

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»
Декан факультету
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

« 02 » грудня 2024 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНИКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

« 02 » грудня 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Промислова та фармацевтична
біотехнологія»

на тему: «Роль поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-
7241 у біосинтезі наночастинок срібла»

Виконав: здобувачка II курсу, групи 1
ДЗЮБА Марія Володимирівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти
(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент Євген ХАРЧЕНКО
(ім'я та прізвище)

(підпис)

Я, як здобувачка Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавала і не одержувала недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувачка _____
(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична

біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 08 ” жовтня 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ДЗЮБА Марія Володимирівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Роль поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 у біосинтезі наночастинок срібла»

керівник роботи СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна, к.б.н, доц.

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 07 жовтня 2024 р. № 875-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01.12.2024

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241; цільовий продукт: наночастинок срібла.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Реферат, Вступ, Розділ 1. Біогенний синтез наночастинок з використанням мікробних поверхнево-активних речовин та їх практичне застосування. Розділ 2. Антимікробна дія наночастинок синтезованих за допомогою біологічних поверхнево-активних речовин. Розділ 3. Використання наночастинок срібла в біосенсорах. Розділ 4. Техніко-економічне обґрунтування використання біосенсорів на основі наночастинок срібла для виявлення раку молочної залози. Розділ 5. Матеріали та методи дослідження. Розділ 6. Вплив поверхнево-активних речовин та інших метаболітів *A.calcoaceticus* ІМВ-7241 на біосинтез наночастинок срібла. Розділ 7. Методи контролю якості синтезованих наночастинок срібла.

5. Перелік графічного матеріалу

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 08 жовтня 2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Розділ 1. Біогенний синтез наночастинок з використанням мікробних поверхнево-активних речовин та їх практичне застосування.	08.10.2024-15.10.2024	
2	Розділ 2. Антимікробна дія наночастинок синтезованих за допомогою біологічних поверхнево-активних речовин	16.10.2024-23.10.2024	
3	Розділ 3. Використання наночастинок срібла в біосенсорах.	24.10.2024-31.10.2024	
4	Розділ 4. Техніко-економічне обґрунтування використання біосенсорів на основі наночастинок срібла для виявлення раку молочної залози.	1.11.2024-5.11.2024	
5	Розділ 5. Матеріали та методи дослідження	6.11.2024-13.11.2024	
6	Розділ 6. Вплив поверхнево-активних речовин та інших метаболітів <i>A. calcoaceticus</i> IMB-7241 на біосинтез наночастинок срібла.	14.11.2024-19.11.2024	
7	Розділ 7. Методи контролю якості синтезованих наночастинок срібла.	19.11.2024-20.11.2024	
8	Оформлення пояснювальної записки	20.11.2024-22.11.2024	

Здобувачка

_____ (підпис)

Марія ДЗЮБА

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Оксана СКРОЦЬКА

_____ (ім'я та прізвище)

ABSTRACT

This diploma is devoted to the investigating the possibility of AgNPs biosynthesis using surfactants and secondary metabolites of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV V-7241.

Aims of the work: to cultivate *A. calcoaceticus* IMV V-7241; to isolate surfactants; to obtain a cell-free aqueous extract of *A. calcoaceticus* IMV V-7241; to carry out the biosynthesis of AgNPs using surfactants and other metabolites of *A. calcoaceticus* IMV V-7241 at different temperature parameters.

The synthesis of AgNPs using surfactants of *A. calcoaceticus* IMV V-7241 was realized in this work. The strain was cultivated on purified glycerin and biodiesel waste. Co-cultivation with the inducer of surfactant biosynthesis, the yeast *S. cerevisiae* M437, was also performed. A pronounced absorption peak of biosynthesized nanoparticles was observed in the wavelength range from 300 to 540 nm with a peak at 425 nm. For AgNPs obtained using surfactants and cell-free extract with eukaryotic inducer, the highest optical density (OD=2) was observed at 425 nm, which may be due to the synergistic effect of biosurfactants and formed metabolites in the reduction and stabilization of nanoparticles.

General characteristics of the work: the work of 89 pages (without a list of references) consists of an introduction, 7 chapters, including an experimental part (materials and methods, discussion of results, conclusions) and a list of references (102 sources).

Keywords: *silver nanoparticles, biosynthesis, surfactants, Acinetobacter calcoaceticus, cell-free extract, biosensor, breast cancer.*

РЕФЕРАТ

Мета роботи – дослідження можливості біосинтезу AgNPs з використанням поверхнево-активних речовин та вторинних метаболітів *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241.

Завдання роботи: здійснити культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241; виділити ПАР; отримати безклітинний водний екстракт *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241; здійснити біосинтез AgNPs з використанням ПАР та інших метаболітів *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за різних температурних параметрів.

У роботі реалізовано синтез AgNPs з використанням поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241. Штам культивували на очищеному гліцерині та відходах біодизелю. Також проводили ко-культивування з індуктором біосинтезу ПАР – дріжджами *S. cerevisiae* М437. Виражений пік поглинання біосинтезованих наночастинок спостерігали у діапазоні довжин хвиль від 300 до 540 нм з піком при 425 нм. Для AgNPs отриманих з використанням ПАР і безклітинного екстракту з еукаріотичним індуктором спостерігали найвище значення оптичної густини ($OD=2$) при довжині хвилі 425 нм, що може бути пов'язано з синергічним ефектом біосурфактантів та утворених метаболітів у відновленні та стабілізації наночастинок.

Загальна характеристика роботи: робота обсягом 89 сторінок (без списку літератури) складається зі вступу, 7 розділів, серед яких є експериментальна частина (матеріали та методи, обговорення результатів, висновків) та списку літератури (102 джерел).

Ключові слова: наночастинок срібла, біосинтез, поверхнево-активні речовини, *Acinetobacter calcoaceticus*, безклітинний екстракт, біосенсор, рак молочної залози.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. БІОГЕННИЙ СИНТЕЗ НАНОЧАСТИНОК З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРОБНИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ТА ЇХ ПРАКТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ	9
1.1. Механізми формування наночастинок	9
1.2. Особливості біосинтезу наночастинок срібла	12
1.3. Роль поверхнево активних речовин у біосинтезі інших наночастинок.	21
1.3.1. Наночастинки золота	21
1.3.2. Наночастинки оксидів металів	24
1.3.3. Наночастинки сульфідів металів, барію титанату.....	26
РОЗДІЛ 2. АНТИМІКРОБНА ДІЯ НАНОЧАСТИНОК СИНТЕЗОВАНИХ ЗА ДОПОМОГОЮ БІОЛОГІЧНИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН	38
2.1 Механізми антимікробної дії утворених наночастинок металів	.38
2.2. Антибактеріальна дія наночастинок	38
2.3. Протигрибкова дія	39
2.4. Антибіоплівкова дія	40
РОЗДІЛ 3. ВИКОРИСТАННЯ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА В БІОСЕНСОРАХ	46
3.1. Електрохімічні біосенсори	46
3.2. Оптичні біосенсори	49
РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИКОРИСТАННЯ БІОСЕНСОРІВ НА ОСНОВІ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ	63
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 5. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	69
5.1. Поживні середовища та реактиви.....	69
5.2. Культивування <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ-7241	70
5.3. Отримання безклітинного екстракту <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ-7241	71
5.4. Отримання поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter</i> <i>calcoaceticus</i> ІМВ-7241	71
5.5. Умови біосинтезу наночастинок срібла.....	72

5.6. УФ-видима спектрофотометрія... ..	73
РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ТА ІНШИХ МЕТАБОЛІТІВ <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> ІМВ-7241 НА БІОСИНТЕЗ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА.....	74
6.1. Роль поверхнево-активних речовин	74
6.2. Вплив метаболітів безклітинного водного екстракту	76
6.3. Вплив поверхнево-активних речовин та метаболітів безклітинного водного екстракту	80
ВИСНОВКИ	84
РОЗДІЛ 7. МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ СИНТЕЗОВАНИХ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА	85
7.1. Спектрофотометрія	85
7.2. Середній (гідродинамічний) діаметр та дзета-потенціал.....	86
7.3. Трансмійсна електронна мікроскопія	88
7.4. Структура. Кристалічна решітка	88
7.5. Інфрачервона мікроскопія з перетворенням Фур'є	88
7.6. Концентрація наночастинок.....	89
7.7. Антибактеріальна активність.....	89
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	90

ВСТУП

Срібні наночастинки (AgNPs) використовуються як антимікробні, антибіоплівкові та протипухлинні засоби, сприяють загоєнню ран, застосовуються для знезараження води, візуалізації, виробництва харчових плівок, в каталізі та в біосенсорах. Екологічний синтез AgNPs з біологічними поверхнево-активними речовинами (ПАР) забезпечує біосумісність, тому дослідження утворення срібних наночастинок з бактеріальними ПАР є особливо актуальним.

У процесі формування наночастинок важливо використовувати ПАР, які стабілізують їх і запобігають агрегації через явище Оствальда (коли більші частинки енергетично вигідніші, ніж менші). Збільшення розмірів і зміна форми наночастинок може погіршити їхні біологічні властивості. У нанотехнологіях ПАР виконують кілька функцій: діють як стабілізатори, відновники, сприяють самозбірці для інкапсуляції або працюють як емульгатори в наноемульсіях. Ці речовини можуть бути як хімічного, так і біологічного походження. Зростання екологічної свідомості стимулює відмову від хімічно синтезованих ПАР (таких як додецилсульфат натрію, полівінілпіролідон, цетриметил бромід та ін.), які шкодять довкіллю та токсичні для живих організмів. Альтернативою є бактеріально синтезовані ПАР, які полегшують синтез металевих наночастинок (виключають потребу в токсичних реагентах), є біорозкладними, виробляються на недорогих середовищах (наприклад, з перероблених олій), біосумісні та можуть підсилювати антимікробні й антибіоплівкові властивості наночастинок.

Також використання наночастинок срібла в складі біосенсорних пристроїв є інноваційним рішенням в ранній діагностиці ракових захворювань. Вони мають унікальні властивості такі як посилення електрохімічних сигналів, каталітична активність, візуалізація онкомаркерів, поверхневий плазмонний резонанс, збільшення площі поверхні.

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	ВСТУП	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Дзюба М.В.</i>					7	2
<i>Консульт.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Керівник</i>		<i>Скороцька О.І.</i>						
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав.каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Та додатковою перевагою є прості методи синтезу таких наноматеріалів та подальше прикріплення до електроду. Ці властивості зумовлюють в використанні їх в біосенсорах, які базуються на електрохімічних методах (вольтамперометрія, імпеданс, амперометрія) та оптичних (локалізований плазмонний резонанс, раманівська спектроскопія, фотолюменісценція). Дані методи є високочутливими в виявленні найменших концентрацій маркерів онкологічних захворювань, які містять в біологічних рідинах (сироватка, сеча, спинномозкова рідина і т.д.), що допоможе в майбутньому у прогнозах виявлення раку та аналізі ефективності операційних втручань та хіміотерапії (Chiorsea-Raquim A.-M., 2023)

РОЗДІЛ 1. БІОГЕННИЙ СИНТЕЗ НАНОЧАСТИНОК З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРОБНИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ТА ЇХ ПРАКТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

Наночастинки (NPs, НЧ) мають специфічні властивості, які зумовлюють їх широке використання. Наприклад, вони демонструють поверхневе плазмонне резонансне поглинання в діапазоні ультрафіолетового діапазону, що дозволяє їх застосовувати в візуалізації пухлин та інших об'єктів. Також НЧ можуть бути використані в терапевтичній, природоохоронній, електронній, оптичній сфері. Все більше набуває популярності новий напрямок під назвою наномедицина, в якій використовують НЧ, зокрема AgNPs, при таргетованій доставці ліків, як потужний антибактеріальний, антибіоплівковий, ранозагоювальний, противірусний і протипухлинний агент (Almatroudi A., 2020).

1.1 Механізми формування наночастинок

Під час отримання наночастинок обов'язковою умовою є використання поверхнево-активних речовин, які стабілізують їх та унеможливають подальшої агрегації внаслідок явища Оствальда (більші частинки є енергетично більш вигідними, ніж менші частинки). А при збільшенні розмірів та зміни форми НЧ вже не мають бажаних характеристик, наприклад з огляду на біологічну активність.

					НУХТ БТЕК 02.01.08 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дзюба М.В.			РОЗДІЛ 1 Біогенний синтез наночастинок з використанням мікробних поверхнево-активних речовин та їх практичне застосування	Літ.	Арк.	Акрушіє
Консульт.							9	36
Керівник		Скороцька О.І.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав.каф.		Стабніков В.П.						

У нанотехнологіях ці універсальні молекули можуть відігравати багато ролей: як блокуючі та відновлюючі агенти, також забезпечують самозбірні структури для інкапсуляції, або діють як емульгатори в наноемульсіях. Поверхнево-активні речовини можуть бути як хімічної, так і біологічної природи. З огляду на тенденцію зростання усвідомлення екологічних проблем, хімічно синтезовані ПАР (додецилсульфат натрію, полівінілпіролідон, цетриметил бромід, Gemini та ін.) визнаються шкідливими для навколишнього середовища, токсичним для живих систем. Як альтернатива, пропонуються бактеріально синтезовані поверхнево-активні речовини, які спрощують технологію синтезу наночастинок металів (унеможливають використання високотоксичних реагентів), є біодеградабельними, отримуються на недорогих середовищах культивування (перероблені олії), біосумісні, та окрім того можуть сприяти синергічному ефекту наночастинок, зокрема в антимікробній та антибіоплівковій активностях. Одним із способів дії ПАР є адсорбція на металевих наночастинках (MeNP), зменшують поверхневу енергію на межі розділу фаз, стабілізація поверхні наночастинок і запобігання подальшій агрегації та забезпечення однорідної морфології (Nitschke, M.& Marangon, C. A. 2022).

Для розуміння механізму утворення та стабілізації наночастинок мікробними поверхнево-активними речовинами, необхідно розглянути їх будову та різновиди. ПАР складаються з полярної групи, зазвичай це складні ефіри, гідроксили, фосфати, карбоксильні групи, вуглеводи, пептиди, або білків, тоді як гідروفобна частина - це насичені або ненасичені жирні кислоти, гідроксигирні кислоти або жирні спирти. Більшість біосурфактанти є аніонними або нейтральними. Їх класифікують за молекулярною масою:

- на низькомолекулярні (наприклад, гліколіпіди та ліпопептиди). Вони є більш ефективні як стабілізуючі агенти в нанотехнологіях. В таблиці 1.1. наведені різні види низькомолекулярних поверхнево-активних речовин та їх продуценти.

• високомолекулярні (наприклад, ліпополісахариди та ліпопротеїни) ПАР. Зазвичай використовуються як емульгатори (ліпосан, емульсан), та синтезуються такими мікроорганізмами як: *Candida lipolytica*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Arthrobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas gessardii* (Płaza G. та ін. 2014).

Таблиця 1.1 (Płaza G. та ін., 2014)

Продуценти низькомолекулярних ПАР

Група ПАР	Різнovid	Продуцент
Гліколіпіди	Трегалозоліпіди	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Arthrobacter sp.</i>
	Рамноліпіди	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. sp.</i> , <i>Burkholderia sp</i>
	Софороліпіди	<i>Candida bombicola</i> , <i>C. apicola</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i>
	Монозитолеритролліпіди	<i>Candida antarctica</i> , <i>Pseudozyma sp.</i> , <i>Ustilago maydis</i>
Ліпопептиди	Сурфактин	<i>Bacillus subtilis</i>
	Ітурин А	<i>Bacillus subtilis</i>
	Лігенізін	<i>Bacillus licheniformis</i>

Дані наночастинки, синтез яких опосередковується використанням поверхнево-активних речовин, мають 3 шари:

1. поверхневий шар, який може бути функціоналізований за допомогою різноманітних малих молекул, іонами металів, іншими полімерами (білки). Це широко використовується при таргетованій доставці ліків до пухлин, при антибіотикорезистентності (наночастинки та антибіотичні речовини виявляють синергічний ефект).

2. шар оболонки, який є матеріалом, що хімічно відрізняється від ядра, має заряд та стабілізує структуру. Зазвичай складається з поверхнево-активних речовин.

3. ядро, який складається з атомів металу або неметалу (Khan I. та ін, 2019).

1.2 Особливості біосинтезу наночастинок срібла

При аналізі наукових статей було виділено 3 основних методів синтезу наночастинок срібла за допомогою бактеріальних поверхнево-активних речовин, такі як використання очищених ПАР або культуральної рідини продуцента, який їх синтезує; метод зворотних міцел, метод Толленса. Ці методики різняться за тривалості генерації НЧ (від декілька хвилин до 120 год), параметрів синтезу (рН, температура, УФ-випромінювання, застосування мікрохвиль), використання різних реагентів (боргідрид натрію, сахариди, куркумін і т.д.), та, як наслідок, стабільністю, формою та розміром утворених наноматеріалів.

Цікаво зауважити, що метод синтезу наночастинок за допомогою культуральних рідин та супернатантів продуцентів сурфактинів включав не тільки участь поверхнево-активних речовин, але і інших біомолекул. Наприклад, автори Krishnan, N. зі співавт., використовуючи супернатант культури *Brevibacillus brevis* KN8 в синтезі НЧ, показали за допомогою інфрачервоного аналізу з перетворенням Фур'є, що було ідентифіковано позаклітинний пептид відповідального також за синтез і стабілізацію AgNPs (Krishnan, N. та ін., 2018).

Іншою технологією отримання наночастинок срібла була вже за участю виділених поверхнево-активних речовин з культуральної рідини. Виділення та очищення ПАР включало такі етапи як центрифугування культуральної рідини, підкислення супернатанту, екстрагування біосурфактантів в органічних розчинниках (метанол, хлороформ, етилацетат) та подальше випарювання екстрагентів в вакуумі з отриманням чистих ПАР (Bazylyak L. та ін, 2020; Rane A. та ін., 2017; Das M. та ін., 2019; Khalid та ін., 2018).

Одним із різновидом синтезу наночастинок є метод зворотних міцел. У потрійній системі, що складається з вуглеводню (ізооктан, гептан та інші), води

та поверхнево-активної речовини утворюються сферичні агрегати, відомі як зворотні міцели, в яких містяться відновник (боргідрид натрію) та сіль (аргентум нітрат). Коли ці міцели зіштовхуються між собою в результаті броунівського руху в такій гомогенній мікроемульсії утворюються короткоживучі димери, які обмінюються вмістом. Боргідрид натрію відновлює Ag^+ до атомарного срібла (наночастинки). Потім міцели руйнують за допомогою спиртів, а ПАРи всередині таких міцел запобігають агрегації наночастинок через електростатичне відштовхування (Kumar R. та ін., 2018; Bezza F. та ін., 2020; Deshmukh N. та ін., 2022; Kulkarni та ін., 2019).

Серед підходів зеленого синтезу наночастинок виділяють метод Толленса, який базується на відновлення сахаридами солей аргентуму в присутності йонів амонію. Автори запропонували поєднати цей метод з використанням поверхнево-активних речовин зокрема біологічного походження та зауважили, що ПАР може виступати в такій реакції як стабілізатор так і відновник, на відміну від хімічного ПАР. Зокрема під час синтезу наночастинок використовували УФ-випромінювання, щоб прискорити реакцію і процес формування наночастинок (Durval I., 2021).

Форма утворених наночастинок з використанням бактеріальних ПАРів здебільшого сферична через міцелоутворення, але в статті Kulkarni зі співат. вдалося синтезувати трикутноподібні, кубічні наночастинки Krishnan N. Сферична форма є важливим фактором з огляду для використання в біологічних системах, така форма є бажана при антимікробній дії, можливість функціоналізації поверхні і подальша таргетована доставка лігандів (Nitschke, M., & Marangon, C., 2022).. На противагу цього, наночастинки стабілізовані хімічними ПАРами мають неправильну форму, при цьому є полідисперсними, тобто в реакцій суміші містяться різноманітні форми. Це є небажаним явищем і підвищує цитотоксичність (Shah V. та ін., 2019)

Температура синтезу варіюється від кімнатної до 121 градусів. При кімнатній температурі та 40°C синтез триває 48 годин (Plaza G. та ін., 2016), а при високих (90-121°C) набагато швидше (до зміни забарвлення суміші) (Das M.

та ін., 2019). Наприклад, дослідники Atwan Q. зі співавт. виявили закономірності температури синтезу наночастинок та їх розмір. Було встановлено, що при збільшення з 30°C до 60°C було зміщений пік поглинання в червону сторону (з 405 до 413 нм), що свідчить про збільшення розмірів утворених НЧ і в подальшому вплинуло на антибактеріальну активність, а саме зона інгібування росту наночастинок зменшилася з 19 до 10 мм. Зазначається, що підвищення температури призводить до агрегації НЧ. Тому автори Deshmukh N. та ін., які використовували метод зворотних міцел, здебільшого підтримували кімнатну температуру. Але припускається, що реагент боргідрид натрію є досить сильним відновником і утворює наночастинок дуже швидко без впливу температур (Kulkarni та ін., 2019).

pH синтезу наночастинок в статтях варіюється від 5 до 12. Це є критичним фактором в розмірі наночастинок, наприклад можна дослідити за спектром поглинання в УФ-області. Atwan Q. зі співавт. дослідили, що при pH 5 – пік поглинання при 450 нм (зсув в червону область свідчить про утворення більших наночастинок), при pH 7 - 415, при pH 9 – 409 нм НЧ вже менші та монодисперсні. Таку ж тенденцію лужного pH помітили Reddi A. з колегами при синтезі наночастинок золота при pH 5 – 13 нм, pH 7 – 8 нм, при pH 9 – 4,7 нм. Вони також були стабільними, а при pH 5 агрегуються через 24 години.

Отже, існують різні технології синтезу наночастинок срібла з використанням природних (бактеріальних) поверхнево-активних речовин, що свідчить про важливу роль цих речовин в відновленні солей срібла до наночастинок і в подальшій їх стабілізації, надання конкретної форми. В таблиці 1.2 наведено приклади параметрів синтезу наночастинок срібла та їх характеристика за розміром, формою, зарядом поверхні.

Таблиця 1.2

Використання бактеріальних поверхнево-активних речовин в синтезі наночастинок срібла

Продуцент	Поверхнево-активні речовини	Параметри синтезу наночастинок	Характеристика наночастинок срібла (пік, форма, розмір, зета-потенціал, полідисперсний індекс)	Джерело
<i>Bacillus subtilis</i> T-1	Сурфактин	Супернатант 50 мл, 1мМ AgNO ₃ , кімнатна температура, 48 год, 200 об/хв	410-420 нм, сферична, 13-29 нм, -30..-40мВ	Plaza G. та ін., 2016
<i>Pseudomonas</i> PS-17	Рамноліпіди	Очищений розчин ПАР 1 г/л, 1мМ AgNO ₃ , 70 °С рН 8,2, статичні умови	Сферична, 3.6 нм	Bazylyak L. та ін., 2020
<i>Bacillus subtilis</i>	Сурфактин	Супернатант 50 мл, 50 мл 1мМ AgNO ₃ , рН 9, кімнатна температура, мікрохвилі	410 нм, сферична, 14 нм	Eswari J. та ін., 2018
<i>Bacillus subtilis</i> ANR – 88	Сурфактин	Очищений розчин ПАР 0,75 г/л, 1 мМ AgNO ₃ , 90°С, 130 хв.	Сферична, 4-18 нм	Rane A. та ін., 2017

Продовження таблиці 1.2

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Q1	Рамноліпіди	0,1 ммоль AgNO ₃ /20 мл води, 0,002 г ПАР /20 мл в 20 мл води, 40°C, рН 9, прями сонячні промені протягом 5 хв.	415 нм, сферична, 38 нм, - 23.2 мВ.	Atwan Q. та ін., 2020
<i>Bacillus vallismortis</i> MDU6	Сурфактин	0,1% (г/л) ПАР в 100 мл, 0,05 моль AgNO ₃ , автоклавування при 121°C, 1 бар, 30 хв.	438 нм, сферична, 44-70 нм	Das M. та ін., 2019
<i>Bacillus subtilis</i> I'-1a	Сурфактин	Фільтрований супернатант 50 мл, 1мМ AgNO ₃ , кімнатна температура, 48 год, 200 об/хв	Сферична	Joanna C., 2018
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Рамноліпіди	Рівні об'єми ПАР (1 г/л) та AgNO ₃ 1 мМ, рН 12, 80°C, 200 об/хв, 1 год	Сферична, 35 нм, -56,3 мВ	Khalid та ін., 2018
<i>Brevibacillus brevis</i> KN8,	Сурфактин	Супернатант, 1 мМ AgNO ₃ , 37°C, 120 год, у темряві	420 нм, кубічна, 15,4 нм, - 36,6мВ, 0,447	Krishnan N. та ін., 2018
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TEN01	Рамноліпіди	Співвідношення супернатант: розчин AgNO ₃ в концентрації 33,7 мг/мл = 1:2, 20 мл 3,5 мг/мл NaBH ₄ , до появи коричневого забарвлення.	428 нм, сферична, 166,7 нм, - 31,6мВ	Elakkiya V. та ін., 2020

Продовження таблиці 1.2

<i>Bacillus subtilis</i> CN2	Сурфактин	Мікроемульсія: Ізооктан 125 мл, 50 мл 3 г/л розчину ліпопептиду та 25 мл бутанолу. Розчин А: мікроемульсія і 25 мл водного 0,2 М AgNO ₃ Розчин В: 25 мл 0,4 М розчину NaBH ₄ . Змішують обидва розчини, 25 °С, рН 10	405 нм, сферична, 21 нм	Bezza F. та ін., 2020
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MKVIT3	Рамноліпід	Мікроемульсія: 1 мл 0,05 мМ AgNO ₃ , 6,25 мл н-гептан, 0,1 г ПАР, і 1 мл 0,1 мМ NaBH ₄ , 200об/хв, 30 хв. Для руйнування зворотних міцел – 10 мл етанолу.	440 нм, сферична, 18 нм, - 30,9 мВ	Das M. та ін., 2016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS-161R	Рамноліпіди	Мікроемульсія: н-гептан 0,5 мл, 3 г/л розчину ПАР та 1,5 мл бутанолу.	410 нм, сферична, 15 нм	Kumar C. та ін., 2010

		Розчин А: мікроемульсія і водного 0,01 М AgNO ₃ Розчин В: 25 мл 0,1 М розчину NaBH ₄ . Змішують обидва розчини, 1 год, 200 об/хв		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LTR 1	Рамноліпід	Мікроемульсія: Н-гептан 25 мл, 1 г/л розчину ліпопептиду та 25 мл бутанолу. Розчин А: мікроемульсія і 1 мл водного 0,05 М AgNO ₃ Розчин В: 0,1 М розчину NaBH ₄ . Змішують обидва розчини, 25 °С, 1 год. Для руйнування зворотних міцел - 10 мл бутанолу.	420-440 нм, сферична, 36 нм	Deshmukh N. та ін.,2022
<i>Lactobacillus brevis</i> МТСС 4463	Сурфактин	1 мл ПАР, 1 мл AgNO ₃ 1 мМ, 20 мкл NaBH ₄ 1 мМ, 200 об/хв, 5 хв	420 нм, трикутна, 18 нм	Kulkami та ін., 2019

<i>Bacillus cereus</i> УСР 1615	Сурфактин	Техніка Толленса: AgNO ₃ 1,7 г / 100 мл, 0,62 NaOH, 100 мл 0,4% NH ₄ OH, 2,5 г ПАР, 2 г глюкози, 28 °С, УФ, 8 год	400 нм (через 120 днів 430 нм), сферична, 20 нм, – 23.4 mV	Durval I. та ін., 2021
------------------------------------	-----------	---	--	---------------------------

1.3 Роль поверхнево-активних речовин у біосинтезі інших наночастинок

Окрім синтезу наночастинок срібла широко вивчається отримання наноматеріали інших металів (золото, їх оксиди, сульфід, магнетит, брушит) та неметалів (силіцій, куркумін) за участю поверхнево-активних речовин, які виділяються бактеріями, дріжджами та грибами.

1.3.1 Наночастинки золота

Автори Gomez-Grana зі співавт. вивчали вплив температури на синтез наночастинок золота, оскільки є ключовим параметром, який сприяє відновленню Au^+ до Au^0 і може впливати на подальшу агрегацію. Було проведено серії експериментів, у яких температуру реакційної суміші підтримували на рівні 40 °C, 50 °C і 60 °C. Незалежно від температури отримані спектри наночастинок Au демонструють дві різні смуги поверхневого плазмонного резонансу, походження яких можна знайти в наявності сферичних НЧ (пік при 540 нм) і в нанопластинах (більше 540 нм). Тим не менш, хоча при 40 °C основною смугою є та, що відповідає наносферам, у міру підвищення температури все більше піків спостерігається у більш довжинах хвилях (850, 1050 нм) що свідчить про утворення нанопластин та свідчення агрегації.

Аналіз трансмісійної мікроскопії показав, що зразок, синтезований при 40 °C, в основному складається зі сферичних НЧ із середнім діаметром $58,4 \pm 12,8$ нм, а у випадку зразків синтезованих при 50 °C і 60 °C, також можна виділити сферичні та пластинчасті частинки розмірами $49,9 \pm 2,9$ нм і $32,7 \pm 8,5$ нм відповідно до температур. Автори пояснюють, що зменшення розміру наночастинок можна пояснити тим фактом, що зниження температури реакції зменшує здатність біоповерхнево-активної речовини до відновлення, що призводить до меншої можливості зародження

наночастинок, одночасно сприяючи агрегації попередньо утворених НЧ. Експерименти при температурах вище 60 °С не вдалося провести через втрату структури біосурфактанту (Gomez-Grana et al, 20170).

Схоже дослідження провели автори Reddy A. Та ін., що базувалося на вивчення впливу вже рН реакційного середовища. Синтез НЧ золота проводили боргідратним відновленням при різних значеннях рН (5, 7 і 9) і температурах (4°С і кімнатна). Наночастинки, синтезовані при рН 7 і 9 залишалися стабільними протягом 2 місяців, тоді як агрегати спостерігалися при рН 5 вже протягом 24 год, про що свідчить зсув смуги поглинання бік більшої довжини хвилі і це може бути пов'язаний з агрегацією наночастинок. Мікрофотографії показали, що середній розмір частинок становив близько 13, 8 і 4,70 нм при рН 5, 9 і 7 відповідно при 4°С. Наночастинки, синтезовані за кімнатної температури були монодисперсними і більш однорідними порівняно з тими, що утворилися при 4°С. Збільшення розміру частинок при низькій температурі може бути пов'язано зі зменшенням кінетичної енергії окремих наночастинок, що призводить до явища Оствальда, тобто агрегації таких наночастинок. Автори пояснювали, що різні значення рН регулюють концентрацію протонів і впливають на конформаційні зміни в поверхнево-активній речовині, що може впливати на синтез наночастинок золота, зважаючи на те, що молекула сурфактину містить імідну групу в основі та карбоксилатні іони амінокислот аспартату і глутамату (Reddy A. Et al, 2009).

Щодо впливу структури поверхнево-активних на синтез наночастинок автори Ohadi M та ін. показали, що утворений ПАР, який містив у структурі пептиди, здатні притягуватися до НЧ вільними амінними групами за рахунок електростатичного притягання карбоксилатних груп, які є негативно зарядженими. Оскільки такий ліпопептид є негативно зарядженими, він може змінювати поверхневі властивості частинок і стабілізувати їх. Функціональні групи імідної, амінної та міцелярної

структури ПАР зумовлюють вищий рівень стабілізації НЧ Au. Відповідні TEM-мікрофотографії біогенних AuNPs представляють собою сферичні та переважно гексагональні наночастинки, які добре дисперговані. Але зелений синтез НЧ Au може призводити і до утворення трикутних та інших несферичних форм НЧ золота. Зростання ядер наночастинок золота може збільшуватися за рахунок збільшенням швидкості відновлення іонів Au^{3+} , що призводить до утворення більшої кількості частинок з поліедричною, а не сферичною формою. Також науковці відзначили, що при збільшенні рН збільшується схильність рафноліпідів та гліколіпідів до утворення міцелярних структур, які мають сферичну форму. Тому ПАР сприяють утворенню однорідних сферичних наночастинок при лужних умовах (Ohadi M. Et al, 2017)

Одним із методів прискорення синтезу та отримання сферичних та монодисперсних наночастинок золота є додавання боргідриду натрію. Автори Shikha S. та ін. отримували агреговані наночастинки, які випадали в осад під час зберігання (7–10 днів). Тому щоб уникнути утворення таких агрегованих наночастинок, була проведена модифікація протоколу синтезу шляхом додавання кілька крапель 100 мМ борогідриду натрію ($NaBH_4$) і таким чином були отримані високомонодисперсні наночастинки золота стабілізовані софороліпідом (Shikha S.et al, 2020).

Також одним із головним фактором може бути субстрат при культивуванні продуцента для отримання ПАР. У дослідженні Вакур А. зі співавт. використовували три типи рослинних олій як джерела вуглецю для виробництва манозилетритол ліпиду *Ustilago maydis* CGMCC 5.203. Соняшникова олія дала більший вихід ПАР, ніж оливкова та соєва олії. З використанням такого сурфактанту спостерігався поверхневий плазмонний резонанс на довжині хвилі 566 нм, який не змінювався через 30 днів, що свідчить про отримання стабільних AuNP (Вакур А. et al, 2019).

1.3.2 Наночастинки оксидів металів

Автори Vasille M. та ін. використовували софороліпіди для отримання наночастинок магнетиту (оксиди заліза). За допомогою інфрачервоної спектроскопії було показано, що софороліпіди взаємодіють з поверхнею оксиду заліза через свою карбоксильну групу, надаючи стабільність даним наночастинкам як у чистій воді, так і в 0,01 М та 2 М розчинах КСl. Гідродинамічний діаметр більшої частини наночастинок у воді коливається між 10 і 30 нм, і він не стає більшим за 30 нм для концентрацій КСl, що перевищують 2М. Дослідження Sharma N. зі співавт. також продемонстрували можливість синтезу наночастинок оксидів феруму за допомогою рамноліпиду. Вимірювання дзета-потенціалу потенціалу показали, що наночастинки магнетиту були негативно заряджені при рН вище 5,5. Значної зміни гідродинамічного діаметру не спостерігалось при зміні рН >5,5, тоді як при рН <5,5, спостерігається дестабілізація з подальшою агрегацією наночастинок. Стабільність НЧ можна пояснити гідрофобною взаємодією між першим і другим покриттями та стеричною стабілізацією, індукованою рамноліпідними фрагментами. Кінетика агрегації була вивчена для розуміння реакції наночастинок на додавання солей (NaCl та MgCl₂), тобто визначення критичної концентрації коагуляції (ККК). Значення ККК НЧ з рамноліпідним покриттям були близькими до значень НЧ отриманих з використанням синтетичних аніонних поверхнево-активних речовин з меншою довжиною вуглецевого ланцюга (деканова та лауринова кислоти) та складних поверхнево-активних речовин (додецилсульфат натрію та додецилбензолсульфонат натрію) (Sharma N. Et al, 2020).

Athira K. зі співавт. використовували високоочищені рамноліпіди від Sigma Aldrich для отримання наночастинок міді за методом гідротермічного розкладання. Вони розчиняли купрум (II) хлориду дигідрату у воді та підтримували рН 9-10 за допомогою розчину аміак, та згодом додавали

рамноліпід. Після 10 хвилин інтенсивного перемішування розчин синього кольору перенесли в автоклав, вистелений плівкою Teflon. У цьому автоклаві проводили гідротермічне розкладання при 120 °С протягом 24 годин. Отриманий чорнуватий осад з наночастинками 10 нм і хімічні речовини, що не прореагували в супернатанті, були ретельно розділені центрифугуванням при 12 000 об/хв протягом 10 хв. Очищений зразок сушили під вакуумній сушильній шафі протягом 24 годин. Дані наночастинки характеризувалися високою антибактеріальною активністю (Athira K. Et al, 2021)

Дослідження Singh B. Зі співавт. продемонстрували отримання стабільних наночастинок оксиду цинку з потужними антиоксидатними властивостями. Так як рамноліпіди мають низьку молекулярну масу та високу спорідненість до металів, було отримані високостабілізовані наночастинки оксиду цинку, які не агломерувалися при кімнатній температурі протягом 15 місяців. А ось через 6 місяців значні зміни були зафіксовані в покритих карбоксиметилцелюлозою частинках цинку. Автори припустили, що рамноліпід є кращими блокуючими лігандом через довший вуглецевий ланцюг і наявні подвійні зв'язки в молекули призводить до більш неупорядкованої оболонки і, таким чином, полегшує розчинення. ПАР з довгими хвостами краще стабілізує наночастинки завдяки тому, що легше утворює міцелоподібні агрегати на поверхні наночастинок, ніж карбоксиметилцелюлоза (Singh B. et al, 2014).

Palanisamy P та Raichur отримували наночастинки нікелю оксиду методом зворотних міцел з рамноліпідом. Підвищення рН розчину призводило до зменшення розміру наночастинок NiO від 86 ± 8 нм, 63 ± 6 нм і до 47 ± 5 нм при рН 11,6, 12,0 та 12,5 відповідно. Було зроблено висновок, що при підвищенні рН зменшується тенденція до утворення ламел і везикулярних структур та згодом збільшується утворення міцел ПАР. При рН 5,5 було виявлено майже 81% ламеллярної структури, при рН

8 - міцелярна структура. Тому такі ПАР при лужному рН утворюють наночастинки монодисперсні сферичної форми під час синтезу (Palanisamy P & Raichur, 2009).

1.3.3 Наночастинки сульфідів металів, барію титанату

Існують дослідження Singh B. зі співавт. отримання квантових точок кадмію сульфідів за допомогою поверхнево-активних речовин та інших метаболітів *Bacillus licheniformis*. Інфрачервона спектроскопія показала піки сульфгідрильної групи цистеїну, яка існує в бактеріальних метаболітах, також первинні та вторинні амідні, карбоксильних груп, ароматичних та аліфатичних амінів відповідно. Оскільки більшість піків, пов'язаних з білками та поверхнево-активними речовинами, присутні на ІЧ-діаграмах, можна зробити висновок, що білкові речовини також беруть участь в синтезі та стабілізації наночастиною кадмію сульфідів. супроводжують наночастинки, що було підтверджено TEM-мікрофотографіями (Singh B. Et al, 2011)

Також автори Narayanan J. Та ін. проводили дослідження по отриманню квантових точок цинку сульфідів. Зображення трансмісійної електронної мікроскопії показало, що НЧ ZnS майже сферичні і мають діаметр в діапазоні від 10 до 15 нм для покритих рамноліпідами концентрацією від 0,01 до 0,06 г/л, для покритих натрієм додецилсульфатом - спостерігалася значна агломерація. Тенденція до утворення нанокластерів через високу поверхневу енергію наночастинок є неминучим явищем, яке спостерігається в більшості випадків. Крім того, методика приготування до TEM призводить до агломерації, оскільки частинки осідають на мідну сітку і висушуються. У даному дослідженні катіони з джерела солі ($ZnCl_2$) реагують з негативно зарядженим -COOH рамноліпідного фрагмента при лужному рН. Припускають, що рамноліпід є кращим покриваючим лігандом через довший вуглецевий ланцюг і того

факту, що подвійний зв'язок карбонільної групи призводить до більш неупорядкованої оболонки і, таким чином, полегшує розчинення (Narayanan J. Et al, 2010).

Автори Kamiyan H. та ін. зазначали, що додавання поверхнево-активної речовини у вихідний розчин реакції утворення наночастинок барію титанату помітно знизило швидкість седиментації і зменшило діаметр агрегатів з декількох десятків мікрметрів до 100 нм. Оптимальний вміст цієї поверхнево-активної добавки становив близько 7,1 % мас. для отримання високої стабільності дисперсії та мінімального розміру агрегатів. Додавання поверхнево-активної речовин змінило мікроструктуру агрегатів до дуже щільно упакованої структури. Надлишкове додавання поверхнево-активної речовини в розчин (понад 8,5 мас. %) інгібує реакцію синтезу стехіометричних частинок BaTiO_3 . Оскільки поверхнево-активна речовина була змішана з водним розчином барієм гідроксидом при лужному рН, майже всі групи COONa в цьому ПАВ дисоціюють на карбонільну (COO^-) у воді, та ця група ймовірно утворює комплекс з іонами Ba^{2+} . Також через унікальну молекулярну структуру поверхнево-активної речовини, між іонами барію та біосурфактанту існує простір, через яких дифундують іони титану ($\text{Ti}(\text{OH})_6$) і утворюють комплексну сполуку з барієм (Kamiyan H. Et al, 2003).

Табл.1.3

Використання мікробних поверхнево-активних речовин в синтезі інших наночастинок

Продуцент	Поверхнево-активні речовини	Параметри синтезу наночастинок	Характеристика наночастинок (метал/неметал, пік, форма, розмір, зета-потенціал, полідисперсний індекс)	Джерело
<i>Lactobacillus pentosus</i> СЕСТ-4023Т	Сурфактин	0,25 мМ тригідрат хлорид золота ($\text{Au}_4\text{Cl}_{12} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 5 мл розчину виділених ПАР, 60°C, до появи червоного забарвлення розчину.	Золото, 550 нм, сферична, 33 нм, -30 мВ.	Gomez-Grana et al, 2017
<i>Acinetobacter junii</i> В6	Ліпопептид	12,5 мг/мл ліпопептиду і 0,2 мМ HAuCl_4 (співвідношення об'ємів 1:2), 60°C, до	Золото, 550 нм, сферична та гексагональна, 10-17 нм.	Ohadi M. et al, 2017

		появлення рубіново-червоного забарвлення.		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 424	Рамноліпід	Сира біомаса (0,25 г) в 25 мл дистильованій воді, яку попередньо піддали УЗ-обробці, 1 мМ H ₂ AuCl ₄ , рН 7, 24 год, 150 об/хв, 37°C.	Золото	Tomar R. et al, 2015
<i>Stamerella bombicola</i> MTCC 1910	Софороліпід	40 мкл софороліпиду (100 мг/мл), 10 мл розчину H ₂ AuCl ₄ (400 мкг/мл), 2-3 кр. 100 мМ боргідрид натрію (NaBH ₄), рН 5.5, 80 °С до появи червоного забарвлення.	золото, 530-540 нм, сферична, 40±10 нм , -30±3 мВ.	Shikha S. et al, 2020
<i>Bacillus licheniformis</i>	Сурфактин	Безклітинний водний екстракт (біомасу інкубували в дистильованій воді 96 год), 1мМ CdSO ₄ , 1 мМ Na ₂ S, 35°C,	470 нм, кадмій сульфід, кубічна, 2-10 нм	Bakhshi M et al.. 2020

		150 об/хв, 48 год, жовтий розчин.		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS01	Рамноліпід	Рамноліпід 0,06 г/л, 4,7мМ ZnCl ₂ , 4,7 мМ Na ₂ S, рН 10, 80°С, 6 год.	340 нм, цинк сульфід, сферична, 10-15 нм.	Hazra C. et al, 2012
<i>Ustilago maydis</i> CGMCC 5.203	Манозилеритрол ліпід	200 мкл ПАР і 3мМ HAuCl ₄ (об'ємне співвідношення 1:5), 150 об/хв, 60 °С, рН 8, 30 хв.	золото, 566 нм, сферична, 20 нм	Bakur A. et al, 2019
<i>Candida Bombicola</i> ATCC 22214	софороліпід	0,177 г FeCl ₃ *6H ₂ O, 0,108 г FeCl ₂ *4H ₂ O, 20 мл води MilliQ, 0,409 г кислої форми софороліпиду, 2,7 мл 37% розчину аміаку, 150 об/хв, аргонне середовище, кімнатна температура або 80°С.	Магнетит(FeO·Fe ₂ O 3), сферична, при кімнатній температурі 3-20 нм, при 80°С —3 нм.	Bacille M. et al, 2013

Продовження таблиці 1.3

<i>Pseudomonas sp.</i>	Рамноліпід	0,1 г $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 мл розчин аміаку, 0,1 г рамноліпід, рН 10, 120°C, 24 год.	Купрум оксид, сферична, 10 нм.	Athira, K. et al, 2021
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Рамноліпід	Термальний декомпозиційний метод. 0.178 г FeO_2H , 2,26 г олеїнова кислота, 5 г 1-октадецен, 100 мг/л рамноліпід, 320 °C в середовищі аргону, 3 год.	Магнетит, сферична, 9 нм, -30 мВ.	Sharma, N. et al, 2020
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CEMS077	Рамноліпід	Рамноліпід 50 мг/л і 1 мМ ZnNO_3 (об'ємне співвідношення 1:1), 2-3 кр. NaOH, 80°C, 30 хв.	Цинк оксид, 360 нм, сферична, 57 нм.	Singh B. et al, 2014
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Рамноліпід	Мікроемульсія: 17 г н-гептан, 0,1 г/л розчину рамноліпиду	Нікель оксид, сферична, 64 нм,	Palanisamy, P., & Raichur, 2009

		<p>Розчин А: мікроемульсія і водного 10 мл 1 М $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$</p> <p>Розчин В: мікроемульсія і 10 мл 10 М розчину NH_4OH</p> <p>Змішують обидва розчини, рН 12, 10 хв, 200 об/хв .</p> <p>Перетворення $\text{Ni}(\text{OH})_2$ в NiO проводили при прожарюванні 600 °С протягом 3 годин.</p>		
<i>Bacillus subtilis</i> ВВК006	Сурфактин	<p>50 мл 50 мг/л розчину сурфактину, 50 мл 1 мМ HAuCl_4, 2-3 кр. 10мМ NaBH_4, рН 9, кімнатна температура, 150 об/хв, 5 хв, світло-рожевий колір.</p>	Золото, 528 нм, сферична, 4,7 нм.	Reddy, A. et al, 2009

<p><i>Bacillus amyloliquifaciens</i> strain KSU-109</p>	<p>Сурфактин</p>	<p>50 мл 50 мг/л сурфактину, 50мл 1мМ Cd(NO₃)₂, 2-3 кр 10 мМ Na₂S, кімнатна температура, рН 7,2, 5 хв.</p>	<p>Кадмій сульфід, 350 нм, кубічна, гексагональна, 3-4 нм.</p>	<p>Singh, B. R. et al, 2011</p>
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>	<p>Рамноліпід</p>	<p>Мікроемульсія: 17 г н-гептан, 0,1 г/л розчину рамноліпиду Розчин А: мікроемульсія і водного 10 мл 1 М NiCl₂*6H₂O Розчин В: мікроемульсія і 10 мл 10 М розчину NH₄OH Змішують обидва розчини, рН 8, 15 хв, 200 об/хв . Перетворення Ni(OH)₂ в NiO проводили при прожарюванні 600 °С протягом 3 годин.</p>	<p>Нікель оксид, нанострижні, діаметр 22 нм, 150-250 нм в довжину.</p>	<p>Palanisamy, P., 2008</p>

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC2297	Рамноліпід	4,7 мМ ZnCl ₂ , 470 мг рамноліпиду, 2-3 кр. Na ₂ S, рН 10, 150 об/хв, 80°C. 12 год.	Цинк сульфід, 340 нм, сферична, 1-10 нм	Narayanan, J. et al, 2010
<i>Bacillus subtilis</i> ВВК006	Сурфактин	CaNO ₃ × 4H ₂ O концентрацією 0,2 М і (NH ₄) ₂ НРО ₄ конц. 0,12 М, 10 мл н- гексану в двох центрифужних пробірках 1 г сурфактину. Утворювався білий продукт, який прожарювали при 800 °С протягом 3 год.	Брушит (Ca ₂ P ₂ O ₇), наносфери (16 нм) та голкоподібні (8×80 нм).	Maity, J. P. et al, 2011.
—	рамноліпід	Деполімеризований хітозан 0,5 мг/мл розчиняли у водному розчині оцтової кислоти (0,5% мас.). Розчини рамноліпиду та триполіфосфату натрію (0,5 мг/мл) готували в	Хітозан, сферичні, 288 нм , полідисперсний індекс 0,18, зета потенціал +60,9 мВ (стабільність при рН 6 протягом 6 місяців при 4 градусів)	Marangon, C. A. et al,

		<p>деіонізованій воді. Потім змішували розчин хітозану і рамноліпиду у співвідношенні 1:1 (v/v) 700 об/хв та 25 °С протягом 24 год. 3 мл аліквоти розчину триполіфосфату натрію потім додавали по краплях до суміші C/RL при 700 об/хв. НП центрифугували протягом 20 хв при 14 000 об/хв при 4 °С і ресуспендували в розчині оцтової кислоти (рН 4,0).</p>		
<i>B. subtilis</i> ВВК006	Сурфактин	Золь-гель метод. 0,57 г ПАР розчиняли в 50 мл деіонізованої води, додавали 11 мл	Наночастинки кремнезему, пік 262 нм, сферичні .	Sharma R. et al, 2021

		25 %-ного аміаку та 76 мл етанолу і по краплях 10 мл тетраетилортосиліка т і перемішували 1 год 45 хв. Осад промивали деіонізованою водою та метанолом, висушували		
—	рамноліпід	0,4 М розчин тетраізопропоксиду титану в ізопропіловому спирті 11,4 г $Ti[OCH(CH_3)_2]_4$ в ізопропіловий спирт (до 100 мл. Готували 0,2 М водний розчин $Ba(OH)_2$ шляхом змішування 10,1 г $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$, 156,7 мл	Барій титанат ($BaTiO_3$), розмір 20-30 нм	Kamiya, H. et al, 2003.

		дистильованої води та 10,7 мл 12N розчину NaOH та ПАР 7,1% (мас). Змішували дані розчини при рН 13 і 80°C, перемішували 90хв та продували азот, щоб запобігти утворення BaCO ₃ .		
<i>Starmerella bombicola</i> ATCC 22214	софороліпід	Змішували куркумін 1 мг/мл з софороліпідом 5 % (м/об).	Куркумін, пік 420-440 нм, сферичні, 100 нм, -38.41мВ, 0,27.	Vasudevan S, & Prabhune AA.. 2018

РОЗДІЛ 2. АНТИМІКРОБНА ДІЯ НАНОЧАСТИНОК СИНТЕЗОВАНИХ ЗА ДОПОМОГОЮ БІОЛОГІЧНИХ ПОВЕРХНЕВО- АКТИВНИХ РЕЧОВИН

2.1 Механізми антимікробної дії утворених наночастинок металів

Наночастинки в даний час вважаються альтернативою антибіотикам і мають високий потенціал для вирішення проблеми бактеріальної мультирезистентності. Стратегії, за якими бактерії набули антибіотикорезистентності добре відомі: отримання генів стійкості, утворення біоплівки, зміна цільового білка/структури клітини, системи виведення антибіотика (ефлюксні насоси). Однак всі ці механізми не впливають на дію AgNPs. Як було встановлено, що наночастинки мають антимікробний ефект навіть у випадку, коли у бактерій є механізми стійкості. Додатково AgNPs мають здатність інгібувати утворення біоплівки, руйнуючи сигнальні молекули та екзополісахариди, що робить їх більш вразливими до дії навколишнього середовища (Bhuna T. та ін., 2021)

2.2 Антибактеріальна дія наночастинок

Хоча точний механізм антибактеріальної дії наночастинок срібла до кінця не з'ясований, наразі існують різні варіанти. Завдяки електростатичному притяганню та спорідненості з білками сірки іони срібла можуть прилипати до клітинної стінки та цитоплазматичної мембрани. Прилиплі іони можуть посилити проникність цитоплазматичної мембрани і призвести до перфорації клітини. Після поглинання вільних іонів срібла ферменти дихального ланцюга можуть бути дезактивовані, в подальшому утворюючи активні форми кисню (АФК). АФК можуть бути основним чинником у руйнування клітинної мембрани та модифікації ДНК. Наночастинки також можуть взаємодіяти безпосередньо з ДНК.

					НУХТ БТЕК 02.01.08 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дзюба М.В.			РОЗДІЛ 2	Літ.	Арк.	Акрушіє
Консульт.					Антимікробна дія наночастинок синтезованих за допомогою біологічних поверхнево-активних речовин		10	10
Керівник		Скροцька О.І.			Кафедра БТМ			
Н. Контр.								
Зав.каф.		Стабніков В.П.						

Крім того, можуть пригнічувати синтез білків, денатуруючи рибосоми в цитоплазмі (Franci G. та ін., 2015)

Грамнегативні бактерії є більш стійкими до дії наночастинок срібла, що підтверджується меншою зоною інгібування в дослідження Bezza G., Das M., Atwan Q. Така сама ситуація прослідковується в дослідження Athira K. і при дії наночастинок оксиду міді: МІК спостерігаються при низьких концентраціях для грампозитивних бактерій (*Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) - 7,8 мкг/мл, а для грамнегативних бактерій *Shigella dysenteriae* та *Salmonella typhi* - 250 мкг/мл. Shikha S. зі співавт. пояснюють таке явище будовою зовнішньої мембрани, які складаються з білків (поринів), що швидко виводять чужорідні сполуки з клітин.

2.3 Протигрибкова дія

Спостерігалася протигрибкова дія, що була пов'язана з пригніченням проростання спор, росту зародкової трубки, продукції мікотоксинів та пошкодженням клітинних мембран. Автор Durval I. виявив, пригнічення росту *P. fellutanum* було близьким до 100% за всіх концентрацій AgNPз, включаючи 16,5 мкг/мл. Але для *C. cladosporioides* спостерігали найнижчі показники пригнічення росту, від 41,48% до 66,67%. Інші дослідження також показали непогані результати порівняно з позитивними контролями (10 мкг/мл ципрофлоксацин, флуконазол 1 мг/мл) зона інгібування становила 9,96 та 8,76 мм для *A. niger* та *A. flavus* відповідно (Das M. та ін., 2016).

Gomez-Grana S. зі співавт. порівнювали антимікробну активність наночастинок срібла, які були стабілізовані бактеріальним та хімічним цитратним поверхнево-активними речовини. Та показали, що покриті біосурфактантом демонструють вищий відсоток (на 20%) пригнічення *E. coli* при 0,125мМ, ніж цитратні.

В багатьох дослідження проводили контрольні досліди з чистими ПАР та наночастинками, які не були стабілізовані ними. Наприклад, наш співвітчизник Vazylyak L. показав сильнішу антибактеріальну дію до фітопатогенів виду *Agrobacterium tumerifaciens* наночастинок срібла

стабілізованих рамноліпідним комплексом (МІК 0,135 мкг/мл) на відміну від наночастинок срібла, які не були стабілізовані (не мав інгібувальної дії) та чистих поверхнево-активних речовин (МІК 10 мкг/мл). Схожі результати отримали Bezza F. зі співавт. для обох організмів *P. aeruginosa* CB1, *B. subtilis* CN2, МІК НЧ стабілізовані ПАР становив 15 мкг/мл, в той час як не стабілізовані AgNPs не виявляли антимікробної дії. Вони пояснюють тим, що під час синтезу вони піддалися агломерації відразу та зросли в розмірах, внаслідок чого втратили протимікробну дію. Тому стабілізація наночастинок є важливим етапом для збереження їх біологічної активності.

2.4 Антибіоплівкова дія

Щодо антибіоплівкової активності Khalid зі співавт. пояснюють, що амфіфільна природа рамноліпиду дозволяє йому проникати і блокувати прилипання клітин до поверхні. Як тільки загальна структура біоплівки змінюється під дією поверхнево-активної речовини, клітини стають більш вразливими до дії наночастинок, які здатні проникати крізь клітинну мембрану, спричиняючи загибель. Свідчення цього, є дослідження впливу по окремоті рамноліпідів, наночастинок срібла та НЧ покриті даним поверхнево-активною речовиною на біоплівки. Результати руйнування біоплівки *P. aeruginosa* – 88%, та *S. aureus* – 91% за участі наночастинок стабілізованих ПАР показав найкращий результат, на відміну під дією одного рамноліпиду (58%). Таким чином, наночастинок з покриттям ПАР можуть виявитися більш ефективнішими для багатьох традиційних методів лікування, включаючи використання лише антибіотиків (Khalid та ін., 2018).

Отже, наночастинок срібла стабілізовані поверхнево-активними речовинами чинять потужну антибактеріальну, протигрибкову, антибіоплівкову дію. Механізм таких дій до кінця не встановлений, але ряд досліджень припускають, що вони пригнічують реплікацію ДНК, дезактивують ряд ферментних систем клітин, зокрема ферменти електрон-транспортного ланцюга, що призводить до синтезу великої кількості АФК (активних форм кисню), зв'язуються з іншими білками всередині

мікроорганізмів. У таблиці 2.1 наведено приклади та результати антимікробної дії наночастинок, синтезованих за допомогою біологічних поверхнево-активних речовин.

Таблиця 2.1

Антимікробна активність наночастинок, синтезованих за допомогою біологічних поверхнево-активних речовин

Продуцент (ПАР)	Тест культура	Наночастинки (форма, розмір)	Зона затримки і росту (мм)	Мінімально інгубуюча концентрація (мкг/мл) та показник інгібування (%)	Джерело
<i>Bacillus subtilis</i> CN2 (сурфактин)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bacillus subtilis</i>	AgNPs (сферична, 20 нм)	10 12	15,6	Plaza G. та ін., 2020
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> МКВІТЗ (рамноліпіди)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i>	AgNPs (сферична, 18 нм)	10,8 8,73 10,32 9,45 9,96 8,76	-	Das M. та ін., 2016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS-161R (рамноліпіди)	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella planticola</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida albicans</i>	AgNPs (сферична, 15 нм)	н.в.*	7.81 7.81 15.62 7.81 15.62 7.81	Kumar C. та ін., 2010

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LTR 1 (рамноліпіди)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas vulgaris</i>	AgNPs (сферична, 36 нм)	18 18 19 16 20	10	Deshmukh N. та ін., 2022
<i>Pseudomonas</i> sp. PS-17 (рамноліпіди)	<i>Agrobacterium tumerifaciens</i>	AgNPs (сферична, 3 нм)	н.в.	0,135	Bazylyak L. та ін., 2020
<i>Bacillus cereus</i> UCP 1615 (сурфактин)	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium fellutanum</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i>	AgNPs (сферична, 20 нм)	н.в.	16,5 (85, 100, 65,6)	Durval I. та ін., 2021
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Q1(рамноліпіди)	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	AgNPs (сферична, 38 нм)	14 17	1000	Atwan Q. та ін., 2020
<i>Lactobacillus brevis</i> MTCC 4463	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida sp.</i>	AgNPs (трикутна, 18 нм)	38 36	7,81	Kulkami та ін., 2019
<i>Bacillus vallismortis</i> MDU6 (сурфактин)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 751- <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9542 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	AgNPs (сферична, 70 нм)	19 17 16 12	50	Das M. та ін., 2019
<i>Bacillus subtilis</i> Г'-1а	<i>Paenibacillus bercinonensis</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype G <i>Bordetella petrii</i>	—	12 16 17,6 14,8	1,7	Joanna C. та ін., 2018

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (рамноліпіди)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	AgNPs (сферична, 35 нм)	н.в.	1000 (92%, 88%)	Khalid та ін., 2018
<i>Brevibacillus brevis</i> KN8 (сурфактин)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AgNPs (кубічна, 15 нм)	н.в.	10	Krishnan N. та ін., 2018
<i>Pseudomonas</i> sp., (рамноліпіди)	<i>Escherichia coli</i>	AgNPs (сферична, 70-90 нм)	6	10000	Das A. та ін., 2016
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	AgNPs (сферична, 5-60 нм)	н.в.	1,6 (75, 30, 10)	Gomez- Grana S. та ін., 2017
<i>Padina gymnospora</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>	AgNPs (сферична, 20 нм)	13,4 15,4	200	Rajaboopati S. та ін., 2018
<i>Acinetobacter junii</i> B6 (ліпопептиди)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 <i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 13883 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051 <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698	AuNPs (сферична, гексагональна, 10-17 нм)	н.в.	2500 2500 5000 5000 5000 5000 5000	Ohadi M. та ін., 2017
<i>Stamerella bombicola</i> MTCC 1910 (софороліпіди)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Vibrio cholerae</i> .	AuNPs (сферична, 40 нм)	15 15	25	Vasudevan S та ін., 2018

н.в. (рамноліпід)	<i>S. aureus</i> DSM 1104 <i>S. aureus</i> DSM 2569 <i>S. epidermidis</i>	Хітозанові НЧ (сферичні, 288 нм)	н.в.	14 29 7	Marangon С. та ін., 2020
----------------------	---	-------------------------------------	------	---------------	--------------------------------

н.в.* - не визначали методом тест-дифузіїю в агар, а визначали за відновленням барвників в суспензійній культурі

РОЗДІЛ 3

РОЛЬ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА БІОСЕНСОРАХ

3.1 Електрохімічні біосенсиори

Електрохімічні біосенсиори показують високу чутливість, економічну ефективність та простоту (Yazdanparast S. et al, 2018). Наночастинки срібла мають ряд переваг в використанні їх в складі таких біосенсорів:

- Сприяють покращенню електропровідності за рахунок передачі електронів між біомолекулами і електродом. Це дозволяє чіткіше детектувати електричні сигнали, які виникають під час реакції на поверхні сенсора.
- Збільшення площі поверхні електрода, що дозволяє розмістити більше біорецепторів (антитіла, ДНК-зонди, ферменти) і тому більше молекул-мішеней може захопитися, дозволяючи виявляти низькі концентрації біомаркерів.
- Каталізують окисно-відновні реакції. При контакті з аналітом або в умовах подачі певної напруги срібло окиснюється, переходячи в форму іонів срібла (Ag^+). Це допомагає прискорити і підсилити електрохімічні процеси (Yu C. et al, 2020)

У біосенсорах наночастинки срібла зазвичай використовуються у **певній формі (трикутна, сферична, кубічна) або наноплівки**, нанесених на поверхню електрода. Вони можуть наноситися на електрод шляхом хімічного або електрофоретичного осадження, щоб утворити стабільний шар, який стійкий до вимивання.

					НУХТ БТЕК 02.01.08 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3 Роль наночастинок срібла в біосенсорах	Літ.	Арк.	Акрушіє
Розроб.		Дзюба М.В.					46	15
Консульт.						Кафедра БТМ		
Керівник		Скороцька О.І.						
Н. Контр.								
Зав.каф.		Стабніков В.П.						

Також AgNPs стабілізуються додатковими захисними покриттями (полімери), щоб зменшити їхню швидку корозію та забезпечити стабільність протягом більш тривалого часу використання сенсора (El Badawy A.M. et al, 2012; Fahmy H.M. et al, 2019)

Nakimian F. зі співавт. використовували в своїй роботі наночастинки срібла в складі вольтампераметричного біосенсору у виявленні мікроРНК-155, які є потенційним біомаркером раку молочної залози. Даний пристрій складався з золотого електрода на якому була розташована тіолова підкладка до якої кріпився рецептор (зонд) до мкРНК-155. Потім абсорбувалися до негативно зарядженої підкладки поверхнево позитивно заряджені наночастинки поліетиленімін-срібло. Електрохімічний сигнал проявлявся як анодний піковий струм, який утворювався після окиснення AgNPs. Розроблений біосенсор мав лінійний діапазон виявлення біомаркеру від $2 \cdot 10^{-20}$ до $2 \cdot 10^{-12}$ моль. Автори Elkamin H.K. та ін. досягали іншу межу виявлення мкРНК let-7a в 10^{-18} моль, що є онкомаркером у пацієнтів з гепатоцелюлярною карциномою. Біосенсор складався з модифікованого електрода з вугільної пасти з наночастинками срібла, які були адсорбовані на бджолиному прополісі. Виявлення молекули мкРНК базувалося на окисненні азотистої основи гуаніну внаслідок гібридизації між мікроРНК та її комплементарною частиною (зонд захоплення ДНК). Як сигнал служив піковий струм, що виникав внаслідок перенесення заряду від AgNPs, який утворювався між гідроксильною групою в положенні 2' рибози ДНК-зонда та з гуаніном неподіленої пари електронів на азоті мікро-РНК.

В роботі Meng F. та ін був створений прилад для виявлення раку простати на основі простатоспецифічного антигену (ПСА), який виявляється в підвищеній експресії онкоклітинами в сироватці крові. Діагностичне виявлення даного раку потребує виявлення результатів з граничними значенням до 4 нг/мл, а для прогнозування післяопераційного рецидиву значення повинно становити ще менше, в області пг/мл. Тому було розроблені ультрочутливий метод з використанням наночастинок срібла в складі

біосенсору. З огляду на те що простатоспецифічний антиген є сериною протеазою, на золотий електрод був іммобілізований субстратний пептид через N-кінці цистеїну. Потім прикріплювався оксид графену шляхом взаємодії з бензольним кільцевим фрагментом ароматичної амінокислоти пептиду. Іони срібла спочатку прикріплюються до функціональних груп оксиду графену, які відновлюють до наночастинок, що більше посилюють кінцевий сигнал. За наявності ПСА відбувається розщеплення пептиду субстрату на поверхні електрода, що унеможливує прикріплення оксиду графену і наночастинок срібла, тому сигналом є зміна струму на поверхні електроду (Meng F. Et al, 2019)

В статті Singh P. зі співавт. було виявлено електрохімічним біосенсором раковий ембріональний антиген, який служить в клінічній діагностиці як показник розвитку солідних пухлин мозку, сечового міхура, прямої кишки і т.д. Наночастинки срібла були отримані шляхом цитратного відновлення солі аргентуму, які згодом поєднали з наночастинами сіліцію оксидом та прикріплювали до електрода з оксиду олова та індія. До срібно-кренієвої підкладки прикріплювали антитіла та бичачий сироватковий альбумін для блокування надлишкових активних груп антитіл. Цей метод базувався на імпедансі, тобто визначення комплексу антиген–антитіло шляхом вимірювання міжфазного опору передачі заряду. Як тільки раковий ембріональний антиген зв'язується з функціоналізованими наночастинами, імпеданс на межі системи електрод–розчин змінюється внаслідок стеричної перешкоди. Сигнал згодом проявляється у зниженні відгуку пікового струму (Singh P. et al, 2021)

Також Zhang Y. зі співавт. використовували наночастинки срібла в поєднанні з золотими для створення електрохімічного біосенсора для виявлення летючих біомолекул (октанон, бутанол) ліній клітин раку шлунка MGC-803 і GES-1. На скловугільний електрод наносилися вуглецеві нанотрубки та сферичні наночастинки золота та срібла. Внаслідок окиснення

летючих газів на поверхні сенсора відбувалася зміна пікового струму, що свідчило про наявність та кількість онкомаркерів (Zhang et al, 2014).

3.2 Оптичні біосенсиори

AgNPs володіють особливими оптичними властивостями, які дозволяють використовувати для виявлення датчиками біомолекул в найменших концентраціях. Наприклад, поверхневий плазмонний резонанс, внаслідок якого при зв'язуванні з аналітом змінюються сигнали виявлення як зсув плазмонної смуги або показник заломлення. Наночастинки срібла також посилюють флуоресценцію на невеликій відстані (5–90 нм) від флуорофору, що приводить до збільшення згальної чутливості датчика. Також ці властивості зумовлюють використання наноматеріалу в якості мітки в раманівській спектроскопії (Loiseau A. et al, 2019; Su H. et al, 2017)

Наночастинки срібла та їх поєднання з іншими наноматеріалами та полімерами (силіцій оксид, вуглецеві структури) наносять на підкладки біосенсорів, які будуть специфічно зв'язуватися з онкомаркерами. Коли молекула притягується до біорецептора з наноматеріалом, вся структура опромінюється лазером певної довжини хвилі світла, і створюється плазмонний резонанс, який значно посилює раманівський індивідуальних спектр молекули-мішені. Цей сигнал фіксується датчиком і визначають наявність і концентрацію біомаркера (Akim A.M. et al, 2022)

Наприклад, Wang X. зі співавт. представили безпосередній синтез AgNP як мітки та підсилювач сигналу. Ланцюги ДНК (специфічний захоплювач до мікроРНК) прикріплені на сенсорі можуть розгортатися й утворювати двоспиральну ДНК при захопленні цільового аналіту. Іони срібла в реакційному середовищі потрапляють в таку ДНК і додається відновник, що сприяє синтезу наночастинок срібла, які змінюють аналітичний сигнал кута плазмонного резонансу після опромінення лазером. Як результат різниця кута до прикріплення наночастинок срібла і молекули-мішені до сенсору та після

використовується в калібрувальній шкалі та в розрахунку концентрації мікроРНК (Wang X. et al, 2019). Іншу роботу представили автори Wang H.-N. та інші інакше використання наночастинок в якості носіїв ДНК-зондів для виявлення ряд мікроРНК 149,125b, let-7a та 21. До синтезованих наночастинок срібла прикріплювали окремо 2 комплементарних одноланцюгових ДНК, один вид такого кон'югату мав раманівську мітку, інший ні, тому при їх з'єднанні посилювався раманівський сигнал. Принцип базувався на тому, що при наявності мікроРНК, які конкурували за прикріплення до ДНК-зондів з комплементарними ланцюгами ДНК, які несли на собі раманівську мітку, пік плазмонного резонансу різко зменшувався та виникали характерні піки для мікроРНК. Це можна бачити на спектрах раманівського зміщення кута (Wang H.-N. Et al, 2019)

Gao L. зі співавт отримували наночастинки срібла цитратним відовленням, які згодом змішували та інкубували з біологічними молекулами клітин щитоподібної залози, отримані після проведення тонкогілкової біопсії. Згодом цю суміш поміщали в кварцовий капіляр рамановського спектрометра. Спектр SERS ракових і доброякісних зразків мали різне співвідношення піків за довжин хвиль 749, 1037 і 1618 cm^{-1} , що свідчить про наявність біомаркерів (фосфоліпіди, цитохром с, колаген, тощо), які відповідальні за розвиток папілярної карциноми щитоподібної залози (Gao L. et al, 2024)

В своїх дослідженнях Zhou W. зі співавт. використовували трикутні наночастинки срібла для знаходження рівня в сироватці білка p53 у пацієнтів хворих на плоскоклітинну карциному шкіри голови та шиї методом локалізованого плазмонного резонансу. Використовували скляну підкладку, на яку наносилися трикутні наночастинки, в подальшому до них прикріплювали антитіла до білка p53 через сульфгідрильні групи меркаптоундеканової кислоти. Згодом на такий біочіп наносили сироватку пацієнтів та визначали рівень онкогенного маркера, який становить у хворих приблизно 59 пг/мл. Схожий експеримент був проведений Yuan J. зі співавт. на виявлення секреторного білка 4 яєчників людини (HE4). Біосенор був

виготовленим схожим методом попереднього дослідження, окрім того що наносилися антитіла до HE4. Даний біочіп з наночастинками срібла зміг досягти найнижчу граничну межу виявлення в кількості онкомаркера в сироватці 10^{-12} моль (Zhou W. et al, 2011; Yuan J. et al, 2012).

Авторами Gu Z. та ін. було розроблено біочіп у вигляді пластиру з золотими мікроголками, до яких кріпився субстрат та наночастинки срібла. Даний біочіп був розробленим для виявлення тирозинази, одного з важливого біомаркера меланоми шкіри, та не потребував біологічних рідин для виявлення даного ферменту. Він прикріплювався до ділянки шкіри, яка мала меланому. Наночастинки золота слугували підкладкою для подальшого прикріплення дофаміну (субстрату тирозинази) та наночастинок срібла, які підсилювали раманівський спектр поверхні біочіпа. Дані мікроголки опинялися всередині епідермісу, в яких містилася тирозиназа, яка зумовлювала окиснення дофаміну до дофамінхінону. Під час такої реакції руйнувалася взаємодія між наночастинками срібла та золотої підкладки, що призводило до зменшення поверхнево-комбінованого розсіювання, і як наслідок дозволяло виявити рівень біомолекули по характерним зменшенням піків (Gu Z. et al, 2024).

Наночастинки срібла були використані як підсилювач флуоресценції у виявленні онкомаркерів яєчників білків CA125 та HE4 у статті Geka G. зі співавт. Підкладка сенсору складалася з нанодротів кремнію, до яких кріпилися наночастинки. В подальшому на підкладку кріпилися антитіла до білків та реакцію проводили в середовищі разом з вторинними антитілами, які були мічені стрептавідиновим субстратом з флуоресцентною міткою родаміном, та опромінювали зеленим діодним лазером (Geka G. et al, 2023). Jafari M. зі співавторами також визначали концентрацію білка CA125 але вже електрохімічним методом та досягли показник межі чутливості у 0,01 Од/мл, що у 25 разів перевищили за чутливість попереднього оптичного біосенсора (2,5 Од/мл). Можна припустити, що в цьому зіграло роль використання графітових квантових точок, що разом з наночастинками срібла, виявляють більшу ефективність електронного переносу та каталітичні властивості, тобто

являють собою підсилювачі електронного сигналу. Дана установка базувалася на імпедансі, що утворювався внаслідок зменшення кінетики електронного переносу або навіть його блокуванні, який створювався комплексом антитіло-антиген на поверхні електрода. Дані методи в майбутньому зможуть виявити потенційне ракове захворювання, біомаркер якого СА125 перевищує 35 Од/мл в сироватці крові (Jafari M. et al, 2019).

Ще одним цікавим відкриттям поділилися Nasirian A. зі співавторами у використанні наночастинок срібла разом з флуоресцентним червоним барвником цианіном 5,5 у виявленні мікроРНК-121, важливого біомаркера у діагностиці раку молочної залози. AgNPs синтезувалися та прикріплювали до них ДНК-зонди до цільової мкРНК. Принцип виявлення базувався на гібридизації рецептора (ДНК прикріпленої до наночастинок) та мішені (біомаркер), додатково приєднувався до ДНК-зонда червоний флуоресціюючий барвник цианін, до якого кріпився олігонуклеотид. Внаслідок утворення такого комплексу відбувалося резонансна передача енергії Фьорстера, тобто під час потряпання випромінювання на наночастинок срібла згенерована енергія згодом передавалася на флуоресціюючий барвник цианін, який посилював сигнал виявлення в декілька порядків. Як результат такої взаємодії, нижня межа виявлення мкРНК-121 досягла до $4 \cdot 10^{-3}$ нМ (Nasirian A. et al, 2020).

Отже, існують різні методи використання наночастинок срібла в складі біосенсорів. В таблиці 3.1 наведено приклади морфологічних та фізико-хімічних характеристик використовуваних наночастинок в біосенсорах для виявлення онкомаркерів, параметрів синтезу AgNPs, та межі виявлення таких біосенсорів.

Таблиця 3.1

Використання наночастинок в біосенсорах для виявлення онкомаркерів

Онкомаркер	Метали/неметали в складі наночастинок	Тип біосенсору	Характеристика NPs (розмір, форма, дзета-потенціал)	Синтез наночастинок/нанокомпозиту	Межа виявлення	Джерело
	Срібло	Електрохімічний (вольтамперометрія)	35 нм	—*	10^{-18} моль	Elhakim K.A. та ін., 2018
МікроРНК let-7a (гепатоцелюлярний рак)	Оксид заліза, срібло, золото	Оптичний (раманівська спектроскопія з поверхневим розсіюванням)	400 нм, сферична	0,2 г Fe ₃ O ₄ , поліетиленімін 0,25 г/50 мл, УЗ, 2 год, 0,25 мл AgNO ₃ 0,2 мас.%, 150 мкл 37%-формальдегід, 300 мкл 25% розчин аміаку.	$1 \cdot 10^{-15}$ М	Pang Y. Та ін., 2016

МкРНК-155 (рак молочної залози)	Срібло	Електрохімічний	32,2 нм, сферичні, +46,24мВ	25 мл 9 мМ AgNO ₃ змішували з 5 мл поліазиридин (50% розчин), 100°С, інтенсивне перемішування, 15 хв, зміна кольору до зелено-сірого. Осад центрифугували та промивали деіонізованою водою.	2*10 ⁻²⁰ моль	Наkimian F. та ін., 2020
	Золото	Оптичний (колориметричний)	Сферична, 22 нм	1,5 мл 1% цитрату натрію, НАuCl ₄ 0,8 мМ, 300 об/хв, 15 хв, розчин з блідо-жовтого до темно-рожевого.	1*10 ⁻¹⁹ М	Наkimian F. та ін, 2018
Простатоспецифічний антиген (PSA)	Срібло	Електрохімічний (імпеданс і вольтамперометрія)	сферичні	100 мкл 20мМ AgNO ₃ змішували з 600 мкл суспензії оксида графену (1,0 мг/мл) і 700 мкл надчистої води, перемішування, рН 8,0.	0,33 пг/мл	Meng F. та інші, 2019

Раково-ембріональний антиген (СЕА) солідних пухлин	Срібло	Електрохімічний (імпеданс і вольтамперометрія)	80 нм, сферичні, - 21,7мВ	98 мл 1,5 мМ AgNO ₃ змішували з 5 мл 1% тринатрійцитрату ,100 °С, перемішування.	0,01 нг/мл	Singh P., та ін., 2021
	полі(3,4-етилендіоксифен): полі(стиролсульфонат) і оксид заліза		Сферична, 12 нм	—*	4 нг/мл	Kumar S. та ін., 2019
Онкоклітини щитоподібної залози	срібло	Оптичний (раманівська спектрометрія)	45 нм	15 мкл 1 М водного розчину AgNO змішували з 2 мл водним розчином цитрату натрію (1 мас.%), 3 мкл 2М натрій хлорид, 50 мкг 1М аскорбінової кислоти, 100°С, темрява. Розчин жовтого забарвлення.	—*	Gao L. та ін., 2024
Білки СА125, HE4 раку яєчників	срібло	Оптичний (фотолюмінісценція)	120-150 нм, агреговані частинки	0,02 М AgNO ₃ і 4,8 М HF, 3,5 хв.	Для СА125 2,5 ОД/мл,	Geka G. та ін, 2023

					Для He4 ~0,05нГ	
Білок p53 (карцинома шкіри голови та шиї)	срібло	Оптичний (локалізований плазмонний резонанс)	Ширина 120 нм, висота 45 нм, трикутні	Термічне випаровування	—*	Zhou W. та ін., 2011
Білок HE4	срібло		—*	Наносферна літографія	11,4 пМ	Yuan J. та ін., 2012
Тирозиназа (меланома)	срібло	Оптичний (раманівська спектрометрія)	—*	AgNO ₃ 18 мг розчиняли в 100 мл деіонізованій воді і змішували з 5 мл 1% натрієм цитрату, 100°C, 1 год.	0,05 Од/мл	Gu Z. та ін., 2024
Леткі біомолекули ракових клітин лінії MGC-803, GES-1	срібло	Електрохімічний	20-25 нм, сферичні	0,1 мг/мл водний розчин вуглецевих нанотрубок, рН=7,5, додали 1 мл 10 мМ розчину 1 AgNO ₃ , 25 °C ,12 год.	Октанон – 0,0003 ppm, Бутанон - 0,00055 ppm	Zhang Y. та ін., 2014
Білок CA125 раку яєчників	срібло	Електрохімічний (імпеданс)	Різна форма	Змішували 0,6 г графіту , 0,4 г полівінілпіролідон, 2	0,01 Од/мл	Jafari M., 2019

				мл розчину графітових квантових точок, 0,02 г AgNO ₃ , інкубують 60 °С, 12 годин. Потім додають 0,12 г NaOH.		
МікроРНК 149, 125b, let-7a, 21	срібло	Оптичний (раманівська спектрометрія)	Сферична, 35 ± 6.3 nm	90 мл 1,67М гідроксиламіну змішували з 3,3М натріє гідроксиду та 10 мл 10М аргентум нітрату, 300 об/хв, 1 год, кімнатна температура.	—	Wang H.-N. та ін., 2019
МікроРНК 121 раку молочної залози	срібло	Оптичний (люмінісценція)	Сферична	Змішували AgNO ₃ з NaBH ₄ з пропорцією 1:1 моль, 300 об/хв, 6 год, темрява.	4.0×10 ⁻³ нМ	Nasirian V. та ін., 2020
Цитокератин 19 фрагмент 21-1 (CYFRA 21-1) раку легень	Композит карбонові нанотрубки, Силіцій нітрид, молібден дисульфід	Електрохімічний (вольтамперометричний)	20 нм, багатокутник	Порошок 250,0 мг MoS ₂ і 250 мг Si ₃ N ₄ промолюють разом 15 год, 200 об/хв. Потім додають 50 мг карбонових нанотрубок, 100 мл	2 * 10 ⁻¹⁵ г/мл	Yola M. та ін., 2021

				диметилформаміду, 90 хв, ультразвук.		
	Графітова піна та срібло		сферична	1,2 г AgNO ₃ 30 крапель/хв, , 3 г глюкози, 1 г полівінілпіролідон рН 11, 70°C.	1*10 ⁻¹⁴ М	Chen M. та ін, 2018
МкРНК 155, 21, 210 раку молочної залози	Композит наночастинок золота, графенові квантові точки, плівка оксид графену	Електрохімічний (волтамперометр ичний)	Зморшкув аті листоподіб ні структури, в яких рівномірно розводілен і наночасти нки золота.	Оксид графену – метод Хаммерса. AuNPs, - цитратне відновлення. HAuCl ₄ .	мкРНК 21- 0,04*10 ⁻¹⁵ М мкРНК 155 – 0,33 *10 ⁻¹⁵ М мкРНК2 10 – 0,28*10 ⁻¹⁵ М	Pothipor С. та ін., 2021
Фактор росту тромбоцитів раку яєчників	Золото	Оптичний (колориметричн й)	100 нм, Трикутні	HAuCl ₄ 0,0005 М, тринатрій цитрату 0,0005 М, 0,1 М NaBH ₄ , 2-3 год аскорбінова кислота 0,1 М .	0,01 мкг/мл	Hasan M.R. та ін, 2022

Клітини раку молочної залози людини MDA-MB 231	полі(2-гідроксіетилметакрилату)	Механічний (кварцові мікроваги)	58 нм, сферичні	Перша фаза: 93,7 мг полівініловий спирт, 14,4 мг додецилсульфат натрію (SDS) і 11,7 мг бікарбонату натрію. Друга фаза 50 мг полівініловий спирт, 50 мг SDS. Мономерна фаза: 0,45 мл гідроксиетилметакрилат та 1,05 мл диметакрилат етиленгліколю. Змішували фази 600 об/хв. 40 °С, 57,3 мг бісульфіду натрію та 63 мг персульфату амонію.	500 кл /мл	Atay S. та інші, 2016
Епідермальний фактор росту 2 (HER-2) молочної залози	Золота та вуглецеві нанотрубки	Електрохімічний (вольтамперометричний)	довжина 3,4, ширина 1,0, висота 0,05 нм, нанотрубки	—*	4,4 пг/мл	Makableh Y. та ін., 2023
HER-2 та CD 24 раку молочної залози	Золота та графіт оксид	Електрохімічний (амперометричний)	13 нм	Оксид графіту: 10 г порошку графіту	0,16 нМ – HER-2	Saeed A.A. та ін, 2017

				,15 мл розчину концентрованої H ₂ SO ₄ , 5 г K ₂ S ₂ O ₈ , 5 г P ₂ O ₅ , 6 год. Додавали 6 г калій перманганат, 35°C і перемішували, 300 об/хв, 2 год. НЧ золота: 20 мг хлориду золота (III). тригідрату до деіонізов. води 192 мл, 100°C, 8 мл 1% тринатрій цитрат.	0,23 нМ – CD-24	
Пероксид водню, що виділяються раковими клітинами лінії MCF-7	Бісмут селенід, золото	Електрохімічний (вольтамперометричний)	Сферична, 23 нм	—*	10 нМ	Mohamma dniaei M. та ін., 2018
Порфобіліногенд езаміназа лейкемії	Золото		Сферична, 70 нм	Електрохімічне осадження	1*10 ⁻¹² моль/л	Ensafi A. та ін., 2011
Тиреотропний гормон, рак щитоподібної залози	платина	Оптичний (хемілюмінісцентний)	Сферична, 30 нм	—*	0,005 Од/мл	Choi G. та ін., 2017

Ракові клітинні лінії MCF-7, T47D, SK-BR-3, and BT-474, які багато експресують HER-2 та MUC-1 that	силіцій	Оптичний (флуоресценція)	Сферична, 90 нм, -28мВ	3 мг PEG-SiNP, 3 мл 2 М Na ₂ CO ₃ , 3 мл СНBr, 0,8 г/мл ацетонітрилу, рН7,4, 15 хв, кімнатна температура.	10 кл/100мл л	Pang та ін., 2015
Адгезивні молекули епітеліальних клітин (EpCAM)	Оксид графену та титану	Електрохімічний	НЧ Оксиду титану – 30-40 нм, сферична	Оксид графену: 0,450 г порошку графіту, суміш концентрованої H ₂ SO ₄ :H ₃ PO ₄ (9:1), 9 г KMnO ₄ , 12 год, 35 °С. TiO ₂ : 15 мл тетрабутилтитанату, 1500 мл деіонізована вода, 300 об/хв, 24 год. Сушіння при 80 °С, 10 год. Прожарюювання при 500 °С 3 год	0.0065 нг/мл	Jalil O. та ін., 2020
Клітини лінії гострого лімфобластного	Золото та оксид заліза (Fe ₃ O ₄)	Електрохімічний	—*	Оксид заліза: FeCl ₃ ·6H ₂ O 8,5 г, FeCl ₂ ·4H ₂ O 3 г, хлоридна кислота 40 мл, 0,4 М, аміачний розчин	10 кл/мл	Khoshfetr at S. та ін., 2017

Продовження таблиці 3.1

лейкозу людини (CCRF-CEM)				400 мл, 0,7 М, середовище аргон, 300 об/хв. Золото: 1,71 мМ HAuCl_4 10 мл, 10 мл NaBH_4 0,1 М, рН 7.		
------------------------------	--	--	--	--	--	--

*-в статті інформація не наведена

РОЗДІЛ 4
ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИКОРИСТАННЯ
БІОСЕНСОРІВ НА ОСНОВІ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ДЛЯ
ВИЯВЛЕННЯ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Ракові захворювання посіли друге місце серед смертельних недугів людства після хвороб серцево-судинної системи за останні десятиліття та прогнозується, що до кінця 2030 року смертельних випадків буде налічуватися приблизно 12 мільйонів. Причини базуються на пізній діагностиці, не точними та дорогавартісними наявними методами виявлення онкомаркерів, які надають хибно-негативні результати та потребують висококваліфікованого персоналу для розшифрування результатів, що задіює людський фактор в обробці аналізу. Насправді цю ситуацію можна виправити шляхом раннього діагностування ракових пухлин та як наслідок, своєчасного лікування (Akim A. et al, 2022).

Наразі виникає велика потреба розробки в діагностичних методах виявлення онкології та скринінгу всього організму на наявність гіперекспресії онкомаркерів в крові та метастазів. Незважаючи на існування традиційних протокольованих технологій для дослідження змін морфологічних структур органів як ультразвукове дослідження, магнітно-резонансна томографія (МРТ), мамографія та біопсія, вони виявилися неефективними до виявлення раку на первинній стадії. Окрім того, біопсія є інвазивною процедурою і аналізує невелику площу тканини. МРТ і мамографія потребують складне дорогавартісне обладнання та іонізуюче опромінення (Kumar S. et al.. 2023)

					НУХТ БТЕК 02.01.08 КР ПЗ		
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>	<i>Дзюба М.В.</i>				<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>						63	5
<i>Керівник</i>	<i>Скροцька О.І.</i>				63 Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>							
<i>Зав.каф.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>						
РОЗДІЛ 4 Техніко-економічне обгрунтування використання біосенсорів на основі наночастинок срібла для							

В разі виявлення раку за рівнем експресії специфічних онкомаркерів що можуть бути у вигляді ДНК, мікро-РНК, білки та цілісні клітини з певними рецепторами назовні та всередині, ферменти, гормони які знаходяться в сироватці крові, сечі і т.д., існують стандартні методи ампліфікації генів, як ПЛР, RT-PCR і LAMP, реакція мікроскопічної аглютинації (MAT), імуноферментативний аналіз (ELISA). Щодо переваг полімеразної ланцюгової реакції є висока специфічність до онкогену та чутливість (виявлення специфічної ДНК у кількості 10 олігомерів), але велика ймовірність хибно-позитивних результатів внаслідок контамінації. Обмеження аналіз шляхом RT-PCR вимагає дороговартісного обладнання, тривалість процесу. Однак LAMP має переваги серед попередніх методів ампліфікації генів, це швидкість (синтезує 10⁹ копій ДНК/год), чутливість, доволі низка межа виявлення. Серологічна діагностика MAT вимагає високого рівня експертності персоналу (Akim A. et al, 2022).

Часто діагностованим онкологічним захворюванням є рак молочної залози (РМЗ), що вражає як жінок, так і чоловіків. З огляду на статистику, у 2018 році в усьому світі було діагностовано 2 мільйони випадків РМЗ, з яких 629 679 людей померли. Ризик даного онкозахворювання зростає з віком (клімакс), генними мутаціями та спадковістю. Існує всього 5 стадій раку в залежності від розміру пухлини та метастазування, та зауважується, що після першої стадії смертність різко зростає. Жінкам після 40 років рекомендується обстежуватися кожний рік, але, на жаль, через дороговартісність ELISA та інших діагностичних тестів, вони є недоступними для жінок з бідних соціально-економічних груп. Як наслідок, діагностується пізня стадія РМЗ та високі кількості летальних випадків (Wignarajah, S. et al, 2023).

Згідно статистики Інституту демографії та проблем якості життя Національної академії наук України у 2023 рак молочної залози

діагностували за морфологічними ознаками у 1-2 стадії в 68,6% випадках, в пізній (3-4) стадії - 26,2%. Пізня стадія була зареєстрована в клініках Закарпатської, Тернопільської та Харківської області. Без визначеної стадії (3,0%) показники були виявлені в Луганській (17,1%), Сумській (9,5%) та Харківській (7,9%) області. Спеціальне лікування отримали 82,6% хворих на РМЗ станом на 2023 року. Летальність випадків становила станом на 2023 рік в середньому 8,2%, зокрема більше всього в Дніпропетровській, Закарпатській, Кіровоградській областях і очевидному недообліку померлих хворих у Харківській області. Кількість хворих на рак становило станом на липень 2024 р. - 35,8 мільйонів осіб, з яких жінок - 18 млн 644 тис (віком старші за 30 років - 13 млн 144 тис, старші за 35 р. - 12 млн 511 тис, та старші за 40 р.- 10 млн 981 тис). У жінок 56 % випадки захворювань становили на рак молочної залози, шийки матки та рак прямої кишки. Висока смертність (49,4%) була через рак молочної залози молочної залози, колоректальний рак і злоякісні новоутворення шлунка. Але наразі реєстрація смертей є проблематичним, через повномасштабне вторгнення, окупації та міграції населення. Є ризик, що статистика є набагато невтішною та результати є заниженими.

Для діагностування та скринінгу раку молочної залози більш надійним є визначення рівня концентрацій у крові біомаркерів (рецептори епідермального фактору росту HER-1 та 2, СЕА), які змінюються в залежності від стадії захворювання. HER-1 є видом зовнішніх рецепторів, які відповідають за проліферацію, адгезію, виживання, метастазуванню, диференціації онкоклетин. HER-2 бере участь в ангіогенезі (обростання кровоносних судин навколо онкопухлини) та інвазії (розщеплення міжклітинної речовини та переміщення вглиб тканин). Підвищена концентрація HER-1 (у 14-90% випадках) та HER-2 (20-25%) може вказувати на неконтрольоване ділення пухлини молочних залоз, не ефективність хіміо- або гормонотерапії. Традиційні методи вимірювання

рівня рецептору епідермального фактору росту охоплюють імуногістохімічний аналіз тканин, взятих під час біопсії, вестерн-блот аналіз, флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH) та імуноферментний аналіз (ELISA), який повинен мати порогове значення ≥ 15 нг/мл. Всі вони є дороговартісними та потребують залученню висококваліфікованим лабораторних діагностів (Wignarajah, S. et al, 2023).

Тому протягом останніх років зауважується у створенні недорогих та високочутливих методів виявлення таких онкомаркерів за допомогою біосенсорів. Біосенсорні пристрої складаються з елемента біорозпізнавання та перетворювача (трансдуктор). Біосенсори можна класифікувати на основі типів елементів біорозпізнавання (антитіла, ферменти, аптамер). Переваги таких пристроїв є простота використання, високу чутливість, низьку межу виявлення (менше нг/мл), специфічність та легке відтворення результатів, низька вартість. В залежності від виду трансдукторів (передавачів сигналів) біосенсори бувають електрохімічними (вольтамперометрія, амперометрія, імпеданс), оптичними (колориметрія, локалізований поверхневий плазмонних резонанс, раманівська спектрометрія, флуоресценція), мікрофлюїдні та масообмінні (кварцові мікроваги). У виготовленні біосенсорів важливу роль грають наноматеріали (наночастинки золота, срібла, їх композити з кремнієвими пластинами, оксидом титану, графітові нанотрубочки, квантові точки), які посиляють сигнал. Наночастинки срібла (AgNP) мають властивість іммобілізувати рецептори (антитіла, субстрат, ферменти), які вловлюють мішень (аналіт), адсорбувати онкомаркери з сироватки крові, збільшують площу поверхні електрода, тим самим збільшення інтенсивності сигналу, та сприяють стабільності біосенсору (Hasan, M. et al, 2021)

В роботах Hakimian F. та Mazloun-Ardakani M., також Ponsanti K. та ін. в експерименті використовували наночастинки срібла для виявлення

HER-2. Такі наночастинки складаються з тисячі атомів, які на електрохімічному трансдукторі окиснюються або відновлюються, тому вони можуть забезпечити значне посилення сигналу виявлення біомаркерів, що веде до підвищення чутливості та селективності електроду. Наноматеріал в статтях отримували шляхом хімічного синтезу із застосуванням токсичних речовин (цетримоній бромід, боргідрид натрію) (Nakimian F. et al, 2023; Ponsanti K. et al, 2022)

В таблиці 4.1 наведено основні параметри синтезу наночастинок та межі виявлення онкомаркера.

Таблиця 4.1

Тип біосенсору	Параметри синтезу AgNPs	Кількість AgNPs, мг	Межа виявлення HER-2
Електрохімічний	2 мл 0,01 М AgNO ₃ , 0,2 мл 0,1 М цетримоній броміду і 2 мл 0,01 М цитрату натрію, 0,01 М NaOH, 0,6 мл 10 мМ NaBH ₄ Зелений розчин.	0,3	1-10 ⁵ пг
Колориметричний	30 мл 2мМ NaBH ₄ , 2 мл 1мМ AgNO ₃ , 4% половініловий спирт, 2-3 кр. NaCl.	—	50000 кл/мл

Зважаючи на наведені не екологічні та токсичні методи синтезу, було запропоновано так званий «зелений» спосіб отримання наночастинок срібла, які можуть в подальшому використовуватися в складі біосенсорів

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 5

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

5.1. Поживні середовища та реактиви

Середовище 1: М'ясо-пептонний агар складається з м'ясного бульйону – 1 л, агару бактеріологічного – 15 г/л, пептон – 10 г/л, рН – 7,0). Це середовище використовували для зберігання та відновлення бактерій *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 у пробірках із скошеним шаром агару.

Середовище 2: Середовище Сабуро складається з декстрази – 40 г/л, агару бактеріологічного – 15, суміш у співвідношенні 1:1 ферментованої тваринної тканини і панкреатичного гідролізату казеїну – 10, рН – 5,6). Це середовище використовували для зберігання та відновлення дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* М437 у пробірках на скошеному агарі.

Середовище 3: Мінеральне середовище для *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 (склад, г/л: сечовина – 0,35, хлорид натрію – 1,0, додекагідрат гідрофосфату натрію – 0,6, дигідрофосфат калію – 0,14, семиводний сульфат магнію – 0,1, дріжджовий автолізат – 0,5%; розчин мікроелементів – 0,1% об'ємної частки, який містив (г/100 мл): семиводний сульфат цинку – 1,1; моногідрат сульфату марганцю – 0,6; семиводний сульфат заліза – 0,1; пентагідрат сульфату міді – 0,004; семиводний сульфат кобальту – 0,03; ортоборну кислоту – 0,006; йодид калію – 0,0001; динатрієву сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) – 0,5). рН середовища – 6,8–7,0. Джерелами вуглецю слугували очищений гліцерин (3%) або відходи біодизельного виробництва (5%).

					НУХТ БТЕК 02.01.08 КР ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Дзюба М.В.			РОЗДІЛ 5 Матеріали і методи дослідження					
Консульт.								Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Скороцька О.І.							69	5
Н. Контр.								Кафедра БТМ ⁶⁹		
Зав.каф.		Стабніков В.П.								

Це середовище використовували для культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з метою отримання поверхнево-активних речовин та безклітинного водного екстракту для синтезу наночастинок срібла.

Середовище 4: Модифіковане середовище для культивування *Saccharomyces cerevisiae* (за складом ідентичне до середовища 3, проте джерелом вуглецю була глюкоза (40%-вий розчин) у концентрації 0,5% об'ємної частки). Це середовище використовували для вирощування дріжджових клітин, які пізніше додавали як індуктор до середовища *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

Нітрат срібла: Сіль нітрату срібла (AgNO_3 , чистота 99,99%) постачалася компанією Sigma-Aldrich (Штайнхайм, Німеччина).

5.2. Культивування *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241

Спочатку готували посівний матеріал *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, вирощуючи його в середовищі 3 з концентрацією джерела вуглецю 0,5% (очищений гліцерин або залишки біодизельного виробництва). Процес тривав 48 годин за температури 30 °С та швидкості перемішування 320 об/хв.

Для підготовки посівного матеріалу дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* М437 змивали культуру зі скошеного агаризованого середовища Сабуро. Суспензію інокуляту (концентрація 10^4 – 10^5 клітин/мл) додавали в кількості 5% від об'єму до 100 мл стерильного середовища 4. Культивування проводили у колбах об'ємом 750 мл при температурі 30 °С та швидкості перемішування 320 об/хв упродовж 24 годин.

Отриманий інокулят *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 із концентрацією 10^4 – 10^5 клітин/мл вносили в кількості 10% від загального об'єму в середовище 3 (100 мл), яке містило джерела вуглецю: очищений гліцерин у концентрації 3% (об'ємна частка) або залишки біодизельного виробництва в концентрації 5%. Додатково до середовища вводили 2,5 мл суспензії

дріжджової біомаси, вирощеної заздалегідь. Культуральну рідину дріжджів розливали у стерильні епіндорфи, після чого центрифугували в ультрацентрифузі (10 000 об/хв, 10 хв). Осад біомаси ресуспендували у стерильній водопровідній воді до об'єму, еквівалентного початковому об'єму культуральної рідини до центрифугування.

Культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з додаванням дріжджового індуктора та без нього проводили у колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці за швидкості 300 об/хв при температурі 30 °С упродовж 168 годин.

5.3. Отримання безклітинного водного екстракту *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241

Культуральну рідину *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 центрифугували при 3000 об/хв впродовж 30 хвилин. Супернатант використовували для отримання ПАР (підпункт 2.4), а осад, що містив клітини *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 промивали 4 рази стерильною дистильованою водою від залишків поживного середовища. Отриману біомасу ресуспендували у 150 мл стерильної дистильованої води та витримували при температурі 30°C впродовж 72 годин при перемішуванні 320 об/хв. Далі проводили центрифугування при 5000 об/хв впродовж 30 хвилин. Осад видаляли, а отриманий безклітинний водний екстракт *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 фільтрували через стерильний шприцевий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Безклітинний водний екстракт *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 використовували для біосинтезу наночастинок срібла.

5.4. Отримання поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241

Супернатант *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, отриманий на попередньому етапі, використовували для екстрагування позаклітинних

поверхнево-активних речовин (ПАР) за методом Блая і Дайера. У циліндричну ділильну лійку поміщали 25 мл супернатанту, додаючи 1 н розчин HCl для встановлення рН у межах 4,0–4,5. Лійку закривали шліфованою пробкою, струшували безперервно протягом 3 хвилин, після чого доливали 25 мл суміші хлороформу і метанолу у співвідношенні 2:1 і знову струшували протягом 5 хвилин. Отриману після екстракції суміш залишали в лійці для поділу фаз, після чого нижню органічну фракцію (екстракт 1) зливали, а водну фазу піддавали повторній екстракції. Дві наступні екстракції виконували за аналогічним підходом. Усі три екстракти об'єднували та випаровували на роторному випарнику IP-1M2 при температурі 50 °С до постійної маси. Стерилізацію виконували двома способами: автоклавуванням при температурі 121 °С або фільтруванням через шприцевий мембранний фільтр із розміром пор 0,22 мкм.

5.5. Умови біосинтезу наночастинок срібла

Біосинтез наночастинок срібла здійснювали за різних умов поєднання біологічних розчинів:

Варіант 1. *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 культивували на очищеному гліцерині або відходах виробництва біодизелю, з внесенням індуктора *S. cerevisiae* М437 або без внесення (підпункт 2.2). Отримували безклітинний водний екстракт *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 (підпункт 2.3), до якого вносили нітрат срібла до досягнення кінцевої концентрації 1 мМ. Отримані зразки витримували при 35°С та 50°С за статичних умов упродовж 14 діб.

Варіант 2. *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 культивували на очищеному гліцерині або відходах виробництва біодизелю, з внесенням індуктора *S. cerevisiae* М437 або без внесення (підпункт 2.2). Отримували ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 (підпункт 2.4). ПАР стерилізували автоклавуванням, або методом холодної фільтрації – через шприцевий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. До розчинів ПАР (0,25 г/л та 1,25 г/л), які

були простерилізовані різними методами вносили нітрат срібла до кінцевої концентрації 1 мМ. Отримані зразки витримували при 50°C за статичних умов упродовж 14 діб.

Варіант 3. *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 культивували на очищеному гліцерині або відходах виробництва біодизелю, з внесенням індуктора *S. cerevisiae* М437 або без внесення (підпункт 2.2). Отримували ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 (підпункт 2.4). Отримували безклітинний водний екстракт *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 (підпункт 2.3). ПАР (0,25 г/л) розчиняли у безклітинному водному екстракті та вносили нітрат срібла до кінцевої концентрації 1 мМ. Отримані зразки витримували при 35°C та 50°C за статичних умов упродовж 14 діб.

5.6. УФ-видима спектрофотометрія

Біосинтез наночастинок срібла досліджували з використанням спектрофотометра UV-Vis (Thermo Spectronic UV300, Spectronic Unicam, England) в діапазоні довжин хвиль 350-650 нм з роздільною здатністю 2 нм. Характер поглинання світла зразками досліджували після 2, 4, 6, 7, 9, 10, 13, 14 діб.

РОЗДІЛ 6.

ВПЛИВ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ТА ІНШИХ МЕТАБОЛІТІВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ІМВ-7241 НА БІОСИНТЕЗ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА

У ході дослідів спостерігалася зміна забарвлення всіх зразків з прозорого на темно-жовтий на 14 добу. Така зміна кольору реакційної суміші свідчить про відновлення іонів срібла та утворення AgNPs, яким характерний поверхневий плазмонний резонанс (колективне коливання електронів на поверхні наночастинок) (Pryshchepa O., Pomastowski P., & Buszewski B., 2020).

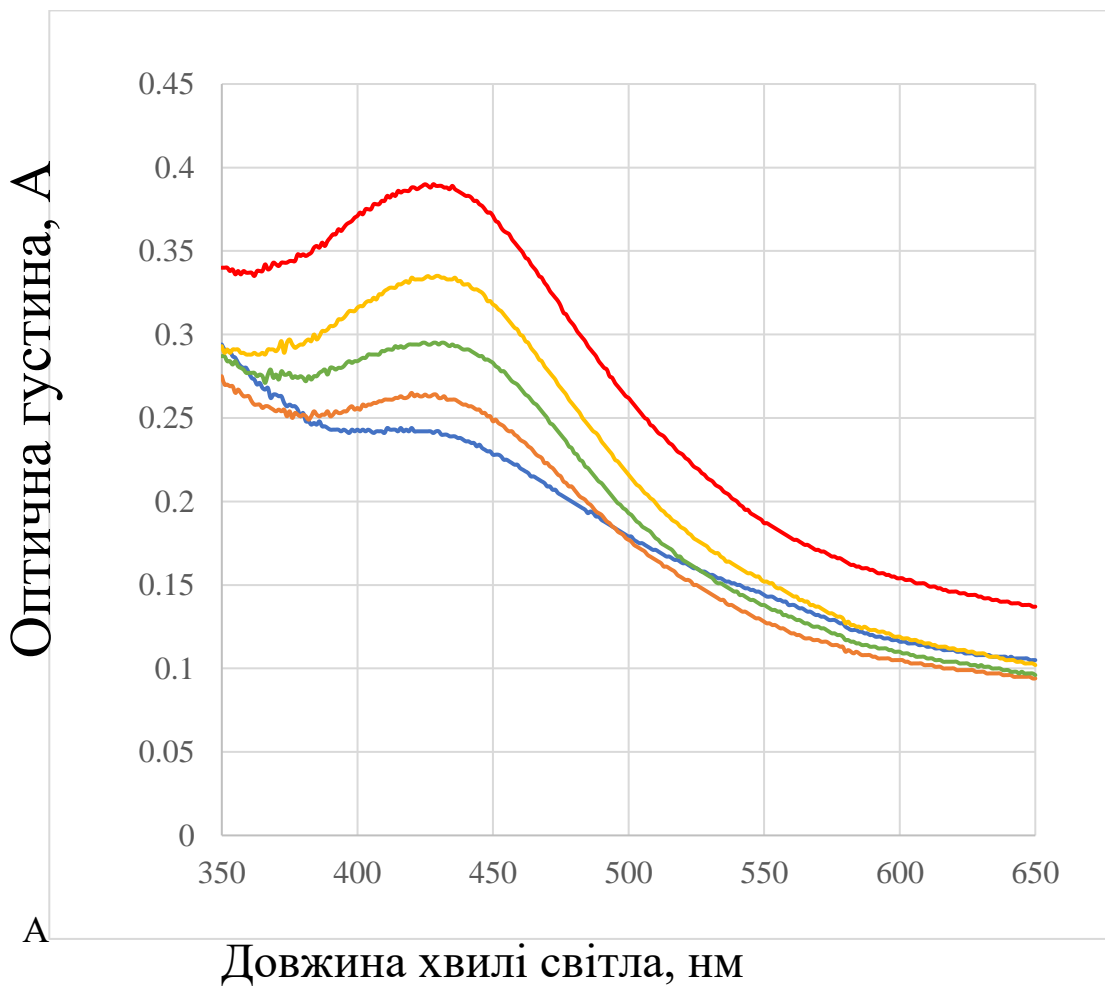
6.1. Роль поверхнево-активних речовин

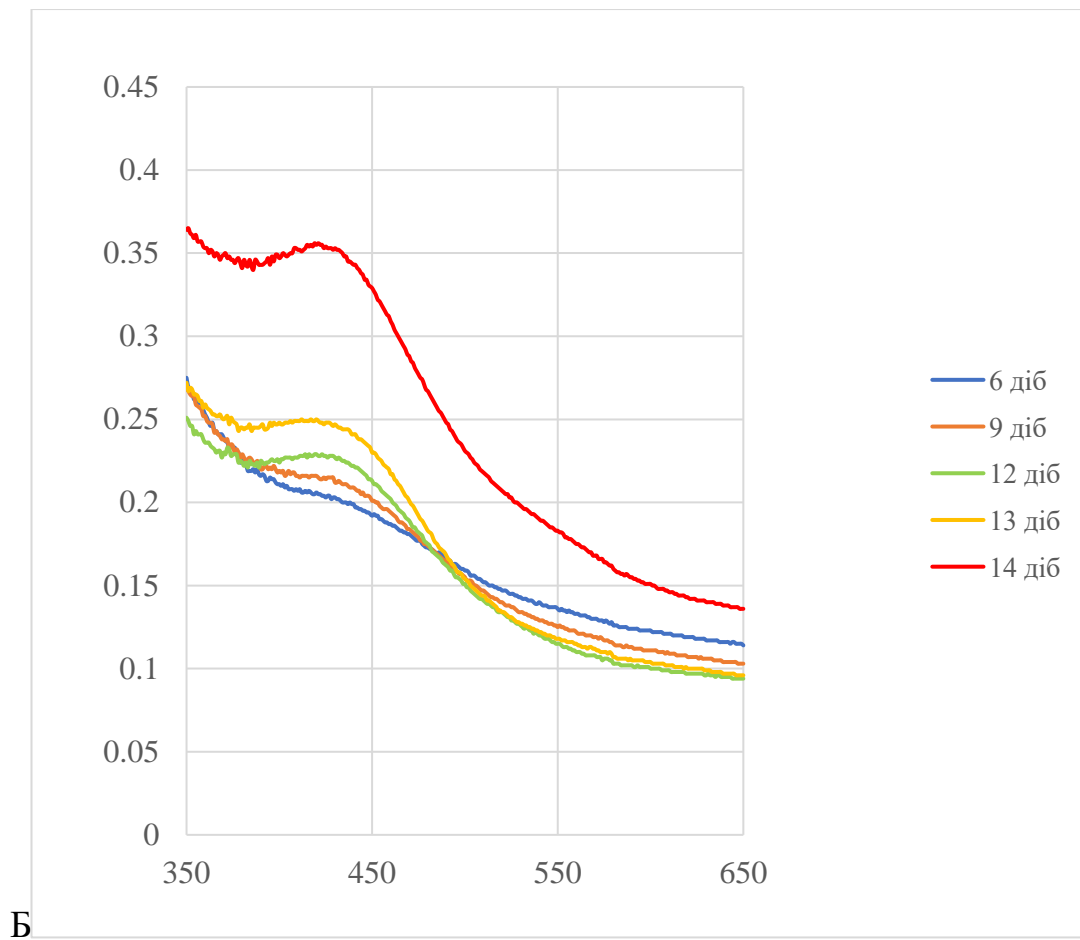
Після додавання нітрату срібла до розчину ПАР у концентрації 0,25 г/л при 50°C колір реакційної суміші з прозорого почав змінюватись на світло-жовтий на 14 добу, що свідчить про відновлення іонів срібла та формування наночастинок. У випадку використання ПАР у концентрації 1,25 г/л реакційна суміш залишалася прозорою до кінця дослідів, що свідчило про відсутність процесу біосинтезу наночастинок срібла.

Здійснивши аналіз спектрів поглинання досліджуваних зразків (рис. 3.1) можна спостерігати виражений пік поглинання у діапазоні довжин хвиль 350-650 нм з середньою довжиною хвилі, за якої фіксувався максимум поглинання, близько 425 нм (рис. 3.1), що є ознакою утворення наночастинок срібла у реакційній суміші. З часом значення оптичної густини збільшувалось, що свідчить про збільшення концентрації AgNPs у розчині (Patil R., Chougale A., 2021).

					НУХТ БТЕК 02.01.08 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дзюба М.В.			РОЗДІЛ 6 Вплив поверхнево-активних речовин та інших метаболітів <i>Acinetobacter</i> <i>calcoaceticus</i> ІМВ-7241 на біосинтез наночастинок срібла	Лім.	Арк.	Акрушіє
Консульт.							74	10
Керівник		Скороцька О.І.						74
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Стабніков В.П.						

При використанні ПАР в концентрації 1,25 г/л не спостерігали змін у спектрах поглинання, що ще раз підтвердило відсутність біосинтезу AgNPs за вказаної концентрації ПАР. Звертаючи увагу на зміну піків поглинання при використанні ПАР, які стерилізували різними методами, можна помітити, що при використанні фільтрованих ПАР відновлення іонів срібла до Ag^0 проходило ефективніше. Це може говорити про те, що фільтровані ПАР виявляють більш відновлюючу та стабілізуючу дію при синтезі наночастинок, порівняно з автоклавованими.





Б

Рис. 6.1. УФ-видимі спектри біосинтезованих AgNPs при використанні поверхнево-активних речовин у концентрації 0,25 г/л (режими стерилізації ПАР: А – фільтруванням, Б – автоклавуванням)

6.2. Вплив метаболітів безклітинного водного екстракту

При використанні для біосинтезу AgNPs безклітинного водного екстракту *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 вирощеного на очищеному гліцерині або відходах біодизелю у присутності індуктора біосинтезу ПАР *S. cerevisiae*, або без нього спостерігали виражений пік поглинання у діапазоні довжин хвиль від 300 до 540 нм з середньою довжиною хвилі, на якій видно характерний пік близько 425 нм (рис. 3.2 та рис. 3.3) Спектри поглинання НЧ були більш розширені при використанні безклітинного екстракту *A. calcoaceticus* IMB В-7241 (бактерії вирощували

на відходах виробництва біодизелю). Це може свідчити про агломерацію наночастинок, і як наслідок збільшення розмірів та їх полідисперсність (Eswari J., Dhagat S., & Mishra P., 2018). Якщо порівнювати спектри поглинання біосинтезованих наночастинок срібла, які були отримані з використанням лише ПАРів (підпункт 3.1) з даними спектрами, то ми бачимо, зростання оптичної густини, що може говорити про більшу відновлюючу та стабілізуючу дію при біосинтезі наночастинок метаболітів, які наявні у безклітинному водному екстракті *A. calcoaceticus* IMB B-7241 (ферменти, амінокислоти тощо) (Singh R., Wagh P., et al., 2013). При культивуванні з *S. cerevisiae*, автори Chen J., Zhang P., Ye X., Wei B., Emam M. та інші схиляються до того, що дріжджі можуть бути індуктором метаболічних шляхів бактерій, внаслідок чого виділяються інші біомолекули, які є потенційними відновлюючими агентами при біосинтезі НЧ.

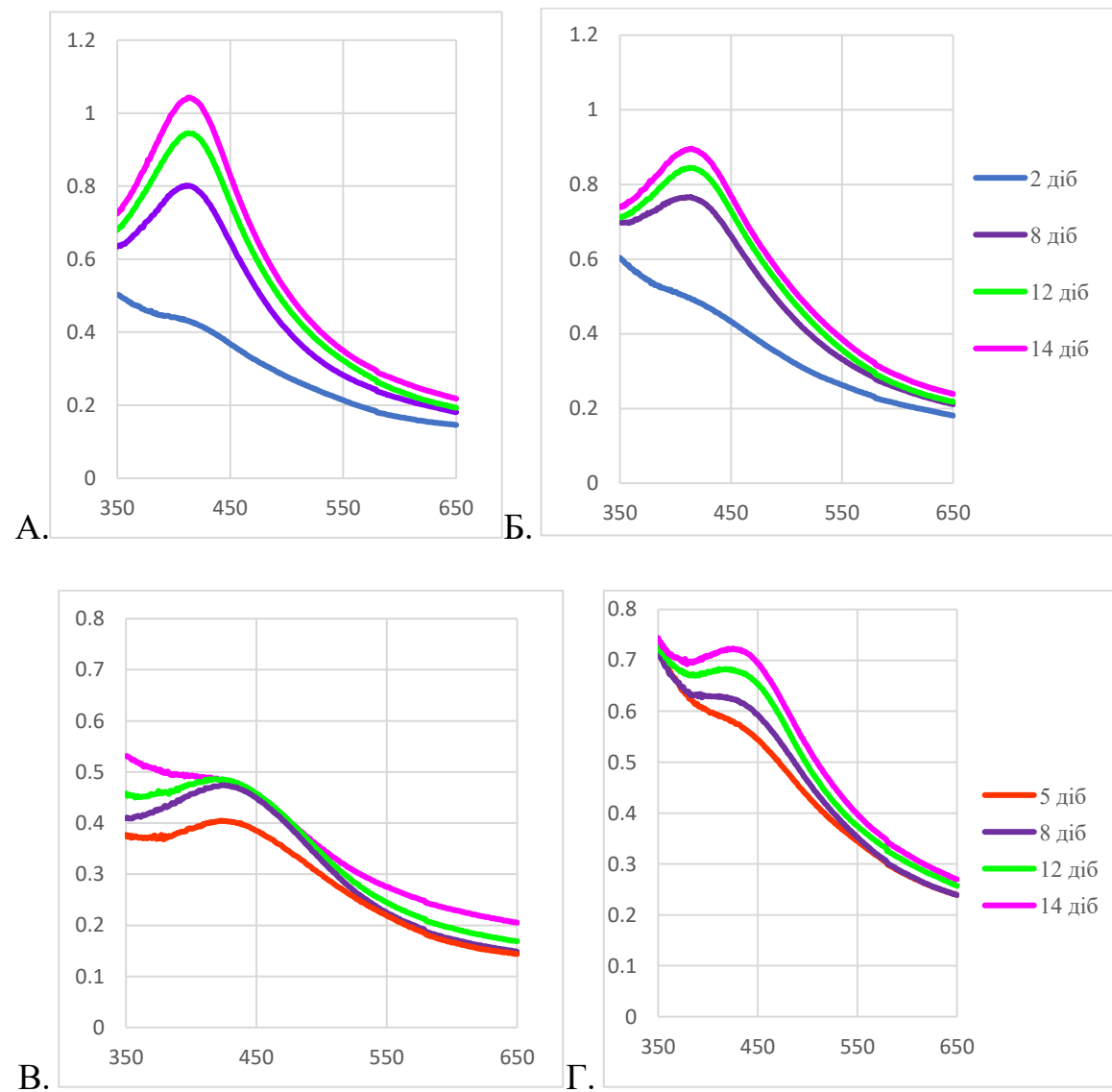
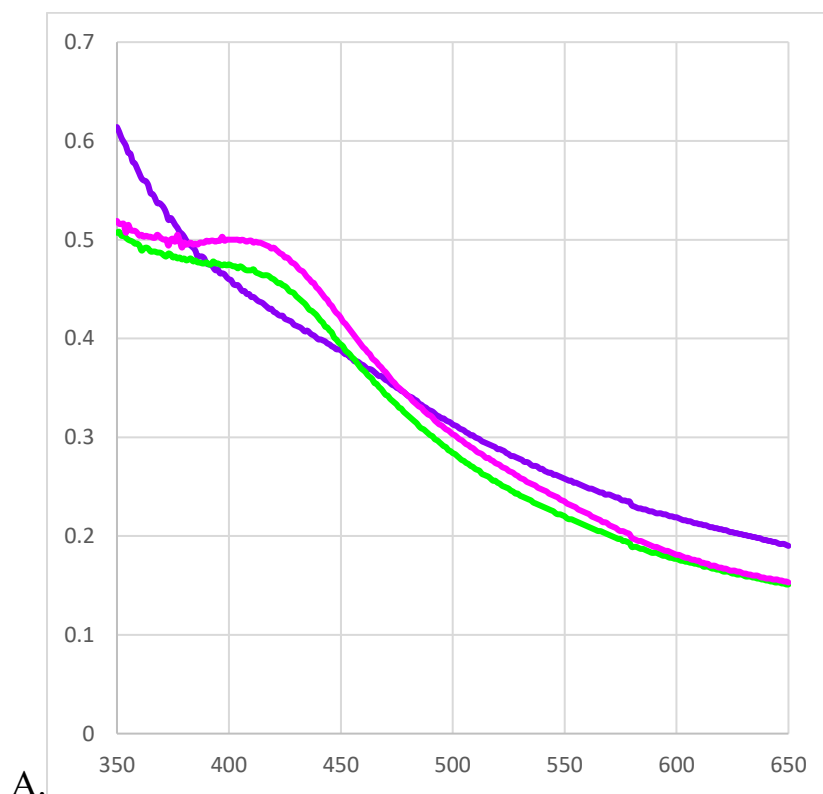


Рис. 6.2. УФ-видимі спектри біогенних AgNPs при використанні безклітинних водних екстрактів *A. calcoaceticus* IMB B-7241 (температура біосинтезу наночастинок – 50°C; бактерії культивували на очищеному гліцерині: А – без індуктора, Б – з індуктором; бактерії культивували на відходах виробництва біодизелю: В – без індуктора, Г – з індуктором)

При температурі біосинтезу 50°C формування AgNPs відбувався набагато швидше, що свідчила більша оптична густина з часом та вузький пік, що може говорити про менший розмір наночастинок та їх рівномірний розподіл (Reddy A. et all, 2009). Але автори Atwan Q. та Hayder N. (2020) застерігають про можливу агрегацію НЧ з плином часу при такій температурі, що може призвести до збільшення розмірів і втрати біологічної активності (протимікробна, антибіоплівкова дії).

При температурі біосинтезу 35°C формування AgNPs відбувалось лише при використанні безклітинного екстракту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 (клітини культивували на середовищі з очищеним гліцерином з індуктором та без). Спектри поглинання були розширені, що знову свідчить про збільшені розміри утворених наночастинок. Синтез НЧ не спостерігали при використанні безклітинного екстракту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у випадку культивування бактерій на відходах виробництва біодизелю, як при культивуванні з індуктором, так і без нього (на графіках не показано).



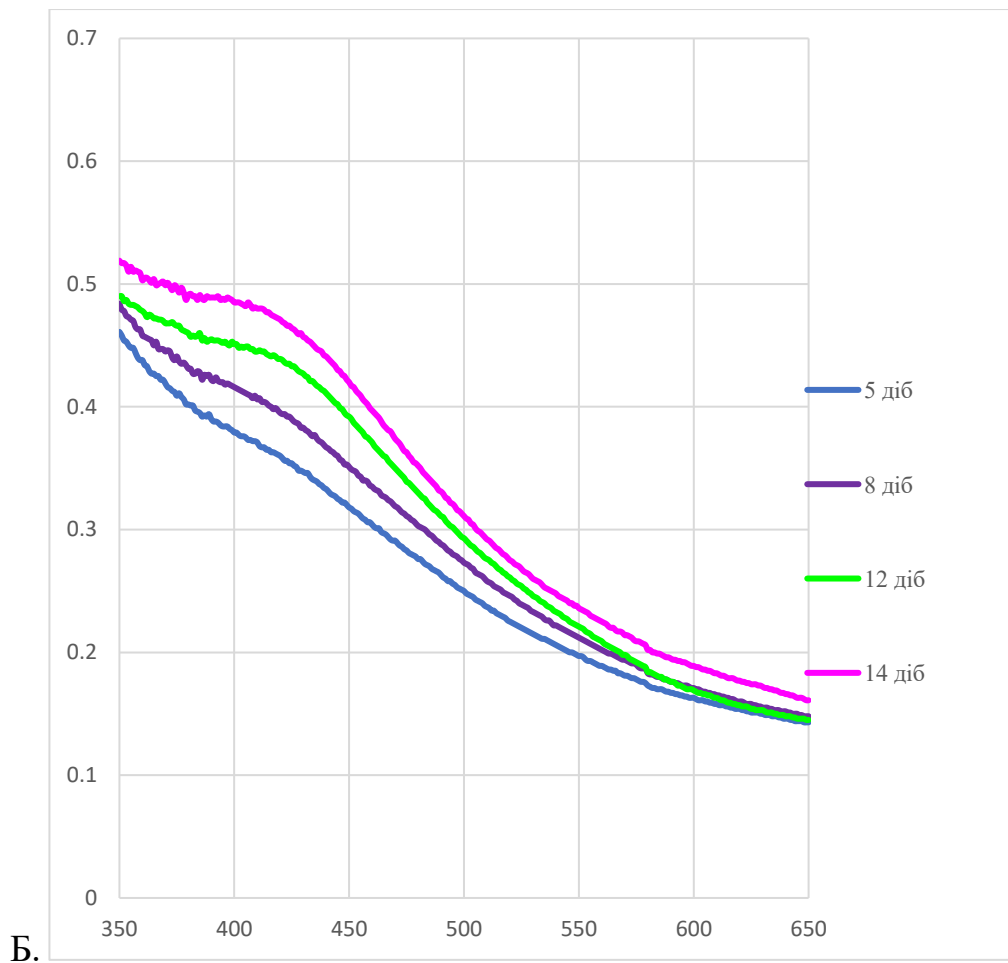


Рис. 6.3. УФ-видимі спектри біосинтезованих AgNPs при використанні безклітинних водних екстрактів *A. calcoaceticus* IMB В-7241 (температура біосинтезу наночастинок – 35°C; бактерії культивували на очищеному гліцерині: А – без індуктора, Б – з індуктором)

6.3. Вплив поверхнево-активних речовини та метаболітів безклітинного водного екстракту

При сумісному використанні для біосинтезу наночастинок срібла (температура біосинтезу – 50°C) безклітинного екстракту та поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB В-7241 спостерігали пік при довжині хвилі приблизно 425 нм (рис. 3.4 та 3.5), що свідчить про утворення наночастинок срібла.

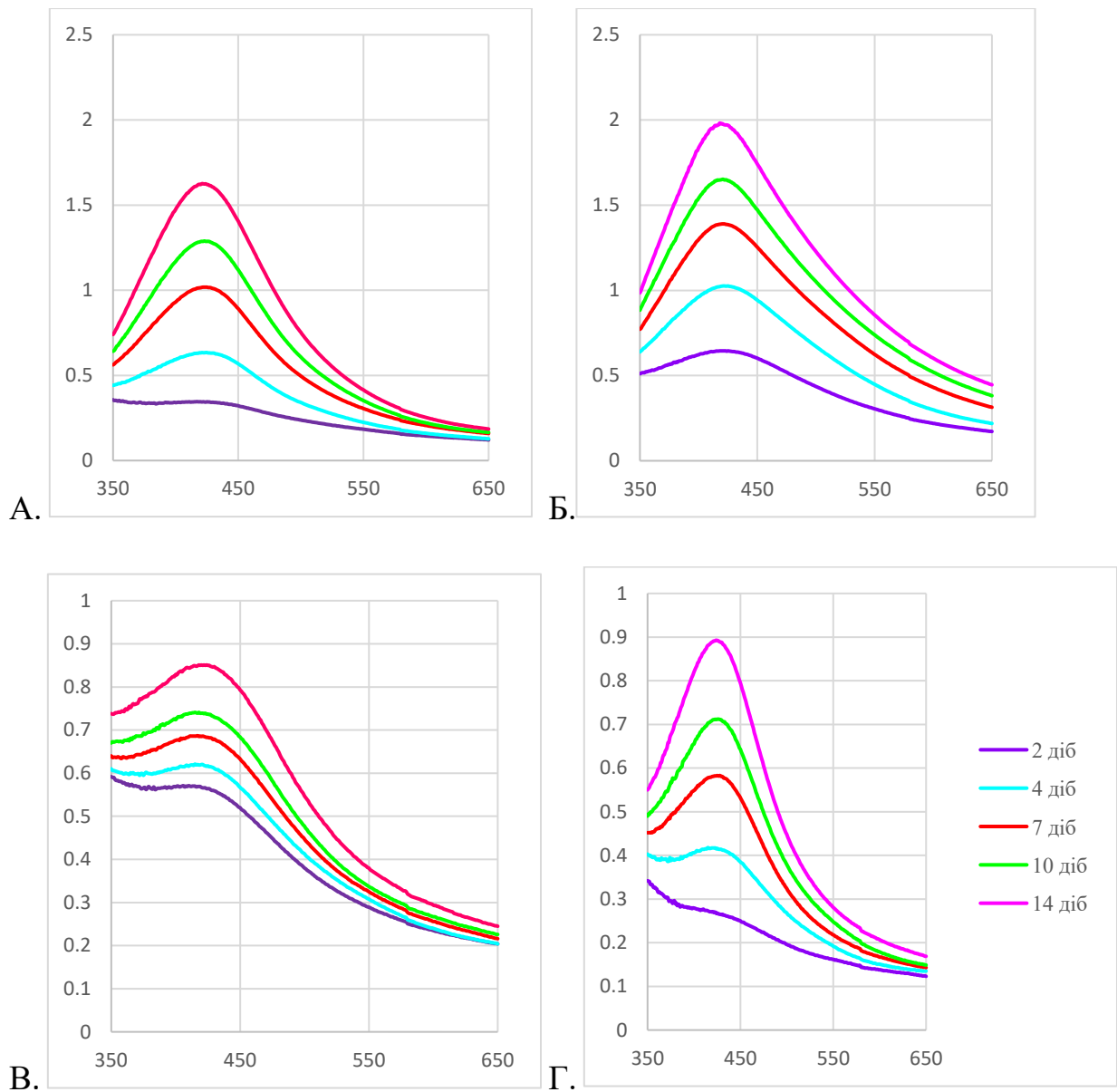


Рис. 6.4. УФ-видимі спектри біосинтезованих AgNPs при сумісному використанні ПАР та безклітинних водних екстрактів *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 (температура біосинтезу наночастинок – 50°C; бактерії культивували на очищеному гліцерині: А – без індуктора, Б – з індуктором; бактерії культивували на відходах виробництва біодизелю: В – без індуктора, Г – з індуктором)

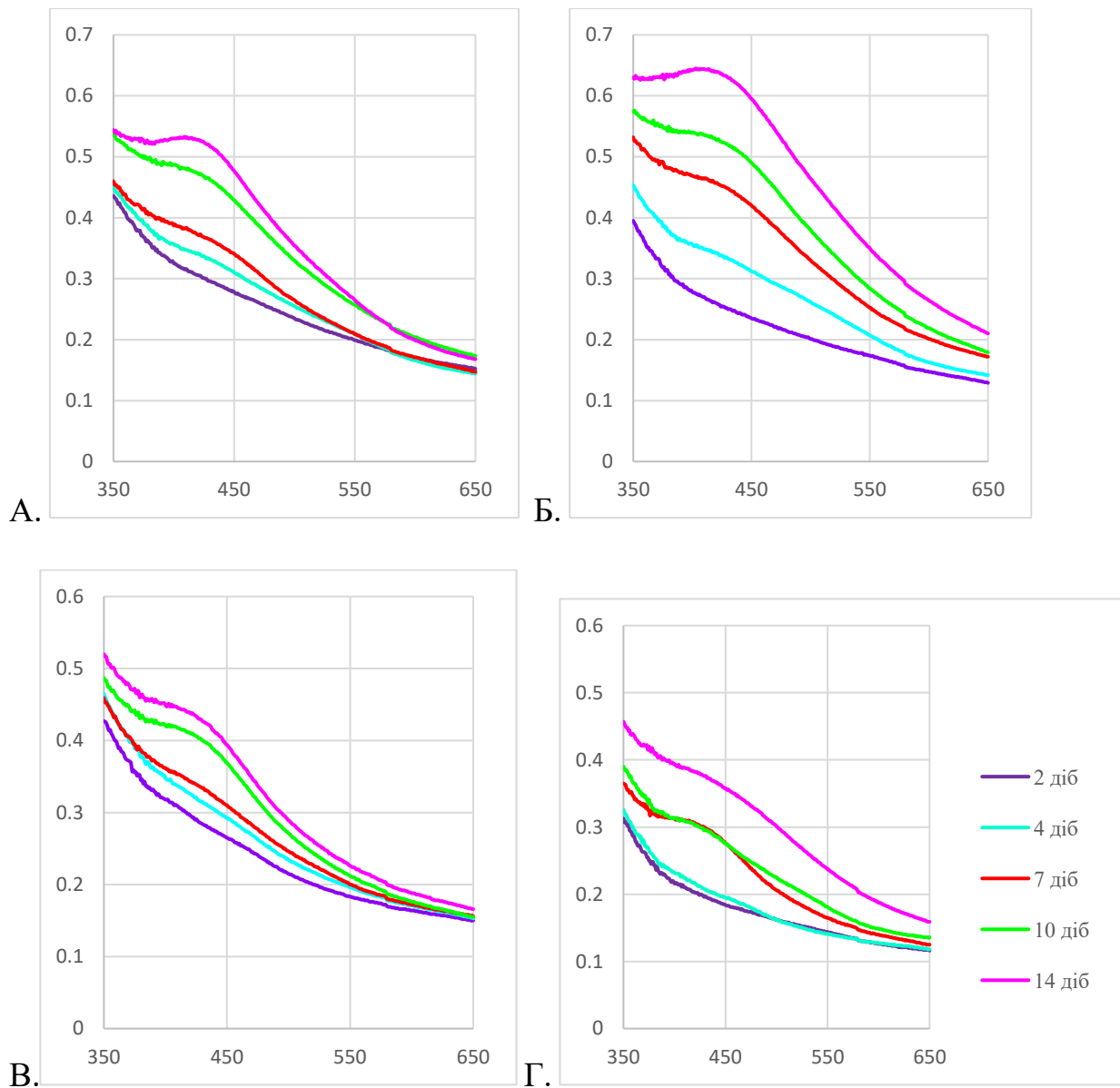


Рис. 6.5. УФ-видимі спектри біосинтезованих AgNPs при сумісному використанні ПАР та безклітинних водних екстрактів *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 (температура біосинтезу наночастинок – 35°C; бактерії культивували на очищеному гліцерині: А – без індуктора, Б – з індуктором; бактерії культивували на відходах виробництва біодизелю: В – без індуктора, Г – з індуктором)

Цікаво помітити, що в цьому експерименті густина поглинання в області піку була найбільша у порівнянні з попередніми дослідженнями (підпункти 3.1 і 3.2). Це може свідчити про синергічний стабілізуючий та відновлювальний ефект поверхнево-активних речовин та внутрішньоклітинних метаболітів при синтезі AgNPs. Зокрема показано, що при культивуванні *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 разом із індуктором *S. cerevisiae* спостерігається підвищений синтез аміноліпідів (Пирог Т., Іванов М. & Шевчук Т, 2023), що і може бути пов'язане з кращими стабілізуючими властивостями ПАР під час біосинтезу наночастинок.

При сумісному використанні безклітинного водного екстракту та ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 (бактерії вирощували на відходах виробництва біодизелю) відбувався біосинтез НЧ при 35 °С, що видно по отриманим пікам при довжині хвиль 425 нм (рис. 3.5; В, Г). Це може говорити про прискорення реакції відновлення срібла та формуванні наночастинок срібла при меншій температурі. Але даний широкий діапазон піку може свідчити про агломерацію наночастинок і їх великі розміри (Kumari R., Kumar V., Kumar M., Pareek N., Nimesh, 2020).

Отже, при сумісному використанні ПАР та безклітинного водного екстракту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 ми спостерігали швидке відновлення іонів срібла та формування наночастинок, що було підтверджено спектрофотометрично. Наявність індуктора біосинтезу ПАР – дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* М437 впливало на синтез ендометаболітів та аміноліпідів *A. calcoaceticus*, що в подальшому сприятиме отриманню AgNPs з кращими біологічними властивостями.

ВИСНОВКИ

1) Встановлено можливість біосинтезу наночастинок срібла з використанням поверхнево-активних речовин та безклітинного водного екстракту *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* М437 як індуктора синтезу ендометаболітів та аміноліпідів штаму ІМВ В-7241.

2) Концентрація поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 для відновлення та стабілізування наночастинок срібла становила 0,25 г/л. ПАРи стерилізовані методом холодної фільтрації були ефективнішими для синтезу AgNPs у порівнянні з автоклавованими.

3) При температурі 50°C синтез наночастинок з використанням безклітинного водного екстракту *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 відбувався швидше, ніж при температурі 35°C.

4) При сумісному використанні поверхнево-активних речовин та безклітинного водного екстракту *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 були отримані спектри наночастинок срібло з максимальними показниками поглинання та вузьким діапазоном піків. Це говорить про отримання монодисперсних, з малим розміром та неагрегованих AgNPs, які в майбутньому можуть бути досліджені на предмет їх біологічної дії.

					НУХТ БТЕК 02.01.08 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дзюба М.В.			Висновки	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							84	84 ¹
Керівник		Скороцька О.І.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав.каф.		Стабніков В.П.						

РОЗДІЛ 7

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ СИНТЕЗОВАНИХ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА

7.1. Спектрофотометрія

Залежно від розміру та форми наночастинок спектри можуть варіюватися. Наявність колоїдного срібла встановлюють за характерним спектром поглинання від 400 до 440 нм (Zhang X. et al, 2016)

Спектри збудження зразків, що містять AgNP, вимірюють за допомогою УФ-видимого спектрофотометра використанням кварцових кювет в діапазоні довжин хвиль $\lambda = 200\text{--}800$ нм.

Частота та ширина поверхневого плазмонного резонансу (виникає внаслідок колективного коливання електронів наночастинок срібла в резонансі зі світловою хвилею) залежить від розміру та форми металевих наночастинок. Піки за $\lambda = 260\text{--}335$ нм свідчать про формування кластерів срібла різної структури, а пік за $\lambda = 400\text{--}440$ нм про формування AgNPs (Vorobyova V. Et al., 2021)

1. Спочатку калібрують по дистильованій воді, потім наповнюють кювету з колоїдним сріблом.
2. УФ-видимі спектри наночастинок срібла повинні показати характерний інтенсивний пік при 420-450 нм.

Зазвичай використовуються наночастинки срібла з сферичною формою з розмірами 10-100 нм.

					НУХТ БТЕК 02.01.08 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дзюба М.В.			РОЗДІЛ 7 Методи контролю якості синтезованих наночастинок срібла	Літ.	Арк.	Акрушіє
Консульт.							85	85 5
Керівник		Скροцька О.І.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав.каф.		Стабніков В.П.						

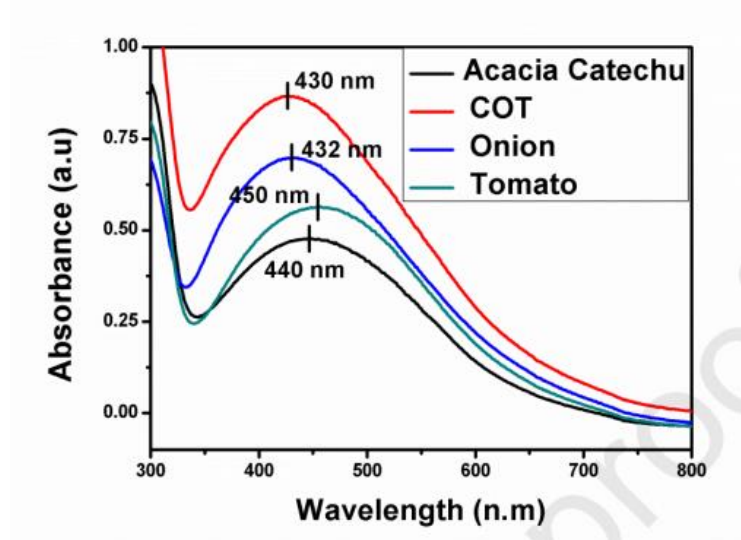


Fig.2. UV- visible spectroscopy of silver AgNps.

Рис.7.1. Характерні піки поглинання наночасток срібла (Chand K. et al, 2020)

7.2.Середній (гідродинамічний) діаметр та дзета-потенціал

Дзета-потенціал - це різниця потенціалів між дисперсійним середовищем і нерухомим шаром рідини, прикріпленим до дисперсної частинки. Також дзета-потенціал суспензії є одним із ключових параметрів при оцінці стабільності синтезованої наночастинки. Значення дзета-потенціалу полягає в тому, що його значення можна пов'язати з коротко- та довгостроковою стабільністю системи (Onugwu, A. et al, 2023)

При значенні дзета-потенціалу близьке до 30 мВ (+ або -) розглядають як характерне значення для умовного поділу низькозаряджених поверхонь і високозаряджених поверхонь. Більший розмір частинок демонструють низький дзета-потенціал і, зрештою, наночастинки виявляються нестабільними. Тоді як вищий дзета-потенціал відповідає стабільності, створюючи силу відштовхування між наночастинками та утримуючи їх подалі одна від одної, тим самим обмежуючи агрегацію AuNP у суспензії (Suresh S. et al, 2018)

Проводять шляхом визначення гідродинамічного діаметру (HD) (лазерно-кореляційної спектрометрії), який контролюють за методом динамічного розсіювання світла за допомогою приладу Zetasizer (Zeta-potential analyzer) з використанням одноразових полістирольних кювет і оснащеного 4,0 мВт He-Ne Red лазером (633 нм) і фіксований кут розсіювання 173°.

Цей метод можна використовувати для вимірювання вузького розподілу частинок за розміром, особливо в діапазоні 2–500 нм.

Кожен зразок розчиняють в дистильованій воді та розводять десятикратно. Перед DLS вимірювання, колоїд пропускають через 0,2 мкм мембрану з полівініліденфториду (PVDF).

Зразок завантажують в кварцову мікрокювету і проводять п'ять вимірювань, фіксують середній результат.

Порівнюють зі стандартним зразком. Вимірюють при постійній температурі $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Suresh S. et al, 2018)

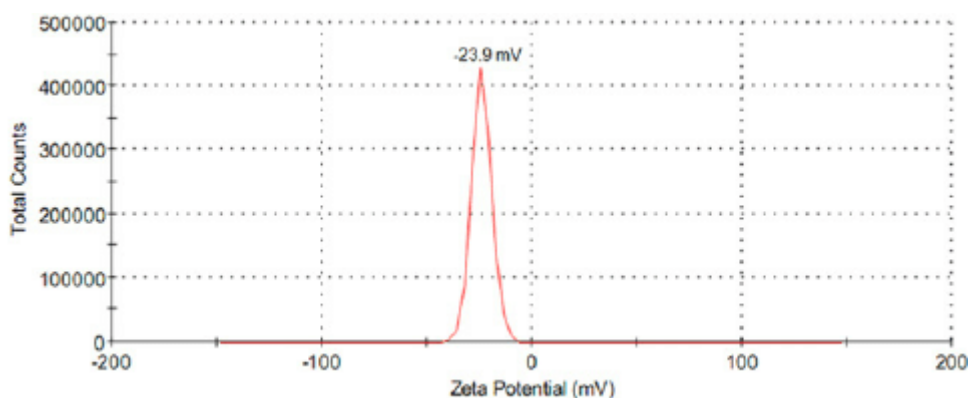


Рис. 7.2. Дзета-потенціал стійких наночастинок срібла (Suresh S. et al, 2018)

7.3 Трансмійна електронна мїроскопїя

Морфологїю та розмїр сїбних наночасток визначають за допомогою трансмісійної електронної мїроскопїї (ТЕМ). Використовується для зразків, якї являють собою ультратонкїй зрїз товщиною менше 100 нм або суспензїю на сїтцї.

1. 10 мкл кожного зразка помїщають на мїдну сїтку з вуглецевим покриттям, а надлишок зразка видаляють за допомогою шматка промокального паперу.

2. Пїсля висушування зразка пїд їнфрачервоною лампою, електроннї мїкрофотографїї отримуються при прискорювальнїй напрузї 80 кВ, а фотографїї – за допомогою камери (Agressott E. Et al, 2020).

7.4 Структура. Кристалїчна рещїтка.

Рентгенївський спектр AgNP записується на порошоквий рентгенївський дифрактометр (Goniometer Ultima IV), оснащений бета-фїльтром, що працює при напрузї 40 кВ і струмї 40 мА, Cu-K_α рентгенївське випромїнювання довжини хвилї ($\lambda = 0,1541$ нм) та оснащений кристалїчним монохроматором. Кристалїчна природа та середнїй дїаметр AgNP порївнюють згїдно баз даних Мїжнародного центру для стандартних дифракцїйних даних XRD аналізу (Mehta V. Et al, 2017)

7.5 Їнфрачервона спектроскопїя з перетворенням Фур'є

Вимїрювання FTIR проводиться для їдентифїкацїї можливих бїомолекул, вїдповїдальних за блокування та ефектївну стабїлізацїю металевих наночастинок.

Розмїр пїків прямо вказують на кїлькїсть присутнього матерїалу. Спектри змїнюються залежно вїд властивостей органїзму/виду, якї використовуються для синтезу AgNPs.

Він також використовується для підтвердження функціональних молекул ковалентно щеплені на срібло, або взаємодії, що відбуваються між ферментами і субстрат під час каталітичного процесу (Ghaseminezhad S. et al, 2012)

7.6 Концентрація наночастинок

Концентрацію частинок визначають гравіметрично, поміщаючи п'ять аліквот по 1,00 мл розчинів, приготовленому з використанням надчистої води (питомий опір 18,2 МОм), наночастинок у попередньо зважені алюмінієві чашки, висушуючи їх у вакуумній печі при 80 °С протягом 24 годин і зважуючи їх для кількісного визначення залишку. Вага може коливатися $\pm 0,0001$ мг (Austin J. et al, 2020)

7.7. Антибактеріальна активність

Оцінка антибактеріальних властивостей наночастинок срібла із застосуванням стандартного дифузійного методу повинна вказувати на досить високу ефективність антибактеріальної дії, наприклад *Staphylococcus aureus*.

1. На чашки Петрі з середовищем агару Мюлера-Хінтона бактерій засівали газоном бактерії *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 10^5 та 10^7 КУО/см³.
2. У кожній чашці вирізають лунки за допомогою стерилізованого гелевого борера. В лунки заливають 100 мкл зразка спрею. Інкують при 37°C протягом 24 год.
3. Після інкубації пластини були досліджуються на наявність зони гальмування росту навколо лунки (U.S Pharmacoreia)

Список використаної літератури

1. Agressott E.V.H., Blatte D., Cunha F.A., Noronha V.T., Ciesielski R., Hartschuh A. et al. Vibrational spectroscopy and morphological studies on protein-capped biosynthesized silver nanoparticles. *ACS Omega*. 2020, 5: 386-393.
2. Akim, A. M., Safdar, N., Yasmin, A., Sung, Y. Y., & Muhammad, T. S. T. (2022). Cancer and disease diagnosis-biosensor as potential diagnostic tool for biomarker detection. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 13(4), 243-247. doi: 10.4103/japtr.japtr_106_22.
3. Akim, A. M., Safdar, N., Yasmin, A., Sung, Y. Y., & Muhammad, T. S. T. (2022). Cancer and disease diagnosis-biosensor as potential diagnostic tool for biomarker detection. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 13(4), 243-247. doi: 10.4103/japtr.japtr_106_22.
4. Almatroudi, A. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, characterisation and biomedical applications. *Open life sciences*, 15(1), 819-839. DOI: 10.1515/biol-2020-0094
5. Atay, S., Pişkin, K., Yılmaz, F., Çakır, C., Yavuz, H., & Denizli, A. (2016). Quartz crystal microbalance based biosensors for detecting highly metastatic breast cancer cells via their transferrin receptors. *Analytical methods*, 8(1), 153-161. DOI: [10.1039/C5AY02898A](https://doi.org/10.1039/C5AY02898A),
6. Athira, K., Gurralla, L., & Kumar, D. V. R. (2021). Biosurfactant-mediated biosynthesis of CuO nanoparticles and their antimicrobial activity. *Applied Nanoscience*, 11(4), 1447-1457. DOI: 10.1007/c13204-021-01766-y
7. Atwan, Q. S., & Hayder, N. H. (2020). Eco-friendly synthesis of Silver nanoparticles by using green method: Improved interaction and application in vitro and in vivo. *The Iraqi Journal of Agricultural Science*, 51, 201-216. DOI: 10.36103/ijas.v51iSpecial.898

8. Atwan, Q. S., & Hayder, N. H. (2020). Eco-friendly synthesis of Silver nanoparticles by using green method: Improved interaction and application in vitro and in vivo. *The Iraqi Journal of Agricultural Science*, 51, 201-216. DOI: 10.36103/ijas.v51iSpecial.898
9. Austin, J., Minelli, C., Hamilton, D., Wywijas, M., & Jones, H. J. (2020). Nanoparticle number concentration measurements by multi-angle dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research*, 22(5), 108. Doi: 10.2217/17435889.1.2.169
10. Bazylyak, L., Kytsya, A., Karpenko, O., Prokopalo, A., Pokynbroda, T., Mazur, A., & Kuntiyi, O. (2020). Синтез наночастинок срібла з використанням рамноліпідного біокомплексу мікробного походження. *Вісник Львівського університету. Серія хімічна*, 2(61). DOI:10.30970/vch.6102.404
11. Bezza, F. A., Tichapondwa, S. M., & Chirwa, E. M. (2020). Synthesis of biosurfactant stabilized silver nanoparticles, characterization and their potential application for bactericidal purposes. *Journal of hazardous materials*, 393, 122319. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122319
12. Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P., & Caro, N. (2021). Silver nanoparticles and their antibacterial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7202. DOI: 10.3390/ijms22137202
13. Chand K., CaoDiaa D., Fouad E., Hussain A., and other. Green synthesis, characterization and photocatalytic application of silver nanoparticles synthesized by various plant extracts. *Arabian Journal of Chemistry*. № 13(11), 2020, P:8248-8261. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.01.009>
14. Chen, J., Zhang, P., Ye, X., Wei, B., Emam, M., Zhang, H., & Wang, H. (2020). The structural diversity of marine microbial secondary metabolites based on co-culture strategy: 2009–2019. *Marine drugs*, 18(9), 449. DOI: 10.3390/md18090449.

15. Chen, J., Zhang, P., Ye, X., Wei, B., Emam, M., Zhang, H., & Wang, H. (2020). The structural diversity of marine microbial secondary metabolites based on co-culture strategy: 2009–2019. *Marine drugs*, 18(9), 449. DOI: 10.3390/md18090449.
16. Chen, M., Wang, Y., Su, H., Mao, L., Jiang, X., Zhang, T., & Dai, X. (2018). Three-dimensional electrochemical DNA biosensor based on 3D graphene-Ag nanoparticles for sensitive detection of CYFRA21-1 in non-small cell lung cancer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255, 2910-2918. DOI: [10.1016/j.snb.2017.09.111](https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.111)
17. Chiorcea-Paquim, A. M. (2023). Advances in electrochemical biosensor technologies for the detection of nucleic acid breast cancer biomarkers. *Sensors*, 23(8), 4128. doi: 10.3390/s23084128.
18. Choi, G., Kim, E., Park, E., & Lee, J. H. (2017). A cost-effective chemiluminescent biosensor capable of early diagnosing cancer using a combination of magnetic beads and platinum nanoparticles. *Talanta*, 162, 38-45. doi: 10.1016/j.talanta.2016.09.061.
19. Das, A. J., Kumar, R., Goutam, S. P., & Sagar, S. S. (2016). Sunlight irradiation induced synthesis of silver nanoparticles using glycolipid biosurfactant and exploring the antibacterial activity. *J. Bioeng. Biomed. Sci*, 6(5). DOI: 10.4172/2155-9538.1000208
20. Das, M., Borah, D., Patowary, K., Borah, M., Khataniar, A., & Bhusan Kakoti, B. (2019). Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesised by using microbial biosurfactant produced by a newly isolated *Bacillus vallismortis* MDU6 strain. *IET nanobiotechnology*, 13(9), 967-973. DOI: 10.1049/iet-nbt.2019.0038
21. Das, M., Patowary, K., Vidya, R., & Malipeddi, H. (2016). Microemulsion synthesis of silver nanoparticles using biosurfactant extracted from *Pseudomonas aeruginosa* MKVIT3 strain and comparison of their

antimicrobial and cytotoxic activities. *IET nanobiotechnology*, 10(6), 411-418. DOI: 10.1049/iet-nbt.2015.0119

22. Deshmukh, N., Kadam, D., Deshmukh, P., & Kathwate, G. (2022). Utilization of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain LTR1 for the synthesis of the silver nanoparticles and their application as antimicrobial agents. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 10(2), 35-41. DOI: 10.7324/JABB.2022.100205

23. Durval, I. J. B., Meira, H. M., de Veras, B. O., Rufino, R. D., Converti, A., & Sarubbo, L. A. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using a biosurfactant from *Bacillus cereus* UCP 1615 as stabilizing agent and its application as an antifungal agent. *Fermentation*, 7(4), 233. DOI: [10.3390/fermentation7040233](https://doi.org/10.3390/fermentation7040233)

24. El Badawy, A. M., Scheckel, K. G., Suidan, M., & Tolaymat, T. (2012). The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Science of the total environment*, 429, 325-331. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.03.041

25. Elakkiya, V. T., SureshKumar, P., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., & Govindarajan, M. (2020). Swift production of rhamnolipid biosurfactant, biopolymer and synthesis of biosurfactant-wrapped silver nanoparticles and its enhanced oil recovery. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(7), 1892-1899. DOI: [10.1016/j.sjbs.2020.04.001](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.001)

26. Elhakim, H. K., Azab, S. M., & Fekry, A. M. (2018). A novel simple biosensor containing silver nanoparticles/propolis (bee glue) for microRNA let-7a determination. *Materials Science and Engineering: C*, 92, 489-495. doi: 10.1016/j.msec.2018.06.063.

27. Ensafi, A. A., Taei, M., Rahmani, H. R., & Khayamian, T. (2011). Sensitive DNA impedance biosensor for detection of cancer, chronic lymphocytic leukemia, based on gold nanoparticles/gold modified electrode. *Electrochimica Acta*, 56(24), 8176-8183. doi:10.1016/j.electacta.2011.05.124

28. 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
29. 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
30. 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
31. Fahmy, H. M., Mosleh, A. M., Abd Elghany, A., Shams-Eldin, E., Serea, E. S. A., Ali, S. A., & Shalan, A. E. (2019). Coated silver nanoparticles: Synthesis, cytotoxicity, and optical properties. *RSC advances*, 9(35), 20118-20136. . doi: 10.1039/c9ra02907a.
32. Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., & Galdiero, M. (2015). Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*, 20(5), 8856-8874. DOI: 10.3390/molecules20058856
33. Gao, L., Wu, S., Wongwasurattakul, P., Chen, Z., Cai, W., Li, Q., & Lin, L. L. (2024). Label-Free Surface-Enhanced Raman Spectroscopy with Machine Learning for the Diagnosis of Thyroid Cancer by Using Fine-Needle Aspiration Liquid Samples. *Biosensors*, 14(8), 372. doi: 10.3390/bios14080372.
34. Geka, G., Kanioura, A., Kochylas, I., Likodimos, V., Gardelis, S., Dimitriou, A., ... & Petrou, P. (2023). Cancer Marker Immunosensing through Surface-Enhanced Photoluminescence on Nanostructured Silver Substrates. *Nanomaterials*, 13(24), 3099. doi: 10.3390/nano13243099.
35. Ghaseminezhad, S. M., Hamed, S., & Shojaosadati, S. A. (2012). Green synthesis of silver nanoparticles by a novel method: Comparative study of

their properties. *Carbohydrate polymers*, 89(2), 467-472. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.03.030.

36. Gómez-Graña, S., Perez-Ameneiro, M., Vecino, X., Pastoriza-Santos, I., Perez-Juste, J., Cruz, J. M., & Moldes, A. B. (2017). Biogenic synthesis of metal nanoparticles using a biosurfactant extracted from corn and their antimicrobial properties. *Nanomaterials*, 7(6), 139. DOI: 10.3390/nano7060139.

37. Gu, Z., Zhao, D., He, H., & Wang, Z. (2024). SERS-Based Microneedle Biosensor for In Situ and Sensitive Detection of Tyrosinase. *Biosensors*, 14(4), 202. doi: 10.3390/bios14040202.

38. Hakimian, F., & Ghourchian, H. (2020). Ultrasensitive electrochemical biosensor for detection of microRNA-155 as a breast cancer risk factor. *Analytica Chimica Acta*, 1136, 1-8. doi: 10.1016/j.aca.2020.08.039.

39. Hakimian, F., & Mazloun-Ardakani, M. (2023). Ag nanorod@ PEI-Ag nanohybrid as an excellent signal label for sensitive and rapid detection of serum HER2. *Scientific Reports*, 13(1), 21792. doi: 10.1038/s41598-023-48838-3.

40. Hakimian, F., Ghourchian, H., Hashemi, A. S., Arastoo, M. R., & Behnam Rad, M. (2018). Ultrasensitive optical biosensor for detection of miRNA-155 using positively charged Au nanoparticles. *Scientific reports*, 8(1), 2943. DOI:10.1038/s41598-018-20229-z

41. Hasan, M. R., Ahommed, M. S., Daizy, M., Bacchu, M. S., Ali, M. R., Al-Mamun, M. R., ... & Hossain, S. I. (2021). Recent development in electrochemical biosensors for cancer biomarkers detection. *Biosensors and Bioelectronics: X*, 8, 100075. DOI:10.1016/j.biosx.2021.100075

42. Hasan, M. R., Sharma, P., Pilloton, R., Khanuja, M., & Narang, J. (2022). Colorimetric biosensor for the naked-eye detection of ovarian cancer biomarker PDGF using citrate modified gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics: X*, 11, 100142. doi 10.1016/j.biosx.2022.100142.

43. Jafari, M., Hasanzadeh, M., Solhi, E., Hassanpour, S., Shadjou, N., Mokhtarzadeh, A., ... & Mahboob, S. (2019). Ultrasensitive bioassay of epitope of Mucin-16 protein (CA 125) in human plasma samples using a novel immunoassay based on silver conductive nano-ink: A new platform in early stage diagnosis of ovarian cancer and efficient management. *International journal of biological macromolecules*, *126*, 1255-1265. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.009.
44. Jalil, O., Pandey, C. M., & Kumar, D. (2020). Electrochemical biosensor for the epithelial cancer biomarker EpCAM based on reduced graphene oxide modified with nanostructured titanium dioxide. *Microchimica Acta*, *187*, 1-9. doi: 10.1007/s00604-020-04233-7.
45. Jo, H., Her, J., & Ban, C. (2015). Dual aptamer-functionalized silica nanoparticles for the highly sensitive detection of breast cancer. *Biosensors and Bioelectronics*, *71*, 129-136. doi: 10.1016/j.bios.2015.04.030.
46. Joanna, C., Marcin, L., Ewa, K., & Grażyna, P. (2018). A nonspecific synergistic effect of biogenic silver nanoparticles and biosurfactant towards environmental bacteria and fungi. *Ecotoxicology*, *27*, 352-359. DOI: 10.1007/s10646-018-1899-3
47. Khalid, H. F., Tehseen, B., Sarwar, Y., Hussain, S. Z., Khan, W. S., Raza, Z. A., & Rehman, A. (2019). Biosurfactant coated silver and iron oxide nanoparticles with enhanced anti-biofilm and anti-adhesive properties. *Journal of hazardous materials*, *364*, 441-448. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.10.049.
48. Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*, *12*(7), 908-931. DOI: 10.1016/J.ARABJC.2017.05.011
49. Khoshfetrat, S. M., & Mehrgardi, M. A. (2017). Amplified detection of leukemia cancer cells using an aptamer-conjugated gold-coated magnetic nanoparticles on a nitrogen-doped graphene modified

electrode. *Bioelectrochemistry*, 114, 24-32. doi: 10.1016/j.bioelechem.2016.12.001.

50. Krishnan, N., Velramar, B., Pandiyan, R., & Velu, R. K. (2018). Anti-pseudomonal and anti-endotoxic effects of surfactin-stabilized biogenic silver nanocubes ameliorated wound repair in streptozotocin-induced diabetic mice. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(3), 488-499. DOI: 10.1080/21691401.2017.1324461

51. Kulkarni, P., Chakraborty, R., & Chakraborty, S. (2019). Biosurfactant mediated synthesis of silver nanoparticles using lactobacillus brevis (MTCC 4463) and their antimicrobial studies. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10, 1753-1759. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1753-59

52. Kumar, C. G., Mamidyala, S. K., Das, B., Sridhar, B., Devi, G. S., & Karuna, M. S. (2010). Synthesis of biosurfactant-based silver nanoparticles with purified rhamnolipids isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(7), 1061-1068. DOI: 10.4014/jmb.1001.01018

53. Kumar, R., Das, A. J., Kumar, R., & Das, A. J. (2018). Rhamnolipid-assisted synthesis of stable nanoparticles: a green approach. *Rhamnolipid biosurfactant: recent trends in production and application*, 111-124. DOI: 10.1007/978-981-13-1289-2_10

54. Kumar, S., & Krishnan, S. (2023). Biosensors for Carcinoembryonic Antigen Detection for Future Prospective: A Review. *Sustainable Chemical Engineering*, 100-120. DOI: 10.37256/sce.4220233104

55. Kumar, S., Umar, M., Saifi, A., Kumar, S., Augustine, S., Srivastava, S., & Malhotra, B. D. (2019). Electrochemical paper based cancer biosensor using iron oxide nanoparticles decorated PEDOT: PSS. *Analytica Chimica Acta*, 1056, 135-145. doi: 10.1016/j.aca.2018.12.053.

56. 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
57. Lee, K. X., Shameli, K., Yew, Y. P., Teow, S. Y., Jahangirian, H., Rafiee-Moghaddam, R., & Webster, T. J. (2020). Recent developments in the facile bio-synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) and their biomedical applications. *International journal of nanomedicine*, 275-300. DOI: 10.2147/IJN.S233789.
58. Loiseau, A., Asila, V., Boitel-Aullen, G., Lam, M., Salmain, M., & Boujday, S. (2019). Silver-based plasmonic nanoparticles for and their use in biosensing. *Biosensors*, 9(2), 78. doi: 10.3390/bios9020078. P
59. Makableh, Y., Athamneh, T., Ajlouni, M., Hijazi, S., & Alnaimi, A. (2023). Enhanced response and selective gold nanoparticles/carbon nanotubes biosensor for the early detection of HER2 biomarker. *Sensors and Actuators Reports*, 5, 100158. DOI: [10.1016/j.snr.2023.100158](https://doi.org/10.1016/j.snr.2023.100158)
60. Marangon, C. A., Martins, V. C., Ling, M. H., Melo, C. C., Plepis, A. M. G., Meyer, R. L., & Nitschke, M. (2020). Combination of rhamnolipid and chitosan in nanoparticles boosts their antimicrobial efficacy. *ACS applied materials & interfaces*, 12(5), 5488-5499. DOI: 10.1021/acsami.9b19253
61. Mehta, B. K., Chhajlani, M., & Shrivastava, B. D. (2017, April). Green synthesis of silver nanoparticles and their characterization by XRD. In *Journal of physics: conference series* (Vol. 836, No. 1, p. 012050). IOP Publishing. DOI:10.1088/1742-6596/836/1/012050
62. Meng, F., Sun, H., Huang, Y., Tang, Y., Chen, Q., & Miao, P. (2019). Peptide cleavage-based electrochemical biosensor coupling graphene oxide and silver nanoparticles. *Analytica chimica acta*, 1047, 45-51. doi: 10.1016/j.aca.2018.09.053.

63. Mohammadniaei, M., Yoon, J., Lee, T., Bharate, B. G., Jo, J., Lee, D., & Choi, J. W. (2018). Electrochemical biosensor composed of silver ion-mediated dsDNA on Au-encapsulated Bi₂Se₃ nanoparticles for the detection of H₂O₂ released from breast cancer cells. *Small*, *14*(16), 1703970. DOI: **10.1002/sml.201703970**
64. Nasirian, V., Shamsipur, M., Molaabasi, F., Mansouri, K., Sarparast, M., Salim, V., ... & Kashanian, S. (2020). miRNA-21 rapid diagnosis by one-pot synthesis of highly luminescent red emissive silver nanoclusters/DNA. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *308*, 127673. DOI: [10.1016/j.snb.2020.127673](https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127673)
65. Nitschke, M., & Marangon, C. A. (2022). Microbial surfactants in nanotechnology: recent trends and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, *42*(2), 294-310. DOI: 10.1080/07388551.2021.1933890
66. Ohadi, M., Dehghannoudeh, G., Shakibaie, M., Banat, I. M., Pournamdari, M., & Forootanfar, H. (2017). Isolation, characterization, and optimization of biosurfactant production by an oil-degrading *Acinetobacter junii* B6 isolated from an Iranian oil excavation site. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *12*, 1-9. DOI: 10.1016/J.BCAB.2017.08.007
67. Onugwu, A. L., Nwagwu, C. S., Onugwu, O. S., Echezona, A. C., Agbo, C. P., Ihim, S. A., ... & Khutoryanskiy, V. V. (2023). Nanotechnology based drug delivery systems for the treatment of anterior segment eye diseases. *Journal of Controlled Release*, *354*, 465-488. doi: 10.1016/j.jconrel.2023.01.018.
68. Pang, Y., Wang, C., Wang, J., Sun, Z., Xiao, R., & Wang, S. (2016). Fe₃O₄@ Ag magnetic nanoparticles for microRNA capture and duplex-specific nuclease signal amplification based SERS detection in cancer cells. *Biosensors and Bioelectronics*, *79*, 574-580.
69. Pang, Y., Wang, C., Wang, J., Sun, Z., Xiao, R., & Wang, S. (2016). Fe₃O₄@ Ag magnetic nanoparticles for microRNA capture and duplex-specific

nuclease signal amplification based SERS detection in cancer cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 79, 574-580.doi: 10.1016/j.bios.2015.12.052.

70. Patil, R. B., & Chougale, A. D. (2021). Analytical methods for the identification and characterization of silver nanoparticles: A brief review. *Materials Today: Proceedings*, 47, 5520-5532. DOI: 10.1016/J.MATPR.2021.03.384

71. Pirog, T. P., Ivanov M. S., Shevchuk T. A. (2023). Biological activity of Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241 surfactants synthesized in the presence of competitive bacteria Bacillus subtilis BT-2. *Microbiological Journal*. – 85 (4), 21–33. DOI: 10.15407/microbiolj85.04.021

72. Pirog, T. P., Ivanov M. S., Shevchuk T. A. (2023). Biological activity of Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241 surfactants synthesized in the presence of competitive bacteria Bacillus subtilis BT-2. *Microbiological Journal*. – 85 (4), 21–33. DOI: 10.15407/microbiolj85.04.021

73. Płaza, G. A., Chojniak, J., Mendrek, B., Trzebicka, B., Kvitek, L., Panacek, A., & Bernat, P. (2016). Synthesis of silver nanoparticles by Bacillus subtilis T-1 growing on agro-industrial wastes and producing biosurfactant. *IET nanobiotechnology*, 10(2), 62-68. DOI :10.1049/iet-nbt.2015.0016

74. Ponsanti, K., Tangnorawich, B., Ngernyuang, N., & Pechyen, C. (2022). Synthesis of mesoporous silica nanoparticles (MSNs)/silver nanoparticles (AgNPs): promising hybrid materials for detection of breast cancer cells. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 33(10), 7515-7527. DOI:10.1007/s10854-022-07891-w

75. Pothipor, C., Jakmune, J., Bamrungsap, S., & Ounnunkad, K. (2021). An electrochemical biosensor for simultaneous detection of breast cancer clinically related microRNAs based on a gold nanoparticles/graphene quantum dots/graphene oxide film. *Analyst*, 146(12), 4000-4009.doi: 10.1039/d1an00436k.

76. Pryshchepa, O., Pomastowski, P., & Buszewski, B. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 284. DOI: 10.1016/j.cis.2020.102246
77. Pryshchepa, O., Pomastowski, P., & Buszewski, B. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 284. DOI: 10.1016/j.cis.2020.102246
78. Rajaboopathi, S., & Thambidurai, S. (2018). Enhanced photocatalytic activity of Ag-ZnO nanoparticles synthesized by using Padina gymnospora seaweed extract. *Journal of Molecular Liquids*, 262, 148-160. DOI: 10.1016/j.molliq.2018.04.073
79. Rane, A. N., Baikar, V. V., Ravi Kumar, V., & Deopurkar, R. L. (2017). Agro-industrial wastes for production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* ANR 88 and its application in synthesis of silver and gold nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, 8, 492. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00492
80. Reddy, A. S., Chen, C. Y., Chen, C. C., Jean, J. S., Fan, C. W., Chen, H. R., ... & Nimje, V. R. (2009). Synthesis of gold nanoparticles via an environmentally benign route using a biosurfactant. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9(11), 6693-6699. DOI: 10.1166/jnn.2009.1347
81. Reddy, A. S., Chen, C. Y., Chen, C. C., Jean, J. S., Fan, C. W., Chen, H. R., ... & Nimje, V. R. (2009). Synthesis of gold nanoparticles via an environmentally benign route using a biosurfactant. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9(11), 6693-6699. DOI: 10.1166/jnn.2009.1347
82. Roya S., Das T.K., Maiti G.P., Basu U. Microbial biosynthesis of nontoxic gold nanoparticles. *Journal Mater. Sci. Eng.* 2016; № 203: 41–51. DOI: 10.1016/j.mseb.2015.10.008
83. Saeed, A. A., Sánchez, J. L. A., O'Sullivan, C. K., & Abbas, M. N. (2017). DNA biosensors based on gold nanoparticles-modified graphene oxide for the detection of breast cancer biomarkers for early

diagnosis. *Bioelectrochemistry*, 118,

91-99.doi:

10.1016/j.bioelechem.2017.07.002

84. Shah, V., Bharatiya, B., Mishra, M. K., Ray, D., & Shah, D. O. (2019). Molecular insights into sodium dodecyl sulphate mediated control of size for silver nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*, 273, 222-230. DOI: 10.1016/j.molliq.2018.10.042

85. Shani Raj Suresh, Chand Mali, Rohini Trivedi. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Enicostemma axillare* (Lam.) leaf extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Volume 503, Issue 4, 2018, Pages 2814-2819 . doi:10.1016/j.bbrc.2018.08.045

86. Shikha, S., Chaudhuri, S. R., & Bhattacharyya, M. S. (2020). Facile one pot greener synthesis of sophorolipid capped gold nanoparticles and its antimicrobial activity having special efficacy against gram negative *Vibrio cholerae*. *Scientific reports*, 10(1), 1463. DOI: 10.1038/s41598-019-57399-3

87. Singh, P., Katkar, P. K., Patil, U. M., & Bohara, R. A. (2021). A robust electrochemical immunosensor based on core-shell nanostructured silica-coated silver for cancer (carcinoembryonic-antigen-CEA) diagnosis. *RSC advances*, 11(17), 10130-10143.doi: 10.1039/d0ra09015h.

88. 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*, 4277-4290. DOI: 10.2147/IJN.S48913

89. 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*, 4277-4290. DOI: 10.2147/IJN.S48913

90. Su, H., Li, S., Jin, Y., Xian, Z., Yang, D., Zhou, W., ... & Kerman, K. (2017). Nanomaterial-based biosensors for biological detections. *Advanced Health Care Technologies*, 19-29. doi: 10.2147/AHCT.S94025
91. U.S. Pharmacopeia USP29 [Electronic resource] access mode: <http://www.pharmacopeia.cn/usp.asp>
92. Vasudevan, S., & Prabhune, A. A. (2018). Photophysical studies on curcumin-sophorolipid nanostructures: Applications in quorum quenching and imaging. *Royal Society Open Science*, 5(2), 170865. DOI: 10.1098/rsos.170865
93. Vorobyova V.I., Vasyliiev G.S., Pylypenko I.V., Skiba M.I. COMPOSITE BASED ON KAOLIN AND SILVER NANOPARTICLES SYNTHESIZED USING GRAPE PROCESSING WASTE. Вчені записки ТНУ імені В.І. Вернадського. Серія: Технічні науки. 2021, Том 32 (71) , Ч. 2 № 2. DOI :10.32838/2663-5941/2021.2-2/15
94. Wang X, Hou T, Lin H, Lv W, Li H, Li F. In situ template generation of silver nanoparticles as amplification tags for ultrasensitive surface plasmon resonance biosensing of microRNA. *Biosens Bioelectron*. 2019;137:82–87. doi: 10.1016/j.bios.2019.05.006.
95. Wang, H. N., Crawford, B. M., Norton, S. J., & Vo-Dinh, T. (2019). Direct and label-free detection of microRNA cancer biomarkers using SERS-based plasmonic coupling interference (PCI) nanoprobe. *The Journal of Physical Chemistry B*, 123(48), 10245-10251. doi: 10.1021/acs.jpccb.9b06804.
96. Wignarajah, S., Chianella, I., & Tothill, I. E. (2023). Development of electrochemical immunosensors for HER-1 and HER-2 analysis in serum for breast cancer patients. *Biosensors*, 13(3), 355. doi:10.3390/bios13030355
97. Yazdanparast S, Benvidi A, Banaei M, Nikukar H, Tezerjani MD, Azimzadeh M. Dual-aptamer based electrochemical sandwich biosensor for MCF-7 human breast cancer cells using silver nanoparticle labels and a poly(glutamic acid)/MWNT nanocomposite. *Mikrochim Acta*. 2018;185:405. doi: 10.1007/s00604-018-2918-z.

98. Yola, M. L., Atar, N., & Özcan, N. (2021). A novel electrochemical lung cancer biomarker cytokeratin 19 fragment antigen 21-1 immunosensor based on Si₃N₄/MoS₂ incorporated MWCNTs and core-shell type magnetic nanoparticles. *Nanoscale*, 13(8), 4660-4669. doi: 10.1039/d1nr00244a.
99. Yu, C. X., Xiong, F., & Liu, L. L. (2020). Electrochemical biosensors with silver nanoparticles as signal labels. *International Journal of Electrochemical Science*, 15(5), 3869-3890. Doi:10.20964/2020.05.53
100. Yuan, J., Duan, R., Yang, H., Luo, X., & Xi, M. (2012). Detection of serum human epididymis secretory protein 4 in patients with ovarian cancer using a label-free biosensor based on localized surface plasmon resonance. *International journal of nanomedicine*, 2921-2928. doi: 10.2147/IJN.S32641.
101. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol.* 2016, №17(9):1534. doi: 10.3390/ijms17091534.
102. Zhang, Y., Gao, G., Liu, H., Fu, H., Fan, J., Wang, K., ... & Cui, D. (2014). Identification of volatile biomarkers of gastric cancer cells and ultrasensitive electrochemical detection based on sensing interface of Au-Ag alloy coated MWCNTs. *Theranostics*, 4(2), 154. doi: 10.7150/thno.7560.
103. Zhou, W., Ma, Y., Yang, H., Ding, Y., & Luo, X. (2011). A label-free biosensor based on silver nanoparticles array for clinical detection of serum p53 in head and neck squamous cell carcinoma. *International journal of nanomedicine*, 381-386. doi: 10.2147/IJN.S13249.
104. Інститут демографії та проблем якості життя Національної академії наук України [Електронний ресурс] режим доступу: <https://old.nas.gov.ua/UA/Org/ScientificDirections/Pages/Default.aspx?OrgID=0000033>