

ДОСЛІДЖЕННЯ МОЖЛИВОСТЕЙ ВИКОРИСТАННЯ ДРІЖДЖІВ ДЛЯ СИНТЕЗУ НАНОЧАСТОК МЕТАЛІВ

О. О. ЛУЦЬЙ, М. В. МАКАРЕНКО, В. В. МОРИН, І. О. ГРЕЦЬКИЙ,
О. А. ШИДЛОВСЬКА

Київський національний університет технологій та дизайну, вул. Мала
Шияновська, 2, Київ, 01011, olgashydlovska@gmail.com

Зелений синтез наночастинок металів є надзвичайно перспективним, оскільки є економічно вигідним та безпечним способом отримання ефективних агентів з яскравою біологічною дією. В роботі було проведено підбір ресурсу для синтезу наночастинок та проведено експериментальний біогенний синтез наночастинок срібла для встановлення найкращого варіанту. Таким чином, найкращими властивостями для синтезу наночастинок срібла володіє штам дріжджів *S. cerevisiae* 530. Використання супернатанту або лізату дозволяє регулювати розмір наночастинок та біологічні властивості, що полягають в ефективній антибактеріальній дії проти *E. coli* та ефективній стимуляції росту бактерії *L. delbrueckii*. Отримані результати є перспективними для подальшого вивчення та розробки комплексних антибіотичних препаратів.

1 Вступ

Синтез наночастинок металів є ключовим аспектом наукових досліджень та промислового застосування у різних галузях, включаючи каталіз, медицину та електроніку. Останнім часом зелений синтез наночастинок металів став популярним напрямком досліджень, оскільки він відзначається низьким впливом на довкілля і пропонує кілька переваг порівняно з хімічним та фізичним синтезом.

Однією з найважливіших переваг зеленого синтезу наночастинок металів є його екологічна безпека. У порівнянні з традиційним хімічним синтезом, зелений синтез вимагає меншої кількості шкідливих хімічних речовин і забруднюючих викидів. Зелені методи використовують біоресурси або нейтральні речовини, що робить їх більш прийнятними для навколишнього середовища [1].

Зелений синтез наночастинок металів надає більшу вибірковість та можливість регулювання розміру частинок. В останні роки розроблено численні методи, які дозволяють контролювати розмір та розподіл наночастинок. Ця властивість є критично важливою для налаштування властивостей наночастинок з метою їх застосування в конкретних сферах.

Зелений синтез наночасток металів може призводити до формування частинок з особливими функціональними властивостями, що дозволяють їх застосовувати в різних галузях, таких як каталіз, сенсорика, медицина і наноелектроніка [2].

Зелений синтез може бути ефективнішим та економічно вигіднішим в порівнянні з хімічним або фізичним синтезом, оскільки він може значно знизити витрати на сировину та енергію. Застосування біоресурсів та м'яких умов синтезу може зменшити витрати виробництва [3].

Наночастки срібла привертають значну увагу у наукових та медичних дослідженнях завдяки своїм унікальним властивостям та потенційному застосуванню в біологічних системах. Наночастки срібла відзначаються високою активністю проти бактерій, вірусів та грибків, що робить їх об'єктом досліджень у сферах антимікробних застосувань. Зелений синтез наночасток срібла з біоресурсів може покращити їх біологічні властивості, зменшуючи токсичність та підвищуючи ефективність. Зелений синтез наночасток срібла дозволяє знизити їхню токсичність шляхом оптимізації умов синтезу та використання біоресурсів. Це робить їх більш прийнятними для біологічних систем і підвищує їх безпеку в медичних застосуваннях [4].

Наночастки срібла можуть бути використані для доставки лікарських засобів в конкретні місця в організмі. Зелений синтез дозволяє контролювати розмір та форму наночасток, що покращує їхню здатність до призначеної доставки лікарських препаратів [5]. Наночастки срібла можуть бути використані для покращення методів діагностики та зображення в медицині. Вони можуть функціонувати як контрастні агенти для позитронно-емісійної томографії (ПЕТ), магнітно-резонансної томографії (МРТ) та інших методів [6].

Зелений синтез наночасток срібла відкриває широкий спектр перспектив для біологічних досліджень та медичних застосувань. Ці наночастки демонструють антимікробні властивості, можуть бути

використані для доставки лікарських засобів, покращити методи діагностики та зображення та знизити токсичність. Це робить їх важливим об'єктом досліджень і розвитку в галузі біології та медицини.

Враховуючи актуальність зеленого синтезу наночасток металів, метою нашої роботи було підібрати об'єкт та ресурс для синтезу наночасток металів.

2 Матеріали і методи

2.1 Дослідження цитотоксичності солей металів на культурі клітин дріжджів *Saccharomyces sp.*

Перед плануванням зеленого синтезу наночасток провели дослідження по толерантності можливих біологічних агентів для зеленого синтезу до вихідних солей металів. Для цього, на культурах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* 530 та *Saccharomyces cerevisiae* 1995 проаналізували цитотоксичність солей AgNO_3 та CuSO_4 в концентраціях від 0,001мМ до 10мМ. Для цього, приготували серійні розведення солей в 96-лунковому планшеті, після чого внесли до них відповідну денну культуру дріжджів, вирощену на бульйоні Сабуро (ТОВ «Фармактив», Україна), в концентрації, що відповідає 0,1ОД. Після цього інкубували 24 год при 28°C. Далі, проводили аналіз життєздатності живих клітин дріжджів за допомогою тесту із резазурином. До культур дріжджових клітин вносили по 50 мкл розчину резазуринату натрію для досягнення кінцевої концентрації 0,01%. Планшети інкубували при 37°C протягом 20 хвилин. Після цього, проводили спектроскопічні дослідження на планшетному рідері з вертикальним променем (Thermo Labsystems, Вантаа, Фінляндія) при довжинах хвиль 570 нм та 620 нм. Для оцінки цитотоксичної дії металів приймали контроль дріжджових клітин (до відповідних лунок була внесена дистильована вода замість розчину солі) за 100%. Всі дослідження були проведені у трьох повторностях, дані усереднені за допомогою медіани, похибка представляє собою

інтерквартильний розкид. Для перевірки нульової гіпотези застосовували т-критерій Вілкоксона.

2.2 Зелений синтез наночасток металів срібла та міді

Для проведення зеленого синтезу наночасток використовували сіль AgNO_3 . Біологічний матеріал був підготовлений наступним чином. В колбах з бульйоном Сабуро вносили добову культуру дріжджів (*S. cerevisiae* 530 або *S. cerevisiae* 1995) в концентрації, що відповідає 0,1 ОД. При 28°C проводили вирощування бульйонних культур при постійному перемішуванні 180 об/хв протягом 4 діб. Після інкубації відділяли надосад від біомаси за допомогою центрифугування при 3 тис. об/хв протягом 30 хвилин. Отримані надосад і біомасу використовували в якості біологічного агенту для синтезу наночасток срібла та міді. До надосаду додавали суху сіль AgNO_3 та розчиняли її для досягнення кінцевої концентрації у 100 мМ. Для біомаси готували 100 мМ розчин солі AgNO_3 на дистильованій воді, до якого додавали біомасу відповідного штаму дріжджів для отримання лізату. Після цього інкубували зразки при 37° С та 180 об/хв протягом 4 діб. Утворення наночасток аналізували візуально по зміні кольору реакційної суміші: розчин з наночастками срібла змінювався на червонувато-коричневий, а розчин з наночастками міді – на зеленувато-блакитний.

Після проведення ферментації отримані розчини з наночастками очищували за допомогою центрифугування при 3 тис. об/хв протягом 30 хвилин та стерилізації через мікрофільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Отримані очищені розчини використовували для подальших досліджень.

2.3 Визначення розмірів синтезованих наночасток методом динамічного розсіювання світла

Отримані золі наночасток були проаналізовані з використанням Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical, Великобританія) для визначення розмірів методом динамічного розсіювання світла (DLS).

2.4 Дослідження антибактеріальної дії синтезованих наночастинок срібла

Для визначення антибактеріальної дії наночастинок срібла використовували референтний штам *Escherichia coli* K12 та штам нормофлори людини *Lactobacillus delbrueckii*. Визначення антибактеріальної дії наночастинок срібла проводили за наступною схемою. Для отриманих наночастинок проводили серійні 10-кратні розведення таким чином, щоб кінцева концентрація досліджуваних зразків становила від 0,1 до 10,0 мМ. Розведення наночастинок проводили в 96-луноковому планшеті на середовища NB (ТОВ «Фармактив», Україна). До отриманих розведень вносили відповідні бактеріальні культури в кінцевій концентрації, що відповідає 0,1 ОД. Планшети інкубували при 37°C протягом доби. Після цього визначали життєздатність бактеріальних клітин за допомогою тесту з резазуринатом. До культур бактеріальних клітин вносили по 50 мкл розчину резазуринату натрію для досягнення кінцевої концентрації 0,01%. Планшети інкубували при 37°C протягом 20 хвилин. Після цього, проводили спектроскопічні дослідження на планшетному рідері з вертикальним променем (Thermo Labsystems, Вантаа, Фінляндія) при довжинах хвиль 570 нм та 620 нм. Для оцінки антибактеріальної дії наночастинок приймали контроль відповідного штаму бактеріальної культури (до лунок була внесена дистильована вода замість розчину наночастинок) за 100%. Всі дослідження були проведені у трьох повторностях, дані усереднені за допомогою медіани, похибка представляє собою інтерквартильний розкид. Для перевірки нульової гіпотези застосовували т-критерій Вілкоксона.

3 Результати досліджень

Першим етапом дослідження було встановлення цитотоксичності солей металів срібла та міді на культурах дріжджів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995. Результати дослідження цитотоксичності солі AgNO_3 представлення на рисунку 1.

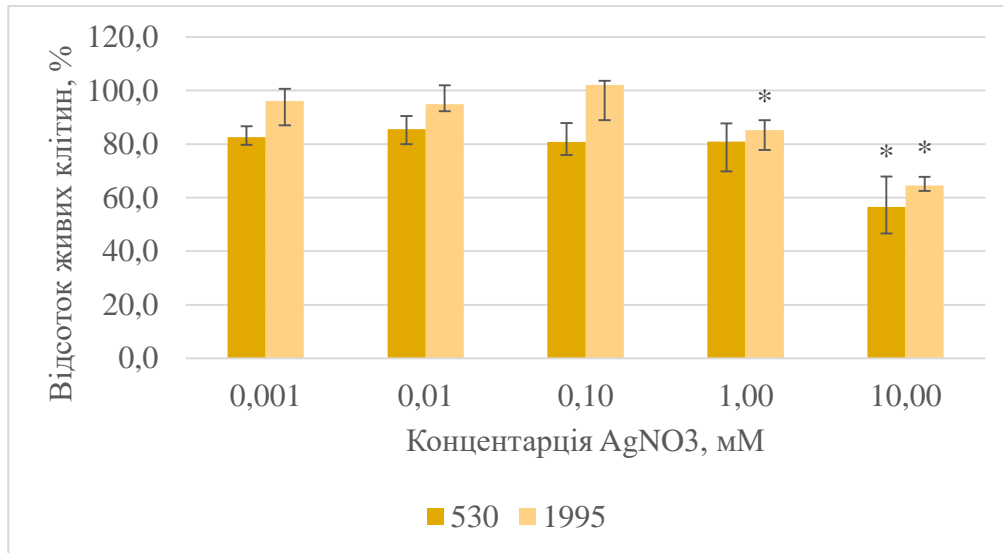


Рисунок 1 – Цитотоксичність AgNO₃ на культурах дріжджів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 (* $p \leq 0,05$)

Достовірно зниження показника відсотку живих клітин спостерігаємо в концентрації AgNO₃ 1,0 мМ для штаму *S. cerevisiae* 1995 – зниження на 19,1% ($p \leq 0,05$) в порівнянні з контролем, прийнятим за 100%. Також, в максимальній досліджуваній концентрації 10,0 мМ AgNO₃ викликає зниження життєздатності культур *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 на 44,4% та 35,5% відповідно ($p \leq 0,05$). Солі срібла, зокрема AgNO₃, відомі своєю високою токсичністю для мікроорганізмів та біологічних систем. Останні дослідження свідчать про те, що AgNO₃ може викликати відмирання дріжджів *S. cerevisiae* шляхом інгібування клітинного поділу та порушення генетичних процесів. Токсичність AgNO₃ може бути пов'язана зі змінами у структурі та функціях білків, а також іншими молекулярними подіями [7].

Сіль CuSO₄ проявила достовірне збільшення життєздатності клітин штаму *S. cerevisiae* 530 в концентраціях 0,001 мМ, 0,01 мМ та 1,0 мМ – на 2,7%, 7,3% та 4,9% відповідно (рис. 2). Даний аспект цікавий в ракурсі можливої оптимізації процесу отримання наночасток на основі біомаси дріжджових клітин.

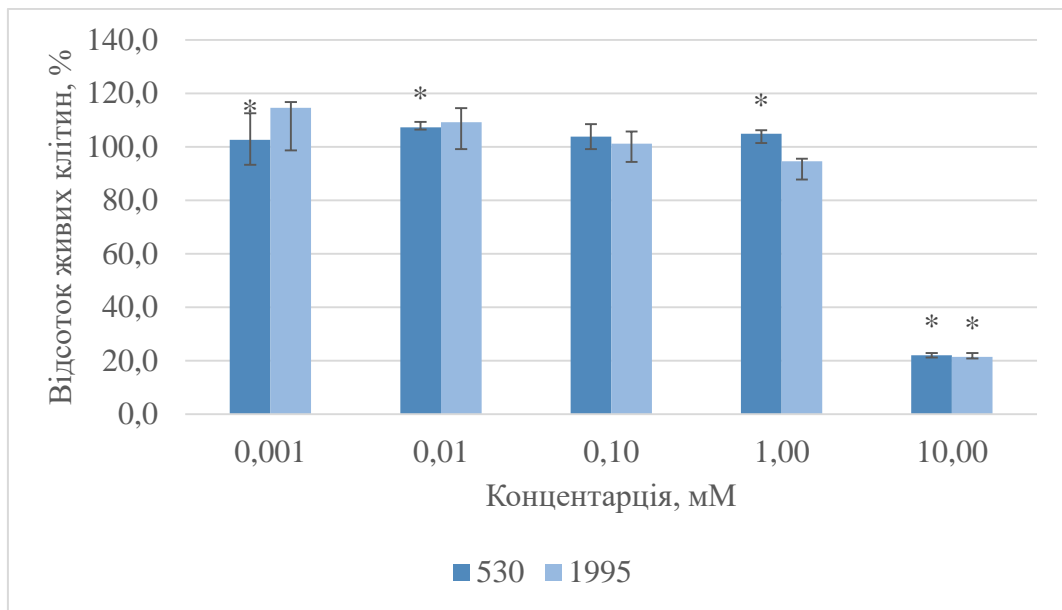


Рисунок 2 – Цитотоксичність CuSO_4 на культурах дріжджів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 (* $p \leq 0,05$)

Концентрація солі CuSO_4 10 мМ проявляє значну токсичність для обох досліджених штамів дріжджів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 – зниження показника відсотку живих клітин на 78,1% та 78,6 відповідно. Загалом, у всіх досліджених концентраціях солей AgNO_3 або CuSO_4 вони не викликають значної токсичної дії на дріжджові клітини, окрім концентрації AgNO_3 або CuSO_4 10,0 мМ. Солі міді, зокрема CuSO_4 , також виявляють токсичність для *S. cerevisiae*. Дослідження показали, що CuSO_4 може призводити до окислення та дисфункції білків у клітинах дріжджів [8]. Токсичність цієї солі також пов'язана з її здатністю до активної інтеракції з молекулами сірки та іншими біологічно активними сполуками [9]. Можна зробити висновок, що дані штами більше підходять для синтезу наночасток срібла. Тому подальший етап буде проводитися із використанням солі AgNO_3 .

За допомогою методу DLS було встановлено розміри отриманих наночасток. Результати вимірів представлені в таблиці 1. Найменший розмір наночастки мають у зразку, в якому для зеленого синтезу наночасток срібла використали біомасу дріжджів *S. cerevisiae* 530. Загалом,

синтезовані наночастки за допомогою *S. cerevisiae* 1995 мають більші розміри, ніж наночастки синтезовані за допомогою *S. cerevisiae* 530.

Таблиця 1 – Розміри синтезованих зеленим синтезом наночасток

штам <i>S. cerevisiae</i>	супернатант		біомаса (лізат)	
	1995	530	1995	530
	277,5±98,73	353,2±106,2	174,85±63,72	168,55±55,03

При дослідженні антибактеріальної дії на бактеріальному штамі *E. coli* отриманих наночасток було встановлено, що всі зразки володіють антибактеріальною дією на рівні контролю – розчину AgNO_3 відповідної концентрації (рис. 3). Проте, для зразків наночасток срібла, отриманих з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 в концентрації 0,1 мМ, показана більша антибактеріальна дія, ніж для контролю AgNO_3 – значення на 16,7% та 36,7% менші, ніж у контролі AgNO_3 в концентрації 1 мМ.

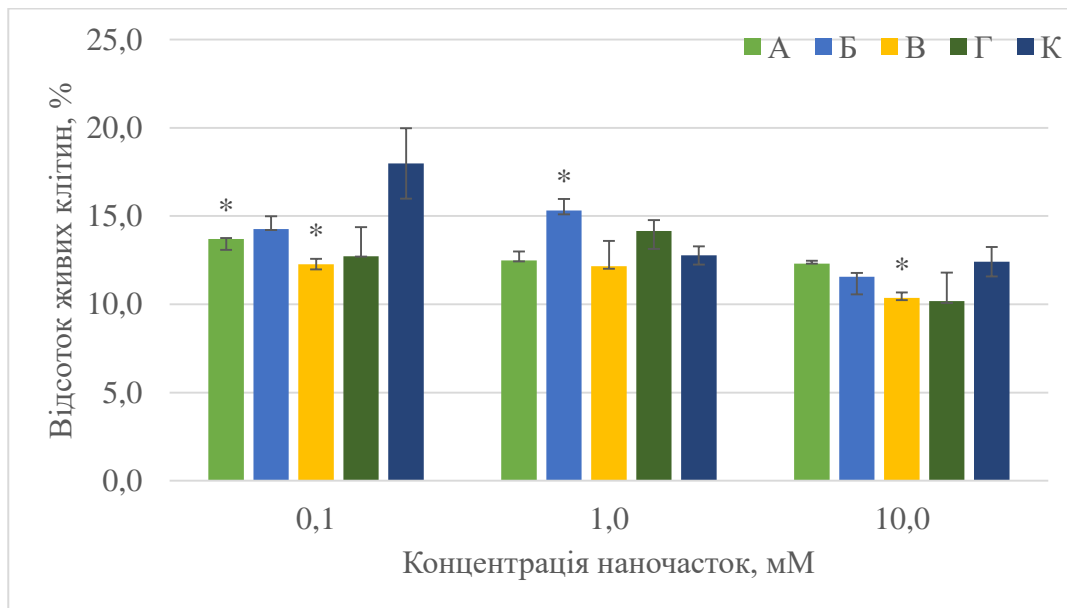


Рисунок 3 – Антибактеріальна дія наночасток, отриманих з А – супернатанту *S. cerevisiae* 530, Б – супернатанту *S. cerevisiae* 1995, В – лізату *S. cerevisiae* 530, Г – лізату *S. cerevisiae* 530 на *E. coli*. К – розчин солі AgNO_3 (* $p \leq 0,05$)

Також, для зразку наночасток, отриманих з лізату *S. cerevisiae* 530 показано зниження значення відсотку живих клітин на 16,1% в порівнянні з AgNO_3 в концентрації 10 мМ. AgNPs спричиняють зупинку клітинного

поділу у бактеріях шляхом впливу на структуру ДНК та мембранних білків [10]. AgNPs також взаємодіють з ферментами бактерій, порушуючи їхні молекулярні процеси та призводячи до інгібування росту та розмноження [11]. Генерування вільних радикалів кисню: AgNPs можуть генерувати вільні радикали кисню, які завдають пошкоджень бактеріальним мембранам та біологічним молекулам [12]. Останні дослідження вказують на ефективність AgNPs, отриманих зеленим синтезом на дріжджах *S. cerevisiae*, у боротьбі з різними видами бактерій, включаючи патогенні штами, що виявили стійкість до антибіотиків [13]. Ці дослідження відкривають перспективи використання AgNPs як антибактеріальних агентів у медицині та інших галузях.

При дослідженні антибактеріальної дії на *L. delbrueckii*, було встановлено, що всі досліджені наночастки не володіють цитотоксичною дією, навпаки, вони здатні інтенсифікувати життєздатність клітин *L. delbrueckii*. При порівнянні з контролем, AgNO₃ в концентрації 0,1 мМ, спостерігали підвищення показника живих клітин для зразків, отриманих з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 та з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 1995 на 23,4%, 12,5%, 14,4% та 19,1% відповідно (рис. 4).

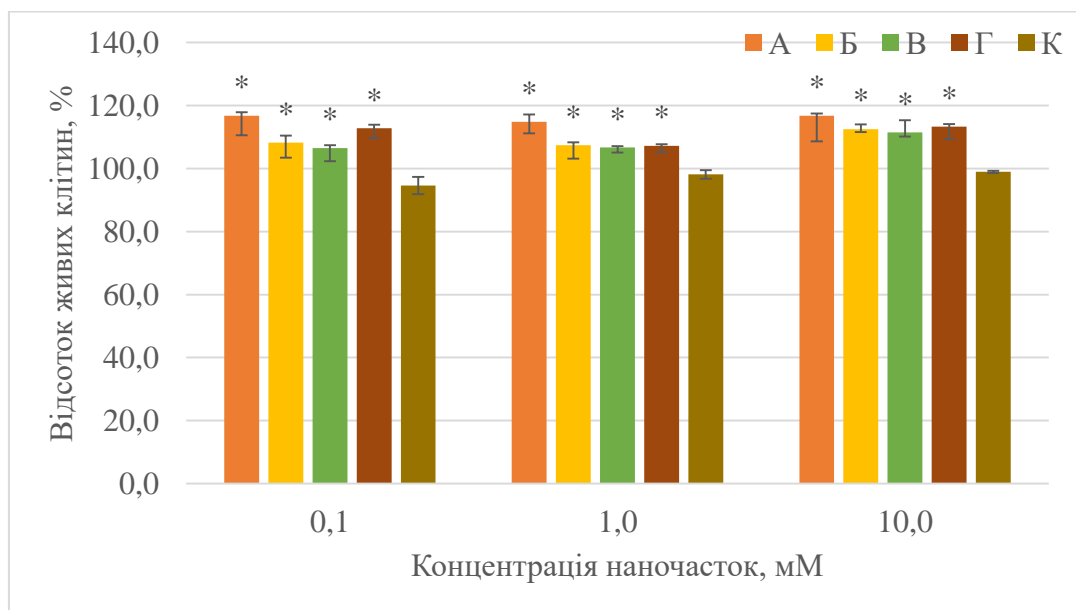


Рисунок 4 – Антибактеріальна дія наночасток, отриманих з А – супернатанту *S. cerevisiae* 530, Б – супернатанту *S. cerevisiae* 1995, В – лізату *S. cerevisiae* 530, Г – лізату *S. cerevisiae* 530 на *L. delbrueckii*. К – розчин солі AgNO₃ (* $p \leq 0,05$)

При порівнянні з контролем, AgNO_3 в концентрації 1,0 мМ, спостерігали підвищення показника живих клітин для зразків, отриманих з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 та з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 1995 на 17,1%, 8,7%, 9,4% та 9,2% відповідно. При порівнянні з контролем, AgNO_3 в концентрації 10,0 мМ, спостерігали підвищення показника живих клітин для зразків, отриманих з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 та з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 1995 на 17,9%, 12,6%, 13,7% та 14,5% відповідно. Загалом, найбільший позитивний вплив на життєздатність клітин *L. delbrueckii* мають наночастки срібла, отримані з супернатанту *S. cerevisiae* 530. Подібних досліджень в науковій літературі на даний момент не існує, а тому перспектива посилення життєдіяльності бактерій нормофлори людини є надзвичайно важливою та перспективною.

Висновки

В даній роботі було проведено дослідження витривалості дріжджових клітин штамів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 до різних концентрацій солей AgNO_3 або CuSO_4 . Встановлено, що найкраще всього дріжджі переносять вплив солі AgNO_3 . Саме тому, було проведено синтез наночасток срібла за допомогою двох штамів *S. cerevisiae* та в різних схемах, а саме з використанням лізату та супернатанту. Було встановлено, що найменші наночастки були отримані з використанням лізату *S. cerevisiae* 530, проте найефективнішу антибактеріальну дію проявили наночастки, отримані з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 в концентрації 0,1 мМ. Також, варто зазначити, що й позитивніший ефект щодо посилення життєздатності клітин нормофлори людини *L. delbrueckii* має зразок наночасток, отриманий з супернатанту *S. cerevisiae* 530. Таким чином, нами було встановлено, що саме штам дріжджів *S. cerevisiae* 530 найкраще підходить для синтезу наночасток срібла, а умови проведення біогенного синтезу можуть регулювати розмір наночасток та їх біологічні властивості. Отримані результати можуть бути доповнені розширеним

спектром біологічним досліджень. Більше того, наночастки срібла, отримані зеленим синтезом, мають перспективи у застосування комплексної терапії бактеріальних захворювань.

Література

1. Ying, S., Guan, Z., Ofoegbu, P. C., Clubb, P., Rico, C., He, F., & Hong, J. Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. *Environmental Technology & Innovation*. 2022, 26, 102336-102356.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186422000359>
2. Pandit, C., Roy, A., Ghotekar, S., Khusro, A., Islam, M. N., Emran, T. B., Lam, S. E., Khandaker, M. U., Bradley, D. A. Biological agents for synthesis of nanoparticles and their applications. *Journal of King Saud University-Science*. 2022, 34(3), 101869-101882.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364722000507>
3. Vijayaram, S., Razafindralambo, H., Sun, Y. Z., Vasantharaj, S., Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S. H., Raeeszadeh, M. Applications of Green Synthesized Metal Nanoparticles—A Review. *Biological Trace Element Research*. 2023, 1-27. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-023-03645-9>
4. Vishwanath, R., Negi, B. Conventional and green methods of synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial properties. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. 2021, 4, 100205-100217.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666086521001521>
5. Gomes, H. I., Martins, C. S., Prior, J. A. Silver nanoparticles as carriers of anticancer drugs for efficient target treatment of cancer cells. *Nanomaterials*. 2021, 11(4), 964-995. <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/4/964>
6. Nadaf, S. J., Jadhav, N. R., Naikwadi, H. S., Savekar, P. L., Sapkal, I. D., Kambli, M. M., Desai, I. A. Green synthesis of gold and silver nanoparticles: Updates on research, patents, and future prospects. *OpenNano*. 2022, 100076-1000101.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S235295202200038X>

7. Robinson, J. R., Isikhuemhen, O. S., Anike, F. N., Subedi, K. Physiological Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Silver Stress. *Journal of Fungio* 2022, 8(5), 539. <https://www.mdpi.com/2309-608X/8/5/539>
8. Guo, X. N., He, X. X., Zhang, L. B., Cheng, Y. F., Bai, X. M., Wang, Z. Y., He, X. P. Enhancement of copper uptake of yeast through systematic optimization of medium and the cultivation process of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2022, 194(5), 1857-1870. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-021-03775-7>
9. Abe, F. Molecular responses to high hydrostatic pressure in eukaryotes: Genetic insights from studies on *saccharomyces cerevisiae*. *Biology*. 2021, 10(12), 1305-1330. <https://www.mdpi.com/2079-7737/10/12/1305>
10. Roy, A., Bulut, O., Some, S., Mandal, A. K., Yilmaz, M. D. Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC advances*. 2019, 9(5), 2673-2702. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/ra/c8ra08982e>
11. Skóra, B., Krajewska, U., Nowak, A., Dziedzic, A., Barylyak, A., Kus-Liśkiewicz, M. (2021). Noncytotoxic silver nanoparticles as a new antimicrobial strategy. *Scientific Reports*. 2021, 11(1), 13451-. <https://www.nature.com/articles/s41598-021-92812-w>
12. Salleh, A., Naomi, R., Utami, N. D., Mohammad, A. W., Mahmoudi, E., Mustafa, N., Fauzi, M. B. The potential of silver nanoparticles for antiviral and antibacterial applications: A mechanism of action. *Nanomaterials*. 2020, 10(8), 1566-1586. <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/8/1566>
13. Kharchenko, Y., Lastovetska, L., Maslak, V., Sidorenko, M., Vasylenko, V., & Shydlovska, O. Antibacterial Activity of Green Synthesised Silver Nanoparticles on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Sciences*. 2022, 12(7), 3466-3477. <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/7/3466>