In Green synthesis: Characterization and application of silver and gold nanoparticles. A.K. Shukla & S. Iravani (Ed.), *Green Synthesis*,

Characterization and Applications of Nanoparticles (pp. 111 – 135). Amsterdam: Elsevier.

- Nowack, B., Krug, H. F., & Height, M. (2011). 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. *Environmental Science & Technology*, 45(4), 1177–1183. doi:10.1021/es103316q.
- Olobayotan, I., & Akin-Osanaiye, B. (2019). Biosynthesis of silver nanoparticles using baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* and its antibacterial activities. *Access Microbiology*, 1(1A), 526. doi: 10.1099/acmi.ac2019.po0316.
- Ortega, F. G., Fernández-Baldo, M. A., Fernández, J. G., Serrano, M. J., Sanz, M. I., Diaz-Mochon, J. J., ... & Raba, J. (2015). Study of antitumor activity in breast cell lines using silver nanoparticles produced by yeast. *International journal of nanomedicine*, 10, 2021. doi: 10.2147/IJN.S75835.
- Otari, S. V., Patil, R. M., Nadaf, N. H., Ghosh, S. J., & Pawar, S. H. (2012). Green biosynthesis of silver nanoparticles from an actinobacteria *Rhodococcus* sp. *Materials Letters*, 72, 92-94. doi: 10.1016/j.matlet.2011.12.109.
- Parikh, R. Y., Singh, S., Prasad, B. L. V., Patole, M. S., Sastry, M., & Shouche, Y. S. (2008). Extracellular synthesis of crystalline silver nanoparticles and molecular evidence of silver resistance from *Morganella* sp.: towards understanding biochemical synthesis mechanism. *ChemBioChem*, 9(9), 1415-1422. doi:10.1002/cbic.200700592.
- Pirog, T. P., Geichenko, B. S., & Zvarych, A. O. (2019). Post-harvest treatment of vegetables with exometabolites of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 to extend their shelf life. *Biotechnologia Acta*, 12(6), 46-55. doi: 10.15407/biotech12.06.046.
- Pirog, T. P., Lutsai, D. A., Antonuk, S. I., & Elperin, I. V. (2018). The properties of surfactants synthesized by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 on refined and sunflower oil waste. *Biotechnologia Acta*, 11(6), 82-91. doi: 10.15407/biotech11.06.082.

- Płaza, G. A., Chojniak, J., & Banat, I. M. (2014). Biosurfactant mediated biosynthesis of selected metallic nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(8), 13720-13737. doi: 10.3390/ijms150813720.
- Poulose, S., Panda, T., Nair, P. P., & Theodore, T. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, *14*(2), 2038-2049. doi: 10.1166/jnn.2014.9019.
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. In *Cell viability assays* (pp. 1-17). New York, NY: Humana Press.
- Pugazhenthiran, N., Anandan, S., Kathiravan, G., Udaya Prakash, N. K., Crawford, S., & Ashokkumar, M. (2009). Microbial synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus* sp. *Journal of Nanoparticle Research*, *11*(7), 1811-1815. doi: 10.1007/s11051-009-9621-2.
- Raghunandan, D., Ravishankar, B., Sharanbasava, G., Mahesh, D., Harsoor, V., Yalagatti, M. S., ... & Venkataraman, A. (2011). Anti-cancer studies of noble metal nanoparticles synthesized using different plant extracts. *Cancer nanotechnology*, *2*(1), 57-65. doi: 10.1007/s12645-011-0014-8.
- Rahimi, G., Alizadeh, F., & Khodavandi, A. (2016). Mycosynthesis of silver nanoparticles from *Candida albicans* and its antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *15*(2), 371-375. doi: 10.4314/tjpr.v15i2.21.
- Rajeshkumar, S. (2016). Green Synthesis of Different Sized Antimicrobial Silver Nanoparticles using Different Parts of Plants – A Review. *IJSR*, *9*(4), 197-208. Retrieved from [https://sphinxesai.com/2016/ch_vol9_no4/1/\(197-209\)V9N4CT.pdf](https://sphinxesai.com/2016/ch_vol9_no4/1/(197-209)V9N4CT.pdf)
- Ramanathan, R., Field, M. R., O'Mullane, A. P., Smooker, P. M., Bhargava, S. K., & Bansal, V. (2013). Aqueous phase synthesis of copper nanoparticles: a link between heavy metal resistance and nanoparticle synthesis ability in bacterial systems. *Nanoscale*, *5*(6), 2300-2306. doi: 10.1039/c2nr32887a.

- Reddy, N.V., Li, H., Hou, T., Bethu, M.S., Ren, Z., & Zhang, Z. (2021). Phytosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Perilla frutescens* Leaf Extract: Characterization and Evaluation of Antibacterial, Antioxidant, and Anticancer Activities. *International journal of nanomedicine*, 16, 15–29. doi: 10.2147/IJN.S265003.
- Riddin, T. L., Gericke, M., & Whiteley, C. G. (2006). Analysis of the inter-and extracellular formation of platinum nanoparticles by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using response surface methodology. *Nanotechnology*, 17(14), 3482–3489. doi: 10.1088/0957-4484/17/14/021.
- Rodríguez-León, E., Iñiguez-Palomares, R., Navarro, R. E., Herrera-Urbina, R., Tánori, J., Iñiguez-Palomares, C., & Maldonado, A. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts). *Nanoscale research letters*, 8(1), 1–9. doi: 10.1186/1556-276X-8-318.
- Rodríguez-Serrano, C., Guzmán-Moreno, J., Ángeles-Chávez, C., Rodríguez-González, V., Ortega-Sigala, J. J., Ramírez-Santoyo, R. M., & Vidales-Rodríguez, L. E. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles by *Fusarium scirpi* and its potential as antimicrobial agent against uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Plos one*, 15(3), e0230275. doi: 10.1371/journal.pone.0230275.
- Rolim, W. R., Pelegrino, M. T., de Araújo Lima, B., Ferraz, L. S., Costa, F. N., Bernardes, J. S., & Seabra, A. B. (2019). Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. *Applied Surface Science*, 463, 66–74. doi: 10.1016/j.apsusc.2018.08.203.
- Romero, M. R., & Picchio, M. L. (2020). Biosensors based on nanomaterials: transducers and modified surfaces for diagnostics. In *Nanobiomaterial Engineering* (pp. 15–47). Springer, Singapore. doi: 10.1007/978-981-32-9840-8_2
- Rónavári, A., Igaz, N., Gopisetty, M. K., Szerencsés, B., Kovács, D., Papp, C., & Pfeiffer, I. (2018). Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimycotics against opportunistic pathogenic yeasts and

- dermatophytes. *International journal of nanomedicine*, *13*, 695-703. doi: 10.2147/IJN.S152010.
- Rónavári, A., Kovács, D., Igaz, N., Vágvölgyi, C., Boros, I. M., Kónya, Z., ... & Kiricsi, M. (2017). Biological activity of green-synthesized silver nanoparticles depends on the applied natural extracts: a comprehensive study. *International journal of nanomedicine*, *12*, 871. doi: 10.2147/IJN.S122842.
- Rosman, N. S. R., Harun, N. A., Idris, I., & Ismail, W. I. W. (2020). Eco-friendly silver nanoparticles (AgNPs) fabricated by green synthesis using the crude extract of marine polychaete, *Marphysa moribidii*: biosynthesis, characterisation, and antibacterial applications. *Heliyon*, *6*(11), e05462. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05462
- Roy, K., Sarkar, C. K., & Ghosh, C. K. (2015). 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.
- Salvadori, M. R., Monezi, T. A., Mehnert, D. U., & Corrêa, B. (2019). Antimicrobial activity of Ag/Ag₂O nanoparticles synthesized by dead biomass of yeast and their biocompatibility with mammalian cell lines. *Inter J Res Stud Microbiol Biotech*, *5*, 2454-9428. doi: 10.20431/2454-9428.0501002.
- Sanghi, R., & Verma, P. (2009). Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles. *Bioresource technology*, *100*(1), 501-504. doi: 10.1016/j.biortech.2008.05.048.
- Saratale, R. G., Benelli, G., Kumar, G., Kim, D. S., & Saratale, G. D. (2018). Bio-fabrication of silver nanoparticles using the leaf extract of an ancient herbal medicine, dandelion (*Taraxacum officinale*), evaluation of their antioxidant, anticancer potential, and antimicrobial activity against phytopathogens. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(11), 10392-10406. doi: 10.1007/s11356-017-9581-5.
- Saravanan, M., Amelash, T., Negash, L., Gebreyesus, A., Selvaraj, A., Rayar, V., & Deekonda, K. (2013). Extracellular biosynthesis and biomedical application of silver nanoparticles synthesized from baker's yeast. *Int J Res Pharm Biomed*

- Sci*, 4, 822-828. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Arokiyaraj-Selvaraj/publication/255731508_Extracellular_Biosynthesis_and_Biomedical_Application_of_Silver_Nanoparticles_Synthesized_from_Baker's_Yeast/links/00b7d5209ba3f555fb000000/Extracellular-Biosynthesis-and-Biomedical-Application-of-Silver-Nanoparticles-Synthesized-from-Bakers-Yeast.pdf
- Schlüter, M., Hentzel, T., Suarez, C., Koch, M., Lorenz, W. G., Böhm, L., ... & Bunge, M. (2014). Synthesis of novel palladium (0) nanocatalysts by microorganisms from heavy-metal-influenced high-alpine sites for dehalogenation of polychlorinated dioxins. *Chemosphere*, 117, 462-470. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.07.030.
- Selvakumar, R., Jothi, N. A., Jayavignesh, V., Karthikaiselvi, K., Antony, G. I., Sharmila, P. R., ... & Swaminathan, K. (2011). As (V) removal using carbonized yeast cells containing silver nanoparticles. *Water research*, 45(2), 583-592. doi:10.1016/j.watres.2010.09.034.
- Shabbir, M., & Mohammad, F. (2018). Multifunctional AgNPs@ Wool: colored, UV-protective and antioxidant functional textiles. *Applied Nanoscience*, 8(3), 545-555. doi: 10.1007/s13204-018-0668-1.
- Shahverdi, A. R., Minaeian, S., Shahverdi, H. R., Jamalifar, H., & Nohi, A. A. (2007). Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: a novel biological approach. *Process Biochemistry*, 42(5), 919-923. doi: 10.1016/j.procbio.2007.02.005.
- Sharma, D., Kanchi, S., & Bisetty, K. (2019). Biogenic synthesis of nanoparticles: a review. *Arabian journal of chemistry*, 12(8), 3576-3600. doi: 10.1016/j.arabjc.2015.11.002.
- Shu, M., He, F., Li, Z., Zhu, X., Ma, Y., Zhou, Z., ... & Zeng, M. (2020). Biosynthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles using yeast extract as reducing and capping agents. *Nanoscale Research Letters*, 15(1), 1-9. doi: 10.1186/s11671-019-3244-z.
- Silvan, J.M., Zorraquin-Pena, I., Gonzalez, de L.D., Moreno-Arribas, M.V., & Martinez-Rodriguez, A.J. (2018). Antibacterial activity of glutathione-stabilized

- silver nanoparticles against *Campylobacter* multidrug-resistant strains. *Front. Microbiol.*, 9, 458. doi: 10.3389/fmicb.2018.00458.
- Singh, R., Wagh, P., Wadhwani, S., Gaidhani, S., Kumbhar, A., Bellare, J., & Chopade, B. A. (2013). Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *International journal of nanomedicine*, 8, 4277-4290. doi: 10.2147/IJN.S48913.
- Sintubin, L., De Windt, W., Dick, J., Mast, J., Van Der Ha, D., Verstraete, W., & Boon, N. (2009). Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(4), 741-749. doi: 10.1007/s00253-009-2032-6.
- Skalickova, S., Baron, M., & Sochor, J. (2017). Nanoparticles biosynthesized by yeast: a review of their application. *Kvasny Prumysl*, 63(6), 290-292. doi: 10.18832/kp201727.
- Skoglund, S., Blomberg, E., Wallinder, I. O., Grillo, I., Pedersen, J. S., & Bergström, L. M. (2017). A novel explanation for the enhanced colloidal stability of silver nanoparticles in the presence of an oppositely charged surfactant. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(41), 28037-28043. doi: 10.1039/C7CP04662F.
- Skóra, B., Krajewska, U., Nowak, A., Dziedzic, A., Barylyak, A., & Kus-Liśkiewicz, M. (2021). Noncytotoxic silver nanoparticles as a new antimicrobial strategy. *Scientific Reports*, 11(1), 1-13. doi: 10.1038/s41598-021-92812-w.
- Skrotska, O., Kharchenko, Y., Laziuka, Y., Marynin, A., & Kharchuk, M. (2021). Biosynthesis and characteristics of silver nanoparticles obtained using *Saccharomyces cerevisiae* M437. *Ukrainian Food Journal*, 10(3), 615-631. doi: 10.24263/2304-974X-2021-10-3-14.
- Søbjerg, L. S., Gauthier, D., Lindhardt, A. T., Bunge, M., Finster, K., Meyer, R. L., & Skrydstrup, T. (2009). Bio-supported palladium nanoparticles as a catalyst for Suzuki–Miyaura and Mizoroki–Heck reactions. *Green Chemistry*, 11(12), 2041-2046. doi:10.1039/b918351p.

- Soliman, H., Elsayed, A., & Dyaa, A. (2018). Antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesised by *Rhodotorula* sp. strain ATL72. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(3), 228-233. doi:10.1016/j.ejbas.2018.05.005.
- Soliman, H., Elsayed, A., & Dyaa, A. (2018). Antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesised by *Rhodotorula* sp. strain ATL72. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(3), 228-233. doi: 10.1016/j.ejbas.2018.05.005.
- Sowbarnika, R., Anhuradha, S., & Preetha, B. (2018). Enhanced antimicrobial effect of yeast mediated silver nanoparticles synthesized from baker's yeast. *International Journal of nanoscience and nanotechnology*, 14(1), 33-42. Retrieved from http://www.ijnnonline.net/&url=http://www.ijnnonline.net/article_30198_5a928826e833b98d8714a22246ea9268.pdf
- Syed, A., Saraswati, S., Kundu, G. C., & Ahmad, A. (2013). Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Humicola* sp. and evaluation of their cytotoxicity using normal and cancer cell lines. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 114, 144-147. doi: 10.1016/j.saa.2013.05.030.
- Taran, M., Rad, M., & Alavi, M. (2018). Biosynthesis of TiO₂ and ZnO nanoparticles by *Halomonas elongata* IBRC-M 10214 in different conditions of medium. *BioImpacts: BI*, 8(2), 81-89. doi: 10.15171/bi.2018.10.
- Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 6(2), 257-262. doi: 10.1016/j.nano.2009.07.002.
- Tripathi, R. M., & Chung, S. J. (2019). Biogenic nanomaterials: Synthesis, characterization, growth mechanism, and biomedical applications. *Journal of microbiological methods*, 157, 65-80. doi: 10.1016/j.mimet.2018.12.008.
- Vahabi, K., Mansoori, G. A., & Karimi, S. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles by fungus *Trichoderma reesei* (a route for large-scale production of AgNPs). *Insciences J.*, 1(1), 65-79. doi:10.5640/insc.010165.

- Vignesh, H., Vishnu, V., Balakumar, P., Raguram, T., & Rajni, K. S. (2019). Structural and magnetic properties of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles by sol-gel technique using yeast. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 577(1), 012092. doi:10.1088/1757-899X/577/1/012092.
- Wang, J., Bi, S., Chen, Y., & Hu, Y. (2020). Electron transfer involved in bio-Pd (0) synthesis by *Citrobacter freundii* at different growth phases. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110124. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.110124.
- Win, T. T., Khan, S., & Fu, P. (2020). Fungus-(*Alternaria* sp.) mediated silver nanoparticles synthesis, characterization, and screening of antifungal activity against some phytopathogens. *Journal of Nanotechnology*, 2020, 1-9. doi: 10.1155/2020/8828878.
- Worldwide, M. I. (2011). Dynamic light scattering, common terms defined. *Inform White Paper*. Malvern, UK: Malvern Instruments Limited, 1-6. Retrieved from <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/whitepapers/wp111214dlstermsdefined>
- Xue, B., He, D., Gao, S., Wang, D., Yokoyama, K., & Wang, L. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *International journal of nanomedicine*, 11, 1899-1909. doi: 10.2147/IJN.S98339.
- Yao, Y., Wang, D., Hu, J., & Yang, X. (2021). Tumor-targeting inorganic nanomaterials synthesized by living cells. *Nanoscale Advances*, 3(11), 2975-2994. doi: 10.1039/D1NA00155H.
- Zachar, O. (2020). Formulations for COVID-19 early stage treatment via silver nanoparticles inhalation delivery at home and hospital. *ScienceOpen Preprints*. doi: 10.14293/S2199-1006.1.
- Zahran, M. K., Mohamed, A. A., Mohamed, F. M., & El-Rafie, M. H. (2013). Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles by some yeast fungi. *Egypt J Chem*, 56(1), 91-110. doi: 10.21608/EJCHEM.2013.1078.
- Zamani, H., Jafari, A., Mousavi, S. M., & Darezereshki, E. (2020). Biosynthesis of silica nanoparticle using *Saccharomyces cerevisiae* and its application on enhanced

- oil recovery. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 190, 107002. doi: 10.1016/j.petrol.2020.107002.
- Zhang, J., & Zhao, H. (2009). Surfactant based synthesis of metal nanosystems. *Recent Advances in Nanoscience and Technology*, 12-24. doi: 10.1186/s11671-019-2923-0.
- Пирог, Т. П., Савенко, И. В., & Шевчук, Т. А. (2016). Влияние Zn^{2+} на синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 с антимикробными и антиадгезивными свойствами. *Мікробіологічний журнал*, 78(4), 48-58. Retrieved from https://web.archive.org/web/20190430202327id_/http://microbiolj.org.ua/images/files/magazine/2016/4/2016_78_4_05_Pirog.pdf
- Скροцька, О., Лазюка, Ю., & Харченко, Є. (2022). Наночастки срібла та золота: практичне застосування, біосинтез з використанням дріжджів, біологічна активність. *Наукові праці НУХТ*, 28 (1), 18-31. doi: 10.24263/2225-2924-2022-28-1-4.
- Харченко, Є., Лазюка, Ю., Скροцька, О., & Пенчук, Ю. (2021). Отримання біогенних наночасток срібла з використанням дріжджів і перспективи їх застосування у протимікробній терапії. *Наукові праці НУХТ*, 27 (3), 32-42. doi: 10.24263/2225-2924-2021-27-3-6.
- Харченко, Є. В., & Скροцька, О. І. (2020). Використання мікроорганізмів для біогенного синтезу наночасток. *Наукові праці НУХТ*, 26(2): 57–70. doi: 10.24263/2225-2924-2020-26-2-6.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А. Акти апробації результатів дисертації у навчальний процес

Міністерство освіти і науки України
Національний університет харчових технологій

ЗАТВЕРДЖУЮ:
Проректор з наукової роботи
Сергій ТОКАРЧУК



2022 р.

АКТ

впровадження результатів науково-дослідних, дослідно-конструкторських і дисертаційних робіт у навчальний процес вищих навчальних закладів

Замовник Національний університет харчових технологій в особі проректора з наукової роботи ТОКАРЧУКА Сергія, який діє на підставі наказу № 135 від 27.09.21 р.

Дійсним актом підтверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Використання дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для одержання наночасток срібла», що виконувалась згідно плану науково-дослідної роботи кафедри біотехнології і мікробіології «Біотехнологічний потенціал мікроорганізмів природних та техногенних екосистем (2019-2023 рр., № державної реєстрації 0119U001485).

виконаної на кафедрі біотехнології і мікробіології

(найменування кафедри)

виконуваної з 2019 по 2022

(термін виконання)

впроваджені у навчальний процес кафедри біотехнології і мікробіології

1. Вид впроваджених результатів: Спосіб отримання наночасток срібла з використанням дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* M437. При цьому нітрат срібла для біосинтезу наночасток вносять безпосередньо у супернатант і безклітинний дріжджовий екстракт.

2. Форма впровадження: лекційні, практичні та лабораторні заняття, курсове та дипломне проектування.

3. Новизна результатів науково-дослідних робіт: Встановлено, що при використанні дріжджів *S. cerevisiae* M437 можна здійснювати біосинтез наночасток срібла (AgNPs). При цьому AgNPs синтезувались у супернатанті культуральної рідини та безклітинному водному екстракті *S. cerevisiae* M437. Виявлено, що при використанні супернатанту культуральної рідини *S. cerevisiae* M437 синтезуються AgNPs сферичної форми (середній діаметр

15,6 нм), а при використанні безклітинного екстракту *S. cerevisiae* M437 – овальної (середні розміри 21,3×14,2 нм). Показано різницю у розмірах AgNPs при використанні різних методів дослідження (Zetasizer Nano ZS і TEM). Визначені розміри наночасток, що синтезувались з використанням безклітинного водного екстракту *S. cerevisiae* M437 при використанні TEM були в середньому на 75 % менші за значення отримані з використанням Zetasizer Nano ZS.

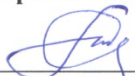
4. Перелік курсів і дисциплін, у рамках яких викладені результати НДР:

Модулі навчальних дисциплін «Мікробні технології наночасток благородних металів» для підготовки докторів філософії за спеціальністю 162 «Біотехнології і біоінженерія» та «Нанобіотехнологія» для підготовки магістрів за спеціальністю 162 «Біотехнології і біоінженерія».

5. Соціальний і науково-технічний ефект:

Отримано наночастки срібла біогенним, екологічно чистим способом. Встановлено стабільність розчинів наночасток отриманих з використанням безклітинного екстракту *S. cerevisiae* M437 при зберіганні упродовж 45 діб при 4 °С. Після зберігання розчину індекс полідисперсності збільшився лише на 20 %, а дзета-потенціал зменшився на 29 %. AgNPs, які були синтезовані з використанням супернатанту культуральної рідини *S. cerevisiae* M437, показали меншу стабільність у розчині після зберігання: індекс полідисперсності збільшився на 40 %, а дзета-потенціал зріс на 11,7 %. Розкриті при виконанні НДР параметри наночасток срібла, можуть слугувати для прогнозування якості отримуваних наночасток і стати підґрунтям для масштабування та інтеграції у виробництво. Біотехнологічний синтез наночасток має великі перспективи до промислового впровадження, адже є економічною та екологічною альтернативою хімічним та фізичним підходам.

Керівник НДР



(підпис)

(Тетяна ПИРОГ)
(ініціали, прізвище)

« 6 » _____ червня _____ 2022 р.

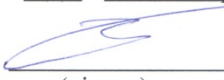
ВИКОНАВЕЦЬ



(підпис)

(Оксана СКРОЦЬКА)

« 6 » _____ червня _____ 2022 р.



(підпис)

(Свген ХАРЧЕНКО)

« 6 » _____ червня _____ 2022 р.

Міністерство освіти і науки України
Національний університет харчових технологій

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Проректор з наукової роботи

 Сергій ТОКАРЧУК

« 7 вересня » 2022 р.

АКТ

впровадження результатів науково-дослідних, дослідно-конструкторських і дисертаційних робіт у навчальний процес вищих навчальних закладів

Замовник Національний університет харчових технологій в особі проректора з наукової роботи ТОКАРЧУКА Сергія, який діє на підставі наказу № 135 від 27.09.21 р.

Дійсним актом підтверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Використання дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для одержання наночасток срібла», що виконувалась згідно плану науково-дослідної роботи кафедри біотехнології і мікробіології «Біотехнологічний потенціал мікроорганізмів природних та техногенних екосистем (2019-2023 рр., № державної реєстрації 0119U001485).

виконаної на кафедрі біотехнології і мікробіології
(найменування кафедри)

виконуваної з 2019 по 2022
(термін виконання)

впроваджені у навчальний процес кафедри біотехнології і мікробіології

1. Вид впроваджених результатів: Спосіб отримання наночасток срібла (AgNPs) з використанням дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* 71В. Синтез наночасток срібла відбувається у культуральній рідині *S. cerevisiae* 71В. Для біосинтезу AgNPs нітрат срібла вносять на початку культивування дріжджів *S. cerevisiae* 71В. В подальшому працюють з двома розчинами наночасток срібла – у супернатанті та безклітинному екстракті.

2. Форма впровадження: лекційні, практичні та лабораторні заняття, курсове та дипломне проектування.

3. Новизна результатів науково-дослідних робіт: Встановлено, що при використанні дріжджів *S. cerevisiae* 71В можна здійснювати біосинтез наночасток срібла. При цьому AgNPs синтезувались у культуральній рідині. Встановлено, що при внесенні у культуральну рідину *S. cerevisiae* 71В нітрату срібла у концентрації 0,5 та 1,0 мМ відбувався інтенсивніший біосинтез AgNPs, ніж при використанні

нітрату срібла у вищих концентраціях – 1,5 і 2,0 мМ. Максимальне значення оптичної густини розчину наночастинок срібла у супернатанті культуральної рідини *S. cerevisiae* 71В у піку поглинання (400 нм) при використанні для біосинтезу 0,5 мМ нітрату срібла було на 95 % більшим, ніж при використанні 2 мМ нітрату срібла. Виявлено антибактеріальну та антиадгезивну активність розчинів AgNPs, отриманих при внесенні у культуральну рідину *S. cerevisiae* 71В нітрату срібла у концентрації 1, 1,5 та 2 мМ.

4. Перелік курсів і дисциплін, у рамках яких викладені результати НДР:

Модулі навчальних дисциплін «Мікробні технології наночастинок благородних металів» для підготовки докторів філософії за спеціальністю 162 «Біотехнології і біоінженерія» та «Нанобіотехнологія» для підготовки магістрів за спеціальністю 162 «Біотехнології і біоінженерія».

5. Соціальний і науково-технічний ефект: Отримано наночастинок срібла біогенним, екологічно чистим способом. Розчини AgNPs, які були отримані при внесенні нітрату срібла у культуральну рідину *S. cerevisiae* 71В проявили антибактеріальну та антиадгезивну активність по відношенню до референс-штамів *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 та *Escherichia coli* ATCC 25922, а також клінічних ізолятів *Staphylococcus aureus* 1536 та *Klebsiella pneumoniae* 520. Отримані при виконанні НДР результати, дають можливість розцінювати розчини наночастинок срібла як альтернативу традиційним антимікробним засобам, або як допоміжний (бустерний) агент у антимікробній терапії. Біотехнологічний синтез наночастинок має великі перспективи до промислового впровадження, адже є економічною та екологічною альтернативою хімічним та фізичним методам.

Керівник НДР


(підпис)

(Тетяна ПИРОГ)
(ініціали, прізвище)

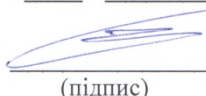
« 6 » _____ червня _____ 2022 р.

ВИКОНАВЕЦЬ


(підпис)

(Оксана СКРОЦЬКА)

« 6 » _____ червня _____ 2022 р.


(підпис)

(Євген ХАРЧЕНКО)

« 6 » _____ червня _____ 2022 р.

ДОДАТОК Б. Список опублікованих праць за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях України

1. Харченко, Є. В., & Скроцька, О. І. (2020). Використання мікроорганізмів для біогенного синтезу наночасток. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*, 26 (2), 57-70.

<http://dspace.nuft.edu.ua/handle/123456789/32152>

2. Харченко, Є., Лазюка, Ю., Скроцька, О., & Пенчук, Ю. (2021). Отримання біогенних наночасток срібла з використанням дріжджів і перспективи їх застосування у протимікробній терапії. *Наукові праці НУХТ*, 27 (3), 32-42.

http://sw.nuft.edu.ua/Archiv/2021/swnuft_27_3.pdf.pdf#page=32

3. Скроцька, О., Лазюка, Ю., & Харченко, Є. (2022). Наночастки срібла та золота: практичне застосування, біосинтез з використанням дріжджів, біологічна активність. *Наукові праці НУХТ*, 28 (1), 18-31.

http://sw.nuft.edu.ua/Archiv/2022/swnuft_28_1.pdf#page=18

4. Skrotska, O., Kharchenko, Y., Laziuka, Y., Marynin, A., & Kharchuk, M. (2021). Biosynthesis and characteristics of silver nanoparticles obtained using *Saccharomyces cerevisiae* M437. *Ukrainian Food Journal*, 10 (3), 615-631.

<http://www.ufj.ho.ua/Archiv/UKRAINIAN%20FOOD%20JOURNAL%202021%20V.10%20Is.3.pdf#page=195>

Статті у періодичних виданнях країн Європейського Союзу

5. Kharchenko, Y., Lastovetska, L., Maslak, V., Sidorenko, M., Vasylenko, V., & Shydlovska, O. (2022). Antibacterial Activity of Green Synthesised Silver Nanoparticles on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Sciences*, 12(7), 3466. doi: 10.3390/app12073466.

<https://www.mdpi.com/2076-3417/12/7/3466>

Тези доповідей у матеріалах конференцій

6. Харченко, Є., & Скроцька, О.І. (2019). *Перспективи використання бактерій для синтезу біогенних наночастинок на прикладі наночастинок срібла і золота*. Збірник тез VIII Міжнародної науково-практичної онлайн конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії». Київ: НУБіП України.

7. Kharchenko, Y., & Skrotska, O.I. (2019). *Biogenic silver nanoparticles as potential antimicrobial agents*. VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement «Science and modern pharmaceutical manufacturing». Kyiv: Український медичний часопис.

8. Харченко, Є., & Скроцька, О.І. (2020). *Використання бактерій для синтезу наночастинок металів*. Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю «Нанотехнології і наноматеріали у фармації та медицині». Харків: НФаУ.

9. Лазюка, Ю.В., Харченко, Є.В., & Скроцька, І.О. (2020). *Можливість використання грибів та бактерій для біологічного синтезу наночастинок срібла*. Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття». Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського.

10. Лазюка, Ю.В, Харченко, Е.В., & Скроцкая, О.И. (2020). *Перспективы использования Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241 для получения наночастиц серебра*. Тезисы докладов участников Республиканской конференции с международным участием, посвященной 80-летию со дня рождения Т.С. Морозкиной «Физико-химическая биология как основа современной медицины». Минск: БГМУ.

11. Kharchenko, Y., & Skrotska, O. (2020). *Peculiarities of the synthesis of biogenic silver nanoparticles by bacteria*. Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті». Київ: НУХТ.

12. Laziuka, Y., Kharchenko, Y., & Skrotska, O. (2020). *Biosynthesis of silver nanoparticles using Acinetobacter calcoaceticus IMV V-7241 cell-free supernatant*.

Збірник тез доповідей XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології». Львів: ЛНУ ім. Івана Франка.

13. Laziuka, Y., Skrotska, O., & Kharchenko, Y. (2020). *Ecological synthesis of silver nanoparticles using bacteria*. Actual environmental problems. Proceedings of the X International Scientific Conference of young scientists, master and PhD students. Minsk: «Информационно-вычислительный центр Министерства финансов Республики Беларусь».

14. Харченко, Є.В., Лазюка, Ю.В., & Скроцька, О.І. (2021) *Синтез наночасток металів з використанням рослинних екстрактів*. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції «PLANTA+. Наука, практика та освіта». Київ: НМУ ім. Богомольця.

15. Лазюка, Ю.В., Харченко, Е.В., & Скроцкая, О.И. (2021). *Получение наночастиц серебра с использованием микроорганизмов и их антибиоплёночные свойства*. Сборник тезисов докладов LXXV Международной научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Актуальные проблемы современной медицины и фармации – 2021». Минск: БГМУ.

16. Лазюка, Ю.В., Потапенко, В.В., Харченко, Е.В., & Скроцкая, О.И. (2021). *Использование сахаромикетов для биосинтеза наночастиц серебра*. Тезисы докладов участников Международной научной конференции «Физико-химическая биология как основа современной медицины». Минск: БГМУ.

17. Харченко, Є., & Скроцька, О. (2021). *Синтез наночасток срібла з використанням рослинних екстрактів*. Матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті». Київ: НУХТ.

18. Лазюка, Ю.В., Скроцька, О.І., & Харченко, Є.В. (2021). *Спектрофотометричний аналіз наночасток срібла синтезованих з використанням безклітинного дріжджового екстракту*. Програма та тези матеріалів X Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції». Київ: НУХТ.

19. Kharchenko, Y., Skrotska, O., Laziuka, Y., & Potapenko, V. (2021). *Biosynthesis of silver nanoparticles by Saccharomyces cerevisiae M437*. Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Європейські виміри сталого розвитку». Київ: НУХТ.

20. Kharchenko, Y., & Skrotska, O. (2021). *Saccharomycetes as biological agents for the mediated biosynthesis of silver nanoparticles*. The International Conference «Biotechnologies, Present and Perspectives», 8 Edition. Suceava: "Stefan cel Mare" University.

21. Харченко, Є., & Скроцька, О. (2022) *Використання нанокомпозитів та наночасток срібла для подовження терміну зберігання овочевих культур*. Матеріали 88 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті». Київ: НУХТ.