

УДК 535.31; 681.7; 53.082.5  
№ держреєстрації 0121U113755  
Інв. № \_\_\_\_\_

Міністерство освіти і науки України  
Сумський державний університет (СумДУ)  
40017, м.Суми, вул. Римського-Корсакова, 2; тел. (0542)330172,  
факс (0542)334049, E-mail: kanc@sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Ректор СумДУ  
к. фіз.-мат. наук, доцент  
\_\_\_\_\_ Василь КАРПУША

ЗВІТ  
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ  
за договором від 08.11.2021 р. № М/1-2021п1

**Розробка наноструктурованих оптичних сенсорних систем для виявлення  
*K. pneumoniae***  
грантова підтримка спільних українсько-латвійських науково-дослідних проєктів  
у 2021 році

**ФОРМУВАННЯ ОПТИЧНОЇ БІОСЕНСОРНОЇ ПЛАТФОРМИ НА  
ОСНОВІ НАНОКОМПОЗИТИВ ZNO**

(Етап1)

(остаточний)

Керівник НДР  
к. мед.н., доцент

Вікторія ГОЛУБНИЧА

2021

Рукопис закінчено 10 грудня 2021 р.  
Результати цієї роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від 14.12.2021 року № 6

**СПИСОК АВТОРІВ**

Доцент кафедри громадського здоров'я, кандидат медичних наук	10.12.2021	В.М. Голубнича (Вступ, Розділ 1, 2, Висновки)
Старший науковий співробітник Центру колективного користування наукового обладнання ННМІ «Центр біомедичних досліджень», кандидат медичних наук	10.12.2021	В.В.Корнієнко (Розділ 2, 3.1)
Молодший науковий співробітник ЦККНО ННМІ «Центр біомедичних досліджень», кандидат фізико- математичних наук	10.12.2021	Р.В. Вітер Розділ 2, 3.1)
Науковий співробітник ЦККНО ННМІ «Центр біомедичних досліджень», аспірант	10.12.2021	Є.В. Гусак (Розділ 2.2)
Молодший науковий співробітник, аспірант	10.12.2021	О.І. Тверезовська (Розділ 2.1)

## РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 43 с., 1 табл., 15 рис., 47 джерел.

### БИОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ, *K. PNEUMONIAE*, ZNO, ОПТИЧНІ СЕНСОРИ

Об'єкт дослідження – імуно-фото-хімічні реакції за участі нанокompозитних систем, іммобілізованих на поверхні скла.

Мета роботи – створення фотолюмінісцентної платформи, на основі ZnO-полідопамін, ZnO-поліанілін та ZnO-Au наноструктур, яка дозволить виявляти *K. pneumoniae* в дослідних зразках біологічного походження.

У ході виконання проекту авторами було сформовано теоретичні та методологічні засади та вдосконалена методика створення біоселективних шарів на основі композитів ZnO. Синтезовано та охарактеризовані структура, оптичні та електронні властивості наноструктур ZnO методами SEM, EDX, FTIR, Рамановська спектроскопія та оптичними методами. Сформовано біоселективний шар на поверхні наноструктур ZnO в межах ковалентного зв'язування специфічних антитіл та охарактеризовано структуру, оптичні та електронні властивості наноструктур ZnO після їх біофункціоналізації методами SEM та оптичними методами.

Проведено ідентифікацію та серотипування штамів *K. pneumoniae*, виділених від пацієнтів і носіїв, і відібрано найбільш поширені антигенні типи мікроорганізмів. У цьому дослідженні визначено чутливість мікроорганізмів до одинадцяти антибіотиків. Виявлено високий рівень мультирезистентності серед штамів *K. pneumoniae*. НЧ Ag мають потужний антибактеріальний та антибіоплівковий потенціал проти мультирезистентних *K. pneumoniae*.

## ЗМІСТ

С.

Вступ.....	5
1 Огляд літератури.....	8
1.1 Епідеміологічне значення <i>K.pneumoniae</i> , як збудника інфекційних захворювань та представника нормальної мікробіоти, та її біологічні властивості .....	8
1.2 Оптичні біосенсори та їх використання для ідентифікації мікроорганізмів .....	10
2 Матеріали та методи дослідження.....	13
2.1 Дослідження поширеності та біологічних властивостей <i>K. pneumoniae</i> , виділеної від пацієнтів та з інших джерел.....	13
2.2 Синтез та характеристика морфологічної структури, оптичних та електронних властивостей наноструктур ZnO	16
3 Результати дослідження та їх обговорення.....	18
3.1 Поширеність та біологічні властивості <i>K. pneumoniae</i> , виділеної від пацієнтів та з інших джерел	18
3.2 Характеристика морфологічної структури, оптичних та електронних властивостей наноструктур ZnO	24
Висновки.....	36
Перелік джерел посилання.....	37

## ВСТУП

В багатьох дослідженнях вказано, що резистентність до протимікробних препаратів має комплексний вплив на пацієнтів, охорону здоров'я та економіку в усіх країнах. Патогени ESKAPE викликають занепокоєння через їхню стійкість до антимікробної терапії, збільшення тривалості лікування та фінансовий тягар для населення. здоров'я. В даний час *K.pneumoniae* є одним з найважливіших видів серед грамнегативних мікробів цієї групи, який часто асоціюють із внутрішньолікарняними інфекціями, серед яких зустрічається весь спектр патології від запалення сечостатевої шляхів до бактеріємії. Протягом кількох останніх десятиліть відмічається зростання кількості штамів *K. pneumoniae* з множинною лікарською стійкістю, які мають ознаки госпітальних. Стійкість і вірулентність не є незалежними властивостями, і їх взаємозв'язок може відігравати важливу роль у патогенезі інфекцій *K. pneumoniae*. Наявні дослідження щодо можливості передачі детермінант вірулентності (генів) між бактеріями шляхом горизонтального перенесення генів і перенесення ДНК. Вірулентність і стійкість схожі і мають спільне поширення та спільний підбір генів вірулентності та резистентності. Тому дуже актуальними є питання дослідження поширеності антибіотикорезистентних штамів *K. pneumoniae* в популяції та встановлення найбільш поширених серотипів.

У наш час виявлення *K. pneumoniae* може бути здійснено з використанням класичного бактеріологічного методу, однак даний метод є тривалим у часі. Іншою методикою, яка дозволяє проводити детекцію мікроорганізма, є полімеразно ланцюгова реакція, однак дана технологія є дороговартісною та вимагає наявності висококваліфікованих спеціалістів та техніки, що певним чином обмежує його застосування.

Тому останнім часом дуже актуальним завданням є розробка нового, простого інструменту для детекції *K. pneumoniae*. Одним із ефективних розв'язань даної проблеми може бути пристрій на основі біосенсорної технології, зокрема імуносенсорів. Перевагами імуносенсорів є використання простого обладнання,

висока чутливість і вибірковість, а також сумісність з мініатюрними та портативними системами.

Оксид цинку (ZnO) є важливим широкозонним напівпровідниковим матеріалом, що широко застосовується в сучасному світі та медицині. Розробка нано-пристроїв на основі його унікальних фізичних властивостей є ефективним вирішенням багатьох питань біомедичного спрямування. Наноструктурований ZnO володіє не тільки високою площею поверхні, але й хорошою біосумісністю, хімічною стабільністю, нетоксичністю, і в той же час він має біоміметичні та високоелектронні комунікаційні функції, які є важливими при створенні біосенсорів. Поверхня наноматеріалів ZnO має хімічну функціональність, необхідну для ковалентної дериватизації, що дозволяє зв'язувати специфічні біомолекули і підвищити специфічність біомолекулярна взаємодія.

При цьому відкритими залишаються питання розробки ефективної біосенсорної платформи із цих наноматеріалів на основі ZnO для виявлення *K. pneumoniae*.

Метою етапу виконання проекту сформуванню оптичну біосенсорну платформу на основі нанокомпозитів ZnO

Виконання етапу проекту передбачало вирішення наступних завдань:

- Синтезувати та охарактеризувати структуру, оптичні та електронні властивості наноструктур ZnO-Au, Zn-PANI та ZnO-PDA методами FTIR, Raman, SEM та оптичними методами
- Провести ідентифікацію та серотипування штамів *K. pneumoniae*, виділених із різних джерел (пацієнтів, харчових продуктів, носіїв), і відібрати найбільш поширені антигенні типи
- Проаналізувати специфічність між антитілами до *K. pneumoniae* та антигенами *K. pneumoniae* стандартними методами (культурним, ІФА та ін.)
- Сформуванню біоселективний шар на поверхні наноструктур ZnO-Au, Zn-PANI та ZnO-PDA в межах ковалентного зв'язування специфічних антитіл

- Охарактеризувати структуру, оптичні та електронні властивості наноструктур ZnO-Au, Zn-PANI та ZnO-PDA після їх біофункціоналізації методами FTIR, Raman, SEM та оптичними методами.

Виконання досліджень дозволило отримати *нові наукові результати*, зокрема сформувані теоретичні та методологічні засади та вдосконалити методику створення біоселективних шарів на основі композитів ZnO. Синтезовано та охарактеризовані структура, оптичні та електронні властивості наноструктур ZnO методами SEM, EDX, FTIR, Рамановська спектроскопія та оптичними методами. Сформовано біоселективний шар на поверхні наноструктур ZnO в межах ковалентного зв'язування специфічних антитіл та охарактеризовано структуру, оптичні та електронні властивості наноструктур ZnO після їх біофункціоналізації методами SEM та оптичними методами.

Проведено ідентифікацію та серотипування штамів *K. pneumoniae*, виділених від пацієнтів і носіїв, і відібрано найбільш поширені антигенні типи мікроорганізмів. У цьому дослідженні визначено чутливість мікроорганізмів до одинадцяти антибіотиків. Виявлено високий рівень мультирезистентності серед штамів *K. pneumoniae*. Досліджено ефективність НЧ Ag антибактеріальної та антибіоплівкової дії кий потенціал проти мультирезистентних *K. pneumoniae*. Таким чином, наші результати підкреслюють, що НЧ Ag мають багатообіцяючі антимікробні та антибіоплівкові властивості проти мультирезистентних клінічних штамів *K. pneumoniae*.

#### *Практична значимість проведених досліджень.*

Практична цінність отриманих результатів за перший етап 2021 року полягає у тому, що отримані результати можуть бути використані для формування біоселективних шарів у оптичних біосенсорах для детекції мікроорганізмів, що є актуальним для біомедичної галузі, сільського господарства, харчової промисловості. Досліджено частоту виділення різних серотипів *K.pneumoniae* в матеріалі від хворих та носіїв, та оцінено їх чутливість до основних груп антибіотиків, як маркерів нозокоміальних штамів.

## 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Епідеміологічне значення *K. pneumoniae*, як збудника інфекційних захворювань та представника нормальної мікробіоти, та її біологічні властивості

*Klebsiella pneumoniae* набуває все більшого медичного значення серед *Enterobacteria* spp. [1], як вид відповідальний за виникнення різних інфекційних патологій. Бактерії часто виявляють у харчових продуктах, стічних водах, ґрунті, рослинах та шлунково-кишковому тракті тварин [2]. Він займає друге місце після кишкової палички, як збудник, що відповідає за різноманітні соціальні та внутрішньолікарняні інфекції [3]. Патоген відповідає за значну кількість захворювань людини, починаючи від ранових інфекцій і закінчуючи септицемією. Неадекватне застосування антибіотиків сприяє формуванню у мікроорганізмів стійкості до лікарських засобів широкого спектру дії. Це призводить до зростання кількості госпітальних інфекцій, а також збільшує смертність та фінансовий тягар на систему охорони здоров'я [4]. За даними дослідників *K. pneumoniae* викликає госпітальну інфекцію від 55,7% до 23,5% випадків [5]. Смертність від бактеріємії, асоційованої з *K. pneumoniae*, коливається від 20% до 70% залежно від типу лікування та тяжкості захворювання [6]. Кілька досліджень показують, що *K. pneumoniae* пов'язана з високим рівнем стійкості до антибіотиків [7]. Причетність *K. pneumoniae* до внутрішньолікарняних інфекцій зазначається у декількох дослідженнях [8], а наявність певних серотипів пов'язують із більшою патогенністю. Згідно з результатами, наведеними у дослідженні [9], встановлено, що ізоляти з MDR серотипом пов'язані з вищою смертністю. Окрім того зазначається поширеність K1 та K2 серотипів.

Однак, не зважаючи на важливість *K. pneumoniae*, як внутрішньолікарняного збудника, дані про її поширення та чутливість до антимікробних засобів обмежені [10]. Цей патоген також відомий, як збудник з високою здатністю до утворення біоплівки та наявності різних факторів вірулентності [11]. Інфекції, викликані



бактеріями, що утворюють біоплівку, важко піддаються лікуванню; тому вчасне виявлення патогена та пошук нових антимікробних засобів з антибіоплівковою активністю є актуальною темою для громадського здоров'я.

Деякі штами *Klebsiella pneumoniae* мають виражену капсулу, описану як тип К, яка забезпечує мукоїдний фенотип ізоляту, і є важливим фактором вірулентності[12]. Розрізняють 79 капсульних серотипів бактерії [13][14], серед яких серотипи К1 і К2 пов'язані з бактеріємією та високим рівнем смертності.

Гени, пов'язані з капсулами, є основною причиною патогенності у ізолятів *K. pneumoniae*. Фактори вірулентності, такі як *wabG* (відповідальний за біосинтез основного ліпополісахариду), *ugt* (наявність уридин дифосфат галактуронат 4-епімерази) і *uscM* (структура зовнішніх мембранних ліпопротеїнів) беруть участь у виробництві капсул і сприяють інфікуванню шляхом стійкості до фагоцитозу [15]. Плазмідний ген *gmpA* (регулятор мукоїдного фенотипу А) забезпечує гіпермукозозний фенотип *K. pneumoniae* за допомогою посилення виробництва капсульного полісахариду [16]. Ген вірулентності *wcaG* також відповідає за синтез капсули у *K. pneumoniae* та її здатність ухилятися від фагоцитозу макрофагами [17]. Відомо, що бактерії зазнають чисельних модифікацій, залежно від географічного регіону та по відношенню до часу, а тому дослідження біологічних особливостей клінічних штамів, поширеності серед них капсульних типів і наявності будь-якої кореляції між наявністю капсульних серотипів та стійкістю до антибіотиків є важливими у профілактиці захворюваності та ускладнень пов'язаних із *K. pneumoniae*. Згідно з попередніми дослідженнями[18] плазміда передається разом з генами *gmpA*, 6 PLA, пов'язаними з виробництвом капсул та представлені серотипами (К1, К2, К5, К54, К57 і КN1).

Застосування нових матеріалів у медичній практиці має вирішальне значення для боротьби з мікроорганізмами стійкими до антибіотиків. Наночастинки срібла володіють антимікробними властивостями і є перспективними у якості антимікробних засобів. Однак кілька невирішених проблем все ще залишаються.

## 1.2 Оптичні біосенсори та їх використання для ідентифікації мікроорганізмів

Класичним методом виявлення та ідентифікації *K.pneumoniae* є культивування з подальшим вивченням фенотипових ознак [19], що вимагає багато часу (один тест займає 5-7 днів) і є дорогавартісним [20]. Хоча методи, засновані на вивченні генотипу, є швидкими, вони вимагають спеціального обладнання, персоналу і недоступні для більшості звичайних лабораторій. Очевидно, що існує потреба у надійному, економічно вигідному, швидкому методі ідентифікації збудника, який дозволить виявляти *K. pneumoniae* в різних зразках.

Розроблено методику виявлення *Klebsiella* за допомогою швидких тестів (LFTS) [21]. Хоча таке дослідження проводиться протягом 15 хв та не потребує спеціального обладнання, воно не дозволяє визначити кількість мікроорганізмів у зразку, а технологічні хиби можуть знизити точність випробування.

Пристрої, засновані на біосенсорній технології, зокрема імуносенсори можуть бути використані для розв'язання даної проблеми [22]. Перевагами імуносенсорів є проста будова пристроїв, їх висока чутливість, селективність та сумісність з мініатюризованими та переносними системами. У якості детектора можуть бути антибіотики [23] ферменти [24] ДНК або живі клітини [25].

Серед різних сенсорних матеріалів широко використовуються наноструктури ZnO в різних типах пристроїв, завдяки їх електронним та оптичним властивостям [26]. Ряд дослідників вивчали оптичні та оптоелектронні датчики та біосенсори на основі наноструктур ZnO [27]. Раніше повідомлялося про застосування нанородів ZnO для виявлення збудників інфекційних хвороб у тварин [28]. Хороші результати були досягнуті для виявлення специфічних антигенів у межах зміни фотолюмінесценції ZnO. Біоселективний шар утворювався антибіотиками, прикріпленими до поверхні ZnO.

Функціональні покриття можуть бути нанесені на поверхню ZnO для формування наноструктур з серцевинною оболонкою. Функціональні полімери (поліанілін (PANI), полідопамін (PDA) тощо) та наночастинки Au можуть

покращувати оптичні та функціональні властивості ядра ZnO за рахунок утворення функціональних груп (-NH<sub>2</sub>, COOH- групи) на їх поверхні в діапазонах поглинання 420-470 нм і 540-660 нм [29]. Функціональні покриття змінюють початкові оптичні властивості ядра ZnO. Полідопамін є добре відомим біосумісним полімером [30]. PDA можна наносити практично на будь-який тип твердої підкладки, включаючи кераміку, метали, оксиди металів та полімери [31]. Хоча фізична структура PDA остаточно не вивчена, полідопамін широко застосовується в тому числі і у складі електрохімічних сенсорів та біосенсорів. У сенсорах полідопамін дуже часто використовується як зв'язуючий агент, що покращує характеристики розроблених сенсорів. Наприклад, спектри поглинання, спектри фотолюмінесценції, спектри Рамана та FTIR ZnO змінювалися завдяки взаємодії з Au, PANI та PDA та утворенням р-п-переходу або гетеропереходу на межі між ядром ZnO та функціональною оболонкою [32]. Поверхнева взаємодія між функціональними покриттями та адсорбованими молекулами впливає на електронні та оптичні властивості ядра ZnO [33]. ZnO-Au, ZnO-PDA та ZnO-PANI широко використовуються, як поверхні для плазмонно-резонансних та електрохімічних біосенсорних платформ [34]. Зокрема, повідомлялося, про модифіковані електрохімічні сенсори на основі полідопаміну/графену/MnO<sub>2</sub> для визначення триптофану в плодах та соку томатів [35]. Було розроблено ще один датчик на основі вугільного електрода, надрукованого трафаретним друком, який був ковалентно модифікований самозібраними наносферами PDA [36], декорованими Au. Такий датчик придатний для одночасного визначення аскорбінової кислоти, дофаміну, сечової кислоти та триптофану [35]. Плівкові електроди з нанопористої плівки з самопідтримкою після функціоналізації PDA продемонстрували переваги, засновані на збільшеній площі поверхні, які були добре використані при розробці сенсорів, придатних для визначення H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> та дофаміну [36]. Повідомлялось про фотоіндуковані УФ-світлом процеси, що відбуваються на інтерфейсі ZnO-PDA, та продемонстровано вплив PDA на деякі оптичні властивості сформованого композиту ZnO-PDA. Показано комплексне моделювання процесів на інтерфейсі ZnO-PDA. Показано роль шару PDA на

інтенсивність випромінювання фотолюмінесценції (ФЛ), концентрацію дефектів та квантову ефективність у наноструктурах на основі ZnO-PDA [37]. Визначено, що зміни сигналу фотолюмінесценції ZnO-PDA, такі як зміна спектральних особливостей PL та збільшення/зменшення максимумів PL за рахунок гасіння PL-випромінювання, спостерігаються після адсорбції PLL та впливають на утворені шари PDA, які були сформовані за допомогою різних концентрацій PDA[37]. Таким чином, завдяки специфічним поверхневим властивостям PDA та оптичним властивостям ZnO, нанокompозити ZnO-PDA мають великий потенціал для застосування в розробці оптичних сенсорів. Вони виявили гарну чутливість і вибірковість по відношенню до молекул-мішеней. Однак, жодних досліджень, щодо застосування цих наноструктур для створення біосенсорів, які ґрунтуються на виявленні фотолюмінесценції не проводили. Крім того, відсутність повідомлень про імунні біосенсори для виявлення *K. pneumoniae* відкриває нові перспективи для створення ефективною біосенсорної платформи із цих композитних наноматеріалів.

## 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1 Дослідження поширеності та біологічних властивостей *K. pneumoniae*, виділеної від пацієнтів та з інших джерел

#### 2.1.1 Ідентифікація та серотипування штамів *K. pneumoniae*, виділених із різних джерел (пацієнтів, носіїв)

Протягом 2019–2021 років ми дослідили 300 зразків, отриманих від пацієнтів із отоларингологічною патологією. Пацієнти були комплексно обстежені відповідно до стандартів надання медичної допомоги. Для визначення мікробного профілю досліджуваних біотопів проводили мікробіологічне дослідження мазків з носоглотки в бактеріологічній лабораторії Сумського державного університету. Видовий склад і популяційні рівні мікрофлори в уражених тканинах визначали з використанням класичних методів виділення та ідентифікації мікроорганізмів за визначником Берджи. Підрахунок кількості бактерій у досліджуваному матеріалі здійснювали шляхом секторних посівів за Голдом, з подальшим підрахунком кількості колоній.

#### 2.1.2 Визначення біологічних властивостей та профілів резистентності у виділених штамів *K. pneumoniae*

Оцінку чутливості мікроорганізмів до антибіотиків проводили з використанням диско-дифузійного методу на агарі Мюллера-Хінтона відповідно до [38] Чутливість до основних груп антибіотиків, а саме до інгібіторів  $\beta$ -лактамаз, карбапенемів, макролідів, оксазолідинонів та інших, оцінювали у відповідності до рекомендацій Національного комітету клінічних лабораторних стандартів [39]. Мультирезистентні штами відбирались в подальшому для оцінки впливу наночастинок срібла на життєздатність *K.pneumoniae* та здатність утворювати біоплівки.

НЧ Ag готували, як було описано раніше [40], при концентрації срібла 3 г/л. Наночастинки мали кубоподібну форму розміром від 80 нм до 800 нм і на них прилипали менші наночастинки срібла сферичної форми. EDX підтвердив хімічну чистоту отриманих НЧ Ag із залишковою кількістю Cl і Na.

Антимікробну активність наночастинок срібла щодо штамів *K.pneumoniae* досліджували з визначенням мінімальної інгібуючої концентрації (МІК), динаміки відмирання, інгібування утворення біоплівки та впливу на життєздатність біоплівки.

МІК оцінювали за допомогою методу мікророзведеннь у бульйоні. Спочатку готували серійні розведення НЧ Ag, і 20 мкл кожної концентрації вносили в 96-лунковий планшет з полістиролу. Інокулянт із свіжих культур *K.pneumoniae* готували в бульйоні Мюллера-Хінтона в концентрації  $5 \times 10^5$  КУО/мл. Потім до розчину срібла додавали 180 мкл бактеріальної суспензії для досягнення бажаних концентрацій срібла (0,31 мкг/мл – 40 мкг/мл). Планшети інкубували при 37°C протягом 24 год. Дослідження проводили у трьох повторах. МІК була найнижчою концентрацією НЧ Ag, що повністю пригнічувала візуальний ріст мікробів.

Залежну від часу динаміку відмирання бактерій визначали при концентрації бактерій  $5 \times 10^5$  КУО/мл і концентрації НЧ Ag, що дорівнювала МІК. Інкубація бактерій проводилась у бульйоні Мюллера-Хінтона, що містив НЧ Ag, при 37 °С. Через 1, 3, 6, 12, 24 години після початку інкубації аліквоти (10 мкл) з кожної лунки висівались на агар Мюллера-Хінтона з використанням методу секторних посівів. Середовище інкубувалось при 37 °С у продовж доби, після чого підраховували сформовані колонії.

Вплив НЧ Ag на утворенні біоплівки було встановлено шляхом оцінки коефіцієнта зменшення мікробної маси, утвореної біоплівки, з використанням фарбування генціанвіолетом. Попередньо бактерії інкубували в 96-лункових мікротитраційних планшетах, що містили розчини НЧ Ag при половинній і повній МІК протягом 24 годин. Потім культуральну рідину забирали, та промивали планшет для видалення неадгезованих клітин, а масу біоплівки, прикріплену до лунок, фарбували 0,1% генціановим фіолетовим (30 хвилин). Після цього барвник

видаляли, лунки промивали тричі фізрозчином, просушували та заливали 95% розчином етанолу для вимавання зв'язаного клітинами генціанвіолету. Спиртовий розчин барвника переносили в новий планшет та вимірювали оптичну густина розчиненого кристалічного фіолетового за допомогою мікропланшетного фотометра Thermo Scientific Multiscan FC ESW 1.01.16 (довжина хвилі 595 нм). Усі тести проводили тричі. Коефіцієнт зменшення мікробної біомаси розраховували, як пропорцію оптичної густини досліджуваного зразка до оптичної густини контролю у відсотковому еквіваленті.

Для дослідження впливу наночастинок срібла на попередньо сформовані біоплівки мікроорганізми спочатку інкубували протягом різних інтервалів часу (48 і 120 годин). Потім у лунки додавали НЧ Ag у концентраціях 10, 20, 30 та 40 мкг/мл та інкубували протягом 24 год. Потім проводили оцінку життєздатності мікроорганізмів за допомогою колориметричного аналізу редукції Alamar blue таким чином: в планшети після інкубування вносили розчин барвника Alamar blue в поживному середовищі з подальшим інкубуванням упродовж 2-4 год при 37 ° C у темряві. На наступному етапі середовище переносили на інший 96-лунковий планшет, та вимірювали поглинання за допомогою зчитувача для планшетів Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) на довжинах хвиль 570 та 595 нм. Відсоток життєздатності клітин розраховували за формулою:

$$\frac{((117216 * EOD570) - (80586 * EOD595))}{((117216 * EOD570) - (80586 * EOD595))} * 100,$$

де EOD570 та EO D595 – оптична щільність оброблених клітин, виміряна при 570 та 595 нм відповідно, COD570 та COD595/OD – оптична густина, виміряна при 570 та 595 нм у контрольних лунках.

Дію НЧ Ag на будову біоплівок оцінювали за допомогою СЕМ. Для оформування біоплівок скло занурювали в посів на *K.pneumonia* в бульйоні Мюллера-Хінтона та інкубували протягом 0, 48, 120 год. Після цього додавали НЧ Ag в концентраціях 10, 20, 30 і 40 мкг/мл та інкубували протягом 24 год. Потім скельця фіксували в 2,5% глутарового альдегідуі, промивали в буфері, та зневоднювали шляхом занурення в серію розчинів 50, 70, 90 і 100% етанолу. Скло

покривали сріблом і досліджували за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEM, Hitachi S-3000N).

## 2.2 Синтез та характеристика морфологічної структури, оптичних та електронних властивостей наноструктур ZnO

### 2.2.1 Синтез ZnO та його нанесення на субстратні скельця

Наностержні ZnO утворено гідротермальним методом (схема 1A). Коротко: шар з наночастинок ZnO (ZnO NRs) було утворено на склі шляхом крапельного нанесення 20 мкл цинку ацетату  $Zn(CH_3COO)_2$  5 мМ у розчині метанолу та наступного відпалювання при 350 °C протягом 1 год. Потім субстрати скельця з нанесеними наночастинами ZnO інкубували протягом 4 год у 50 мМ нітрату цинку та 50 мМ розчин, що містить гексаметилентетрамін у воді при 95 °C. В кінці зразки промивали деіонізованою водою та сушили при кімнатній температурі.

На наступному етапі підготовлені скельця з ZnO занурювали в трис-буфер (10 мМ, рН 8,5, 50 мл), що містить концентрацію дофаміну 0,5 мг/мл при кімнатній температура протягом 1 год. Після цього зразки виймали і промивали деіонізованою водою (Milli-Q), а потім сушили при кімнатній температурі.

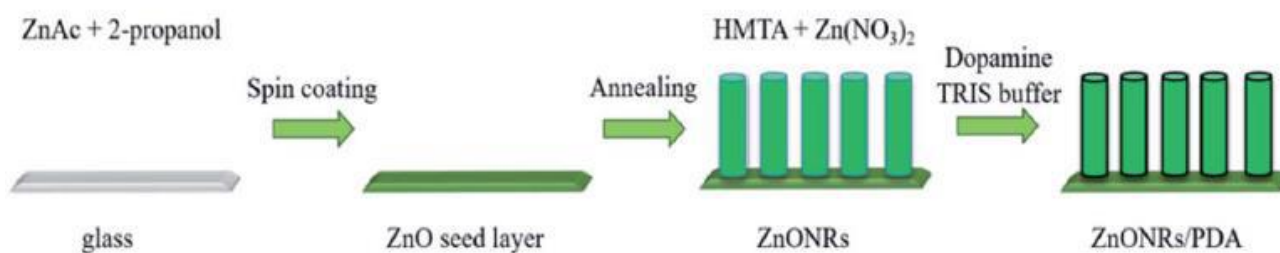


Рисунок 2.1 – Схематичне зображення синтезу ZnO/PDA із застосуванням гідротермального методу

### 2.2.2 Аналіз структурної та поверхневої характеристики ZnONRs

Для структурної та поверхневої характеристики ZnONRs–PDA модифікованої поверхні використовували XRD (дифрактометр PANalytical Xpert-PRO



оснащений детектором Pixel 3D з використанням Cu Ka, фільтрованого Ni випромінювання 45 кВ/40 мА), SEM (Zeiss Evo HD15 SEM від Zeiss Ltd (Єна, Німеччина)), HR-TEM (JEOL ARM 200F) з високою роздільною здатністю просвічуючий електронний мікроскоп (200 кВ) з детектором EDX і EELS, вимірюванням раманівського розсіювання, виконано за допомогою мікро-Раман-спектрометра Renishaw, оснащеного конфокальним мікроскопом (Leica) та FTIR-спектроскопією, за допомогою спектрофотометра FTIR-ATR «Frontier» від Перкін Елмер (Уолтем, США). Досліджено оптичні властивості за допомогою спектроскопії дифузного відбивання з використанням волоконного спектрометра HR2000+ від Ocean Optics (Данідін, США). Низькотемпературні властивості PL досліджували за допомогою саморобної установки (рис.2.2). Зразок збирали за допомогою мідного тримача вакуумна камера з кварцовим вікном. Рідкий азот вводився у порожнину мідного тримача. Тримач був оснащений термопарою типу К, контактував з поверхнею зразок. Виконано автоматичний контроль температури з точністю 1 К. Вимірювання проводили з крок 5 К. ФЛ збуджували Nd:YAG-лазером (266 нм, вихідна потужність 29 мВт) і зібрано спектрометром Horiba iHR320. Вимірювання проводили в діапазоні 77–300 тис.

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1 Поширеність та біологічні властивості *K. pneumoniae*, виділеної від пацієнтів та з інших джерел

Досліджено 300 зразків, отриманих від пацієнтів з патологією гортані, та виділено 41 штамп *K.pneumonia* (13,7%). Мікроорганізми були виділено переважно в мікробних асоціаціях ( 97,5% випадків) з з грампозитивними (*Staphylococcus spp.*, *S.pyogenes*), грамнегативними (*Enterobacterium spp.*, *P.aeruginosa*) бактеріями та *C.albicans*. Наші дані щодо поширеності збудника в популяції подібні до результатів, наведених у інших роботах [41].

Згідно з профілями стійкості до антибіотиків (рис. 3.1), усі досліджувані штами *K.pneumonia* були чутливими до левофлоксацину та іміпенему. Найбільша кількість штамів *K.pneumonia* була стійкою до азитроміцину (9,1%). Аналіз антибіотикорезистентного профілю показав, що 73,2% ізолятів були стійкими до п'яти і більше антибіотиків, а майже чверть штамів – до карбапенему (іміпенему).

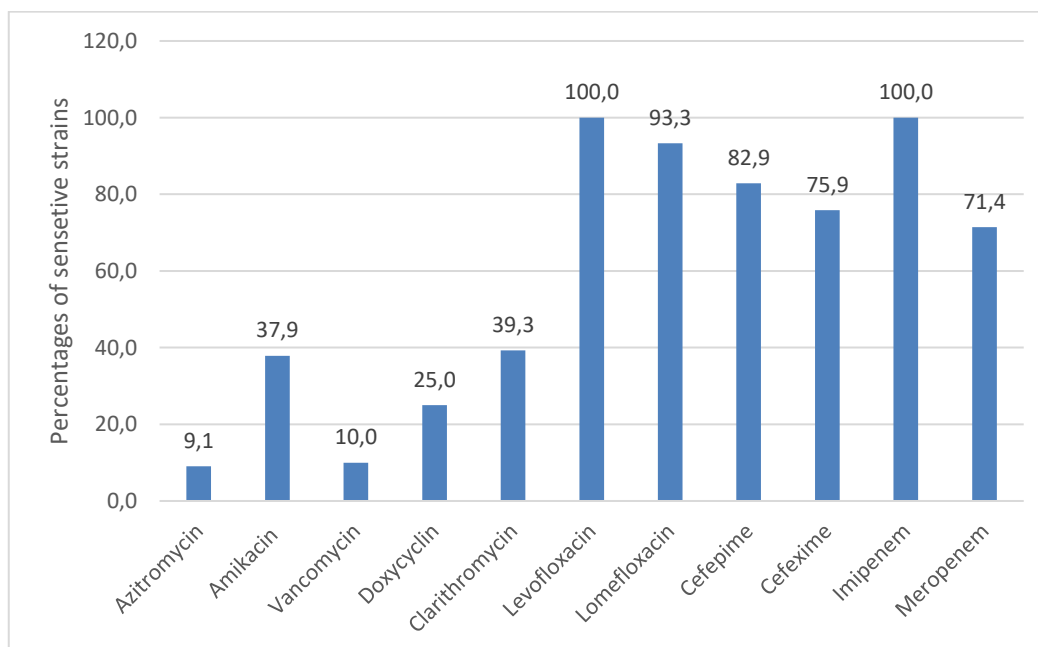


Рисунок 3.1 – Профіль антибіотикорезистентності *K.pneumoniae*

Три чверті ізолятів були мультирезистентними. Гера Нірваті та інші [42] виділяли дещо більшу кількість *K.pneumoniae* (17,36%), але був нижчий рівень стійкості до антибіотиків (54,49%).

Оцінка антимікробної активності НЧ Ag щодо досліджуваних штамів показала, що МІК варіювався від 1,25 мкг/мл до 2,5 мкг/мл. Підвищення концентрації НЧ Ag в 2 рази викликало повне знищення мікробів. Динаміка відмирання *K.pneumoniae* при концентрації Ag в 1 МІК демонструє поступове зниження кількості життєздатних клітин протягом експериментального часу. Кількість бактеріальних клітин досягає 0 log<sub>10</sub> КУО/мл до 3 год інкубації (рис. 3.2).

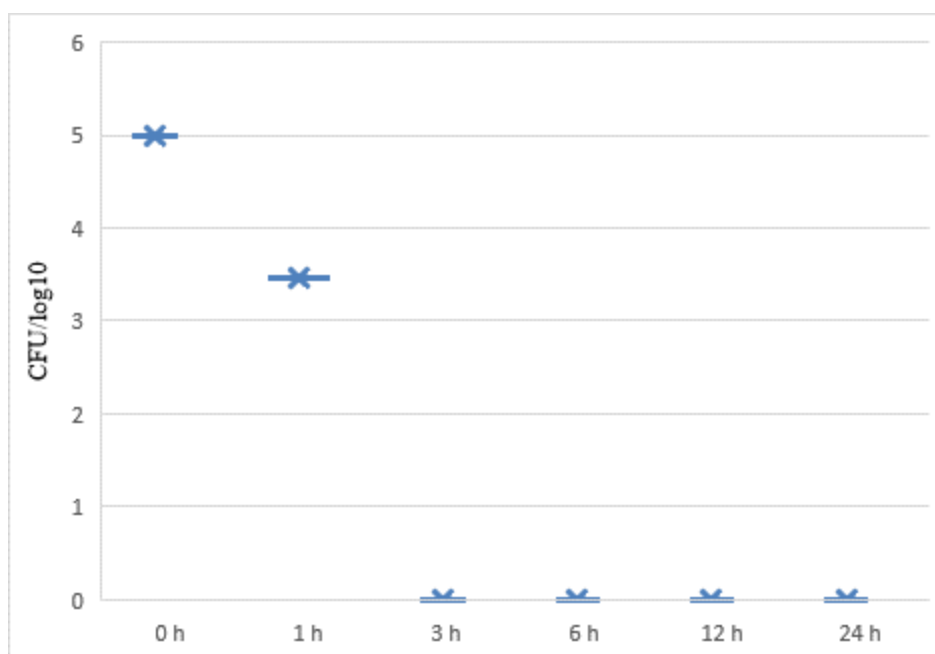


Рисунок 3.2 – Час залежна антибактеріальна активність наночастинок срібла проти *K. pneumoniae*

Дослідження антибіоплівкового ефекту НЧ Ag показало їх незначну інгібуючу дію на утворення біоплівки на початкових етапах. Ми також виявили руйнування зрілої (2 дні) біоплівки при обробці НЧ Ag у концентраціях 20-40 мкг/мл. НЧ Ag, використані в нашому експерименті, продемонстрували вищу ефективність, ніж усі повідомили G. Rajivgandhiat [43], який описує

антибіоплівковий ефект наночастинок срібла проти *K.pneumoniae* при концентрації 50-100 мкг/мл.

Оцінка здатності НЧ Ag пригнічувати адгезію та утворення біоплівки при концентраціях *K.pneumoniae* 0,5 та 1,0 МІК на початковому етапі показала незначне зменшення маси біоплівки та кількості живих клітин порівняно з необробленими бактеріями (рис. 3.3).

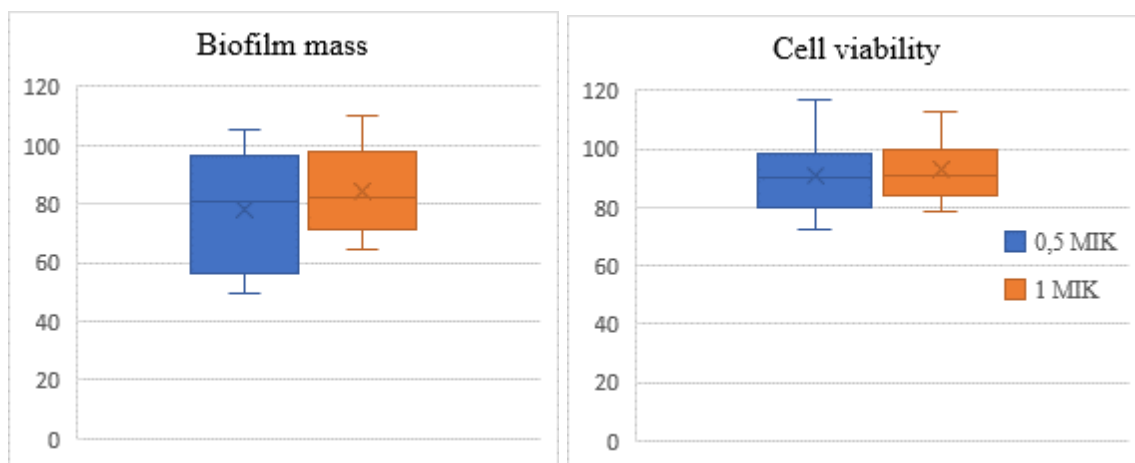


Рисунок 3.3 – Відсоток редукції *K.pneumoniae* біоплівкової маси та живих клітин після обробки НЧ Ag в концентрації 0.5 та 1.0 МІК на початковій стадії

Ефективність обробки НЧ Ag зрілої біоплівки *K.pneumoniae* залежала від віку біоплівки (рис.3.4). Встановлено зменшення маси 2-х денної біоплівки в середньому на 60 % при концентрації 20-40 мкг/мл. Проте не було ніяких відмінностей у масі біоплівки *K.pneumoniae* та життєздатності клітин на п'ятиденній біоплівці.

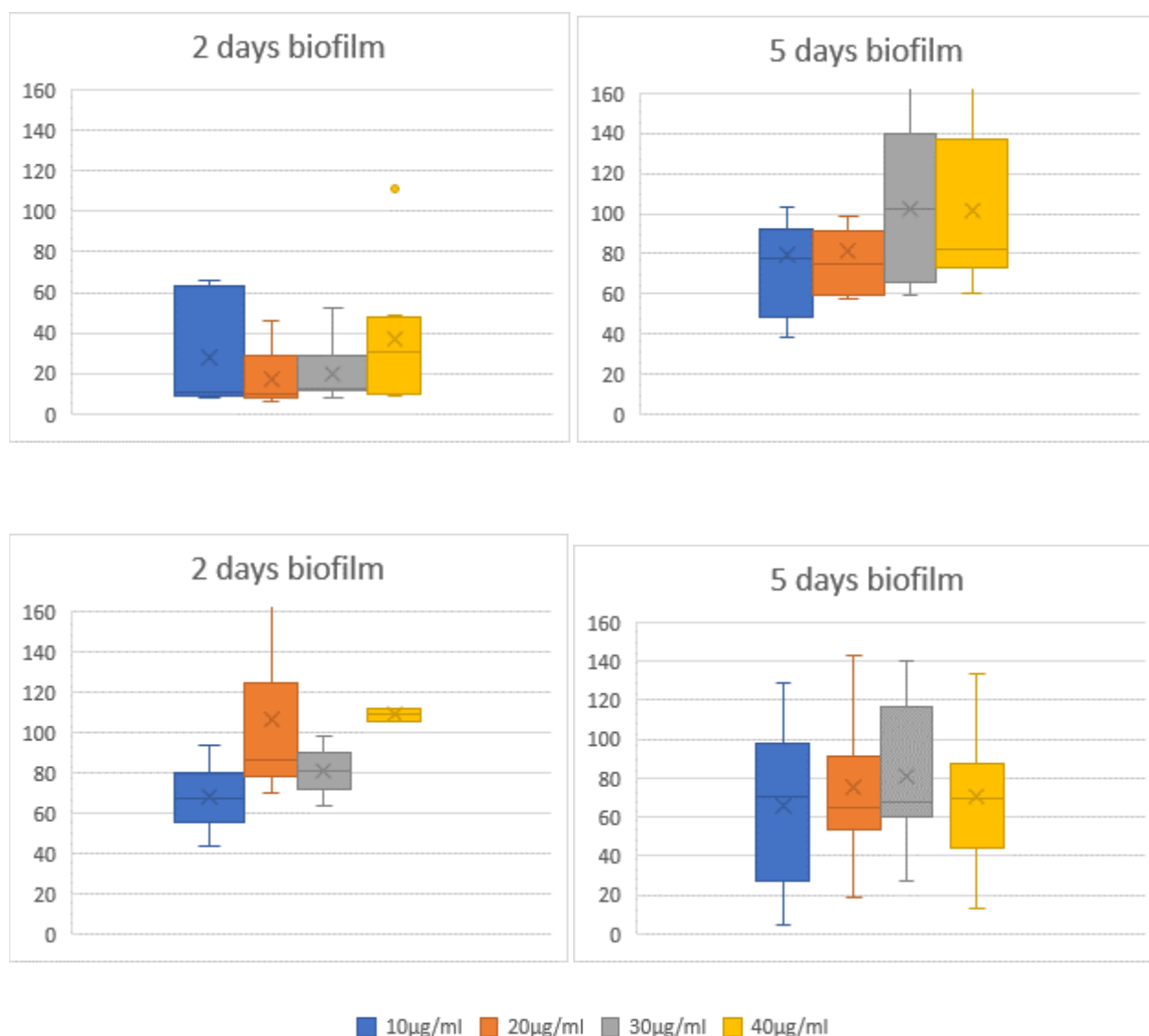


Рисунок 3.4 – Відсоток редукції *K.pneumoniae* біоплівкової маси та живих клітин після обробки зрілої (2-х та 5-ти денної) біоплівки

Відомо, що НЧ Ag взаємодіють з мікробною поверхнею і можуть призвести до порушення клітинної мембрани. Мікрофотографії СЕМ (рис. 3.5) початкової стадії формування біоплівки в контрольній групі показують, що бактерії щільно прилягають один до одного. Спостереження бактеріальних кластерів на біоплівці другого та п'ятого днів показало, що бактерії пов'язані один з одним фібрилярною мережею, що складається з великої кількості довгих, гнучких ворсинок, які тягнулися на кілька мікрон від бактерій.

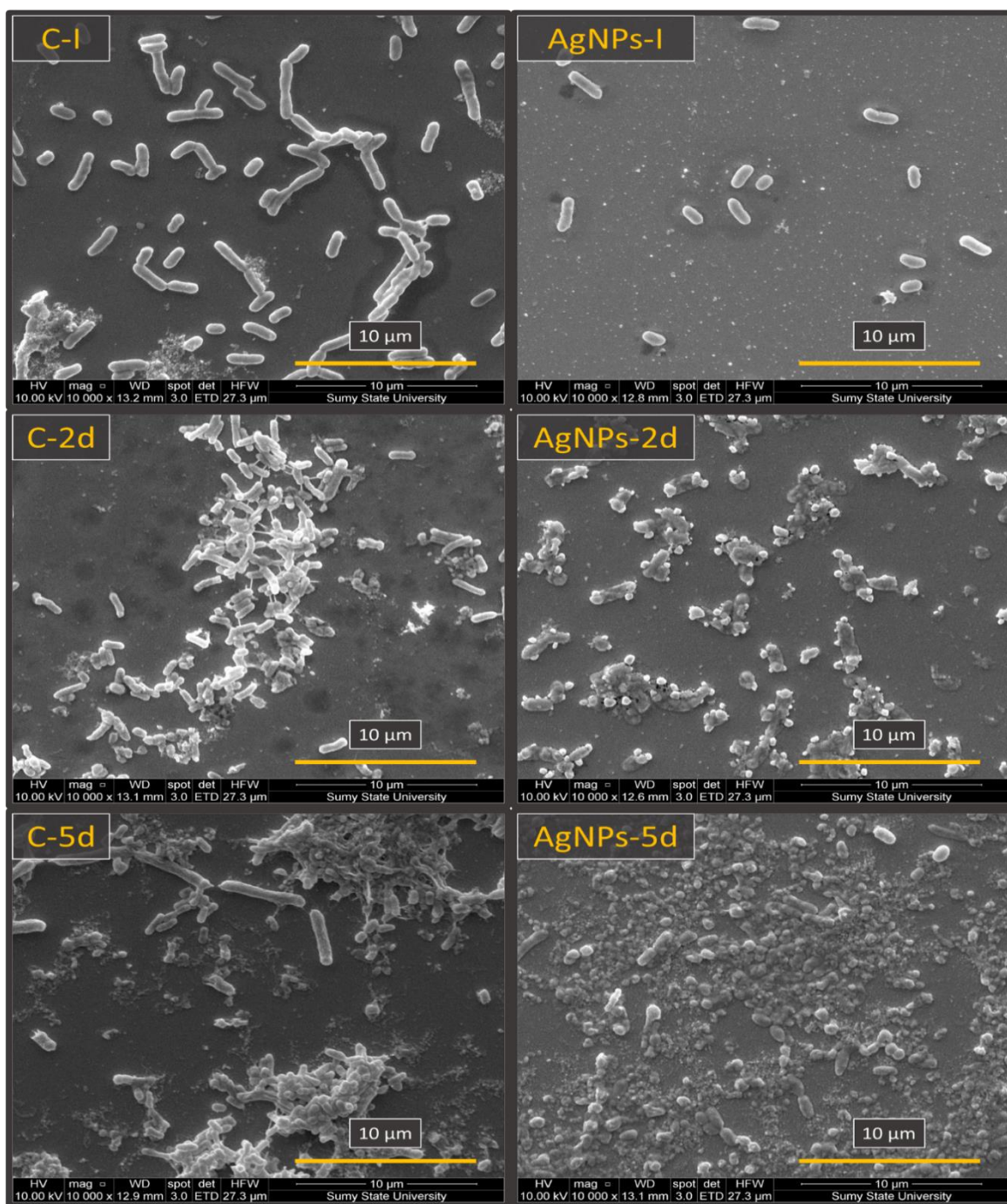


Рисунок 3.5 – Скануюча електронна мікроскопія біоплівки *K. pneumoniae* biofilms сформованих на склі упродовж різних інтервалів поекреднього культивування без та після обробки наночастинками срібла (К – без обробки сріблом, AgNPs – після обробки сріблом 20 µg/ml)

Отримана мікрофотографія свідчить про значне зменшення біоплівки на початковій стадії прикріплення. У разі первинного спільного культивування НЧ

Ag і *K.pneumoniae* ми виявили лише окремі бактеріальні клітини, прикріплені до поверхні. Ці дані показують, що НЧ Ag знижують здатність утворювати біоплівку. Це може бути викликано пригніченням розмноження бактерій або адгезією бактерій.

На зображеннях дводенної біоплівки виявлено лізис бактеріальних клітин після спільного культивування з НЧ Ag. У присутності НЧ Ag порушувалася цілісність мембрани *K.pneumoniae*. СЕМ-аналіз виявив збереження тривимірної структури у випадку п'ятиденної біоплівки після спільного культивування з НЧ Ag.

### 3.2 Морфологічна характеристика, оптичні та електронні властивості наноструктур ZnO

SEM та TEM зображення наностержнів ZnO-PDA, нанесених на поверхню скла представлені на рисунку 3.6. Середні розміри наностержнів становили 60 нм в діаметрі і 800 нм в довжину (рис. 3.6 А); це спостереження відповідає раніше повідомленим даним [37].

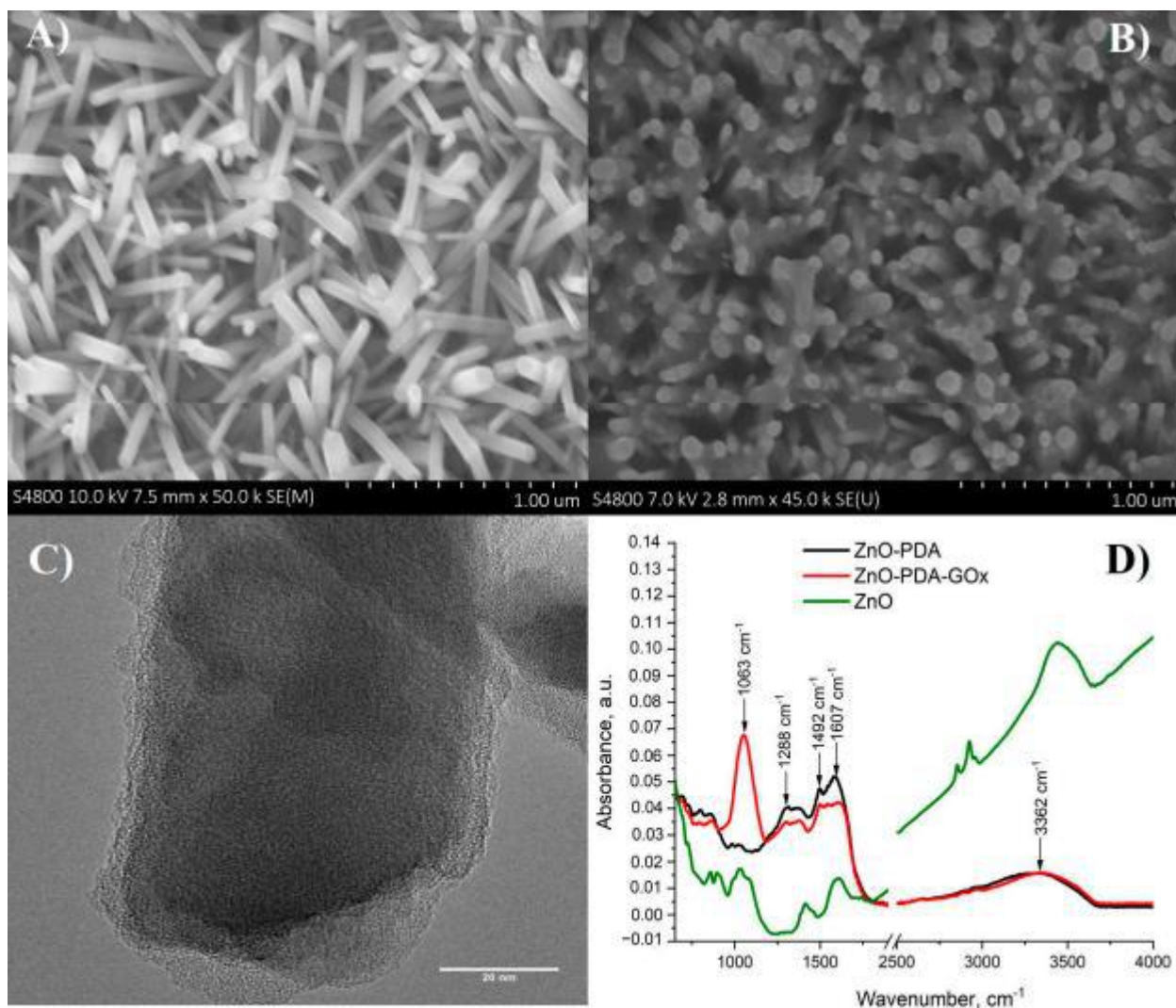


Рисунок 3.6 – А) SEM зображення ZnO-NRs; (B) SEM зображення ZnO-PDA нанокompозиту; (C) TEM зображення ZnO-PDA нанокompозиту, (D) FTIR спектри ZnO та ZnO-PDA нанокompозиту



Як видно на зображенні PDA утворив шар над наностержнями ZnO та поміж ними (сірі візерунки на рисунку 3.6 B). Вимірювання TEM (рисунку 3.6 C) ілюструють утворення шару PDA товщиною 7 нм над ZnO.

Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є (FTIR) була використана для характеристики іммобілізації глюкозооксидази на поверхні ZnO-PDA (рис 3.6 D). Встановлено, що ZnO-PDA нанокмпозитні структури характеризувались піками, розташованими на  $1288\text{ cm}^{-1}$ ,  $1492\text{ cm}^{-1}$ ,  $1607\text{ cm}^{-1}$ , і  $3362\text{ cm}^{-1}$ , що відповідало C–O, C=N або/і C=C, C=O та –OH або/і моди коливань N–H відповідно (рис. 3.6 D). Ці режими узгоджуються з попередніми даними для PDA, які спостерігали Hongyong Luo et al. [44]. У згаданому дослідженні, спектри FTIR були обрані для дослідження взаємодій зв'язування між полідопаміною сферою (PDS) і наночастинок срібла (AgNPs). Характерні піки PDS ( $1292\text{ cm}^{-1}$ ,  $1512\text{ cm}^{-1}$ ,  $1627\text{ cm}^{-1}$ , і  $3379\text{ cm}^{-1}$ ) корелювали з піками, які спостерігалися для ZnO/PDA в нашому дослідженні. Різниця положень піків ( $4\text{--}20\text{ cm}^{-1}$ ), що спостерігається у зазначеному дослідженні та нашому, може бути пов'язаною з різними протоколами синтезу полідопаміну.

Структурні властивості отриманих матеріалів охарактеризовано за допомогою дифракції рентгенівських променів (рис. 3.7).

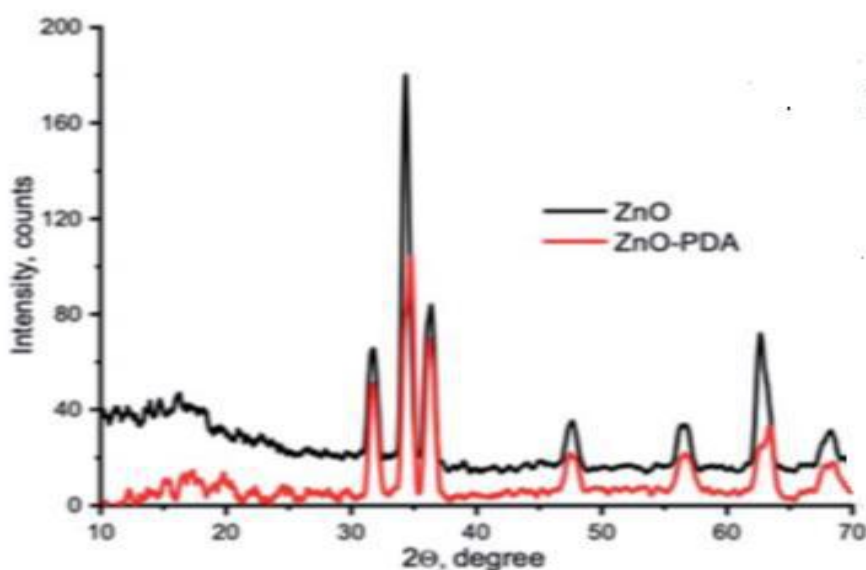


Рисунок 3.7 –XRD синтезованих ZnO та ZnO PDA

На представленому малюнку піки дифрактограми розташовані на 31,7 , 34,3 , 36,5 , 47,6 , 56,5 , 62,5 і 68,3 були віднесені до ZnO вюрциту фаза.56 У XRD-спектрах ZnONRs/PDA немає значних змін кристалічності, та можна виявити після PDA покриття, що підтверджує придатність PDA для ефективного покриття наноповерхні.

ZnO/PDA містить активні хінонові групи, які можуть реагувати з аміногрупами GOx Реакція додавання Майкла та/або основи Шиффа, а потім призвела до іммобілізації GOx на поверхні ZnO/PDA. Після іммобілізації глюкозооксидази (рис. 3.6 D). Зареєстрований новий пік відповідає коливальному режиму вигину C–O [45]. Очевидно, що іммобілізація глюкозооксидази призвела до зменшення пікової інтенсивності при 1607  $\text{cm}^{-1}$ . Важливо відзначити, що іммобілізація глюкозооксидази на поверхні ZnO-PDA призводить до зміщення позиції піків FTIR (1492  $\text{cm}^{-1}$ , 1607  $\text{cm}^{-1}$ , і 3362  $\text{cm}^{-1}$ ) 12–20  $\text{cm}^{-1}$  до вищих значень хвильових чисел. Зсув піку можна було спостерігати внаслідок реакції між активними хіноновими групами ZnO/PDA та аміногрупи GOx. Таким чином, зміщення піку може виявитися успішним.

Морфологія та цілісність покриття PDA на ZnONR було досліджено TEM (рис. 3.8 а і б). Ці аналізи виявили, що ZnONR були рівномірно покриті шаром PDA із середньою товщиною менше 5 нм. Аналіз спектроскопії втрат енергії (EELS) на ZnONR, доведено наявність азоту, вуглецю та кисню, про що свідчить утворення PDA в ZnONRs/PDA нанокомпозиті і підтвердили однорідне покриття ZnONR. Крім того, оскільки немає видимих структурних змін або деградації ZnONR були дотримані, умови зберігання PDA більше не потребували оптимізації.

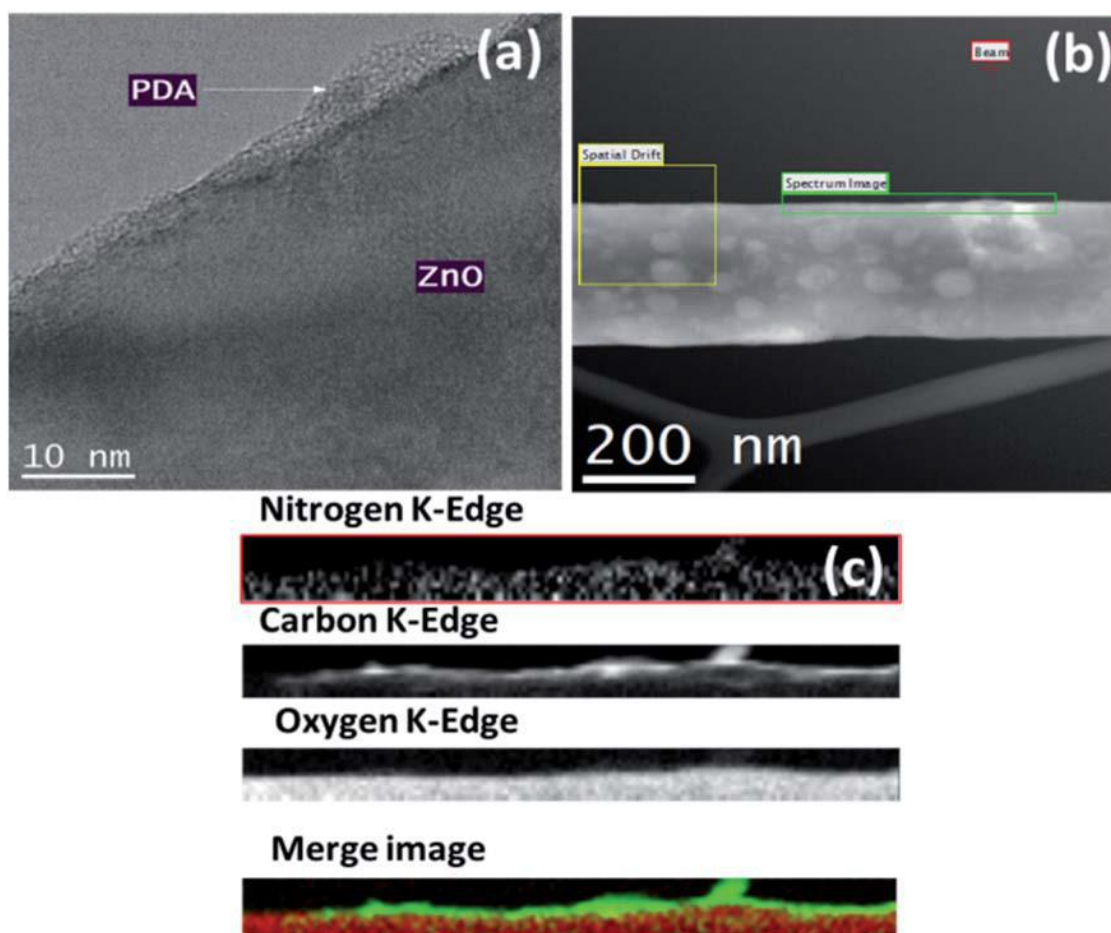


Рисунок 3.8 – TEM зображення ZnONRs/PDA (a) та (b); втрата енергії електронів

З метою визначення складу наноконструкцій, також застосовувалася спектроскопія раманівського сполучення. Раман спектри ZnONRs, PDA та ZnONRs–PDA наведені на рис. 3.9. Підготовлені ZnONR показали піки при 333, 376 і 435  $\text{cm}^{-1}$ , пов'язані з E<sub>2</sub> – режим полярного оптичного фонона A<sub>1</sub>(TO), і E<sub>2</sub> (висока) неполярна мода відповідно. Спостережуваний пік на 435  $\text{cm}^{-1}$  (висока 2 режим) відповідає фазі вюрциту ZnO, як це також було підтверджено рентгенограмою. Цей режим пов'язаний з вібрацією атомів кисню в кристалічній решітці. Раман пік на рівні 586  $\text{cm}^{-1}$  може бути пов'язаний зі структурними порушеннями (наприклад як вакансії кисню, проміжний вузол Zn тощо). Спектр PDA показує два характерних піка: 1357 і 1576  $\text{cm}^{-1}$ , відповідні ароматичним кільцям PDA (розтягування і деформація). Наноструктури ZnONRs–PDA показали піки при 466, 587, 954, 1214, 1386, 1596  $\text{cm}^{-1}$ . Пік рамана припадає на 1386 і 1596

см<sup>-1</sup> відповідають PDA і виникають з ароматичних C–N режиму розтягування індолової структури, а від C вібрація ароматичного кільця, відповідно. Таким чином, результати підтверджують успішне осадження PDA на поверхню ZnONR.

Широкі піки на 466 см<sup>-1</sup> і 1596 см<sup>-1</sup> були розкручені у двох компонентах за допомогою лоренційського тінгу. Отримані піки показав наступні значення: 457 см<sup>-1</sup>, 482 см<sup>-1</sup>, 1525 см<sup>-1</sup> і 1596 см<sup>-1</sup>. Наявні піки – 1206 см<sup>-1</sup>, 1528 см<sup>-1</sup> і 1595 см<sup>-1</sup>, і 1386 см<sup>-1</sup> з PDA раманівськими модами, які стосуються C–OH або/і коливання C–O, C]C, C–N, N–H та C]O відповідно. Нарешті, пік при 457 см<sup>-1</sup> відноситься до ZnO, тоді як піки при 482 см<sup>-1</sup> і 954 см<sup>-1</sup> відповідають Zn–OH і O–H режим деформації поза площиною. Аналіз показав хорошу відповідність даних триманих при Раман спектроскопії з результатами, отриманими при проведенні інших досліджень.

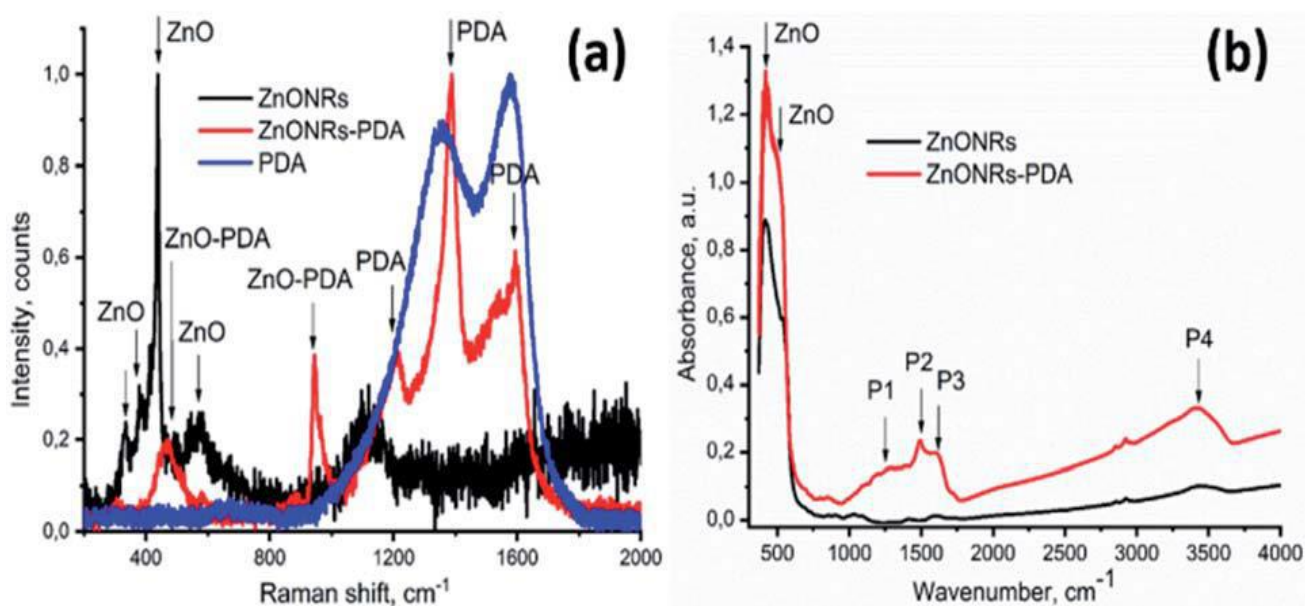


Рисунок 3.9 – Раман спектроскопія ZnONRs/PDA

Оптичні властивості нанокompatитів ZnO/PDA залишаються недостатньо вивченими. Через конформне покриття PDA поверх ZnONR, очікувались зміни екситонного та дефектного випромінювання фотолюмінесценції ZnONR. Нами було допущено, що взаємодія ZnO–PDA може включати дефекти ZnO. Концентрація дефектів та їх тип впливають на оптичні та електронні властивості

ZnO, тому порівняння дефектних та екситонних параметрів в ZnONR і композитів ZnONR–PDA може допомогти з'ясувати механізми утворення композитів. Таким чином, аналіз властивостей фотолюмінісценції ZnONR і ZnONRs/PDA, є необхідним для повного розуміння цих механізмів. Дослідження фотолюмінісценції є простим методом для характеристики поверхневих дефектів. Крім того, випромінювання та збудження потужність дозволяє оцінити концентрацію дефектів і квантову ефективність. Спектри фотолюмінісценції при кімнатній температурі ZnONRs–PDA показали зниження інтенсивності та піковий зсув ZnO після осадження шару PDA (рис. 3.10 а).

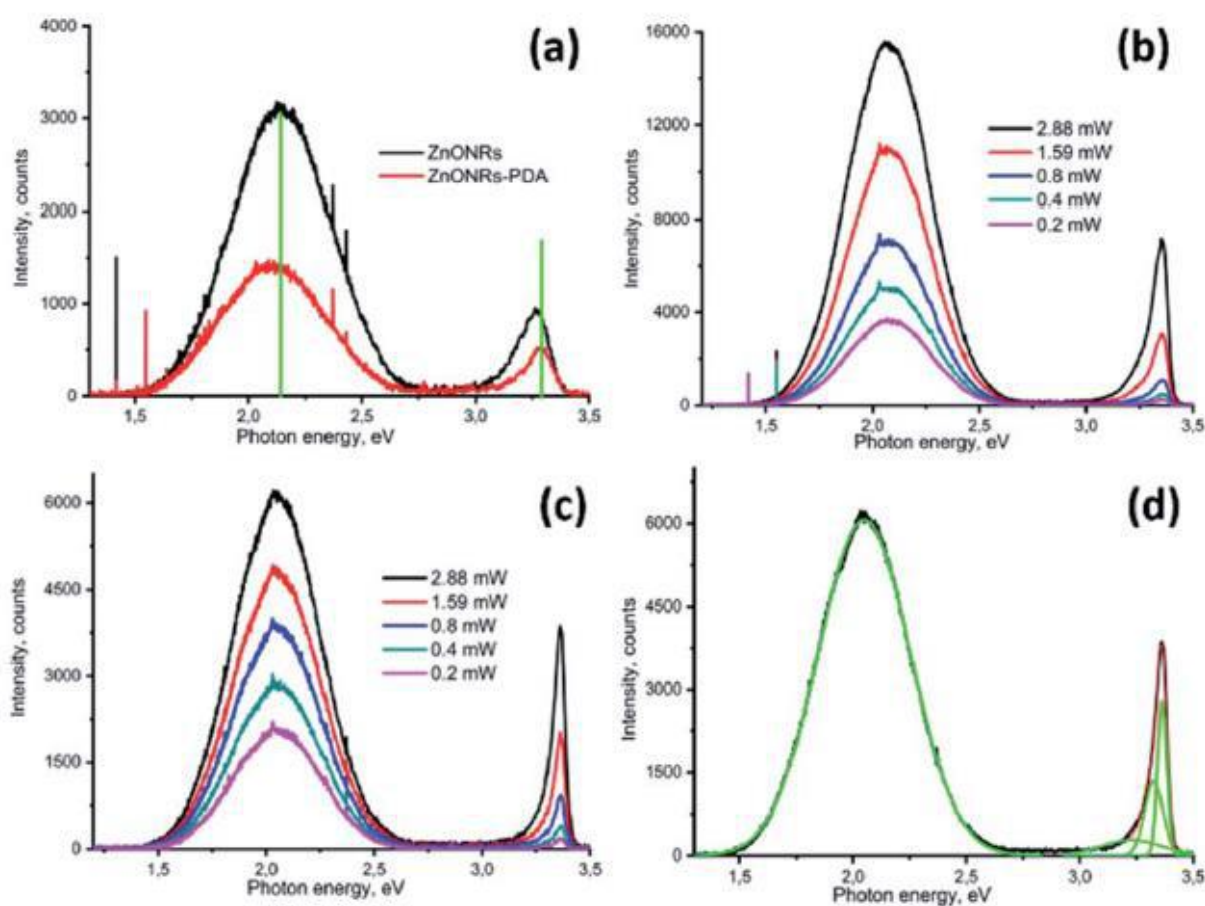


Рисунок 3.10 – Фотолюмінісцентні спектри ZnONRs та ZnONRs–PDA при кімнатній температурі (а); ZnONRs (b) ZnONRs–PDA (c) при 77 К, сила залежна; деконволюція фотолюмінісцентних спектрів ZnONRs–PDA (d).

Припускаємо два можливі механізми зміни спектру фотолюмінісценції ZnONR–PDA:

- оптичне поглинання шаром PDA
- зміна випромінювання параметри ZnO фотолюмінісценції (зниження концентрації центрів викиду, збільшення виснажливого шару тощо).

Показано кореляцію між часом осадження та товщина шару PDA – за 24 години формувався шар PDA товщиною 70–100 нм. На основі розрахунку товщини шару PDA та оптичного поглинання можна припустити про 6–7% поглинання світла шаром PDA в ZnO NR–PDA наноструктурі. Це оптичне поглинання не пояснює різкого зменшення випромінювання фотолюмінісценції ZnONR–PDA та пікового зсуву. Тому зниження інтенсивності фотолюмінісценції після осадження PDA може пояснюватись зменшенням концентрації дефектів і зміною виснажуючого шару на межі розділу ZnO–PDA. Щоб аналізувати ці механізми, було проаналізовано низькотемпературні вимірювання фотолюмінісценції ZnONR та ZnONR–PDA.

Вплив потужності лазера збудження на випромінювання фотолюмінісценції наноструктури ZnONRs та ZnONRs–PDA при 77 К відображено на рис 3.10 б і в. Різної потужності збудження лазера досягалися використанням нейтральних фільтрів. Зниження збудження потужність призводила до зменшення інтенсивності фотолюмінісценції (рис. 3.10 б і в). Ультрафіолетова інтенсивність випромінювання зменшилася більш різко, порівняно з видимим випромінюванням. Це вказує на різний характер емісії. Раніше ми проводили аналіз спектрів фотолюмінісценції ZnO і розрахунки параметрів випромінювання (квантова ефективність і концентрація дефектів). Через складну поведінку ZnO емісійна деконволюція спектрів випромінювання на окремі потрібне піки випромінювання за допомогою функції Гаусса показала деконволюція спектру фотолюмінісценції ZnO–PDA. Піки, розташовані на 2,05, 3,27, 3,348, 3,368 еВ. Вершини, розташовані при 3,27–3,368 еВ і 2,05 еВ пов'язані з екситоном і дефектом випромінювання відповідно. Встановлено, що потужність збудження залежність інтегральної інтенсивності при 77 К виявилася сублінійною залежність для піків у видимому діапазоні та суперлайнера залежність для УФ-піків (див.

таблицю S1, ESI†). Це відомо що дефекти в ZnO є джерелом носіїв заряду, заряду пастки та емісійні центри фотолюмінісценції. Для спрощення розрахунків припустимо, що викидання тільки одне, а центр представлений у забороненій зоні ZnO та відсутність електронних і діркових пасток (рис. 3.11 а).

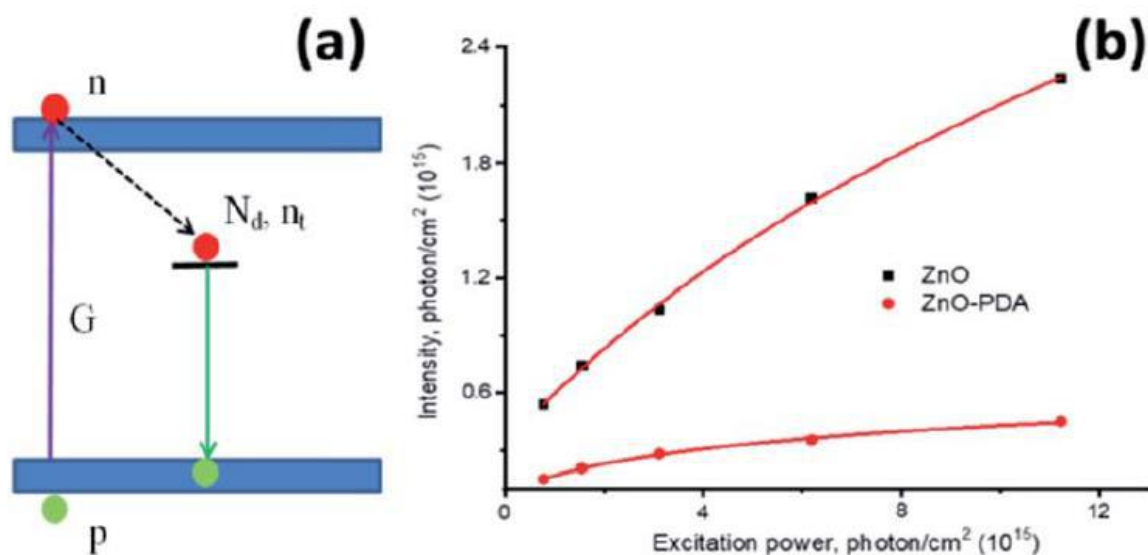


Рисунок 3.11 – Діаграма можливого випромінювального та невивромінювального переносу електронів (а). Сила-залежна інтегрована інтенсивність ZnO та ZnOPDA (b)

Силіві залежності інтегральних інтенсивностей для ZnONR та ZnONRs–PDA, перенесені в фотон на см<sup>2</sup>, показані в рис. 3.11 б. Побудова кривих дала наступні значення для концентрація дефектів і квантова ефективність:  $1,5 \cdot 10^{15}$  см<sup>3</sup> і 0,28 і  $1,2 \cdot 10^{14}$  см<sup>3</sup> і 0,12 для ZnONR і ZnONRs–PDA відповідно. Низькотемпературна фотолюмінісценції надає цінну інформацію про гасіння емісійного механізму системи. Температурна залежність фотолюмінісценції для ZnONRs та ZnONRs–PDA в інтервалі температур 77–300 К представлені на рис. 3.12 а і б. Два ефекти спостерігалися в ZnONR і ZnONR-PDA наноструктури: температурне гасіння ФЛ і зсув вершини. Підвищення температури призводило до червоного блиску піку ФЛ в УФ-області та синього відблиску видимого випромінювання.

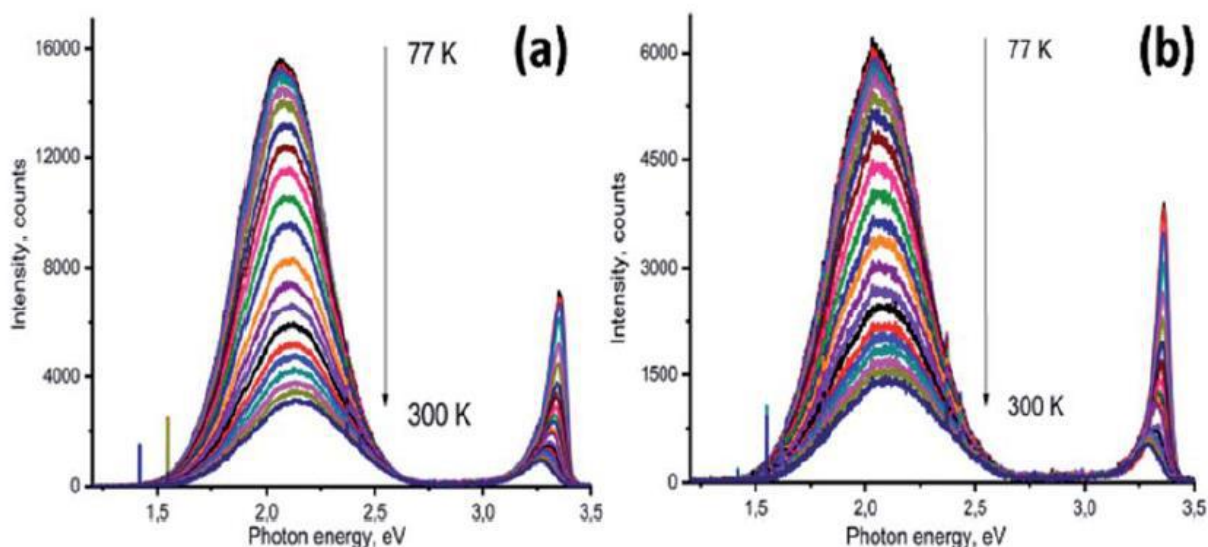


Рисунок 3.12 – Температурна залежність фотолюмінісценції ZnO та ZnO/PDA.

Зміна положення піку УФ пов'язана з температурною залежністю ширини забороненої зони та переходів ZnO між зв'язаними і вільними екситонами. Підвищення температури збільшує коливання решітки [46]. Фотонний зв'язок призводить до збільшення випромінюваного фотона енергії. Забезпечує температурне гасіння

Отримані залежності  $I(T)$  були зображені як  $1/I$  проти  $1/T$  і відображені за експоненцією функція (рис. 8а і б) для обчислення енергій активації. Розраховані значення наведені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Оцінка ZnO та ZnO/PDA активаційної енергії

	2.14–2.09 eV	3.28–3.27 eV	3.34–3.33 eV	3.367 eV
ZnO	0.074	0.018	0.024	0.053
ZnO-PDA	0.064	0.01	0.013	0.044

Активация енергії, отримані для УФ-піків, відповідають вільним екситонам (0,056 eV) і дефектно-зв'язаних екситонів (0,024 і 0,018 eV) в ZnO. Добре видно, що



формування шару PDA над ZnONR призвели до зниження енергії активації, що могло бути обумовлено утворенням додаткового локального електричного поля між ZnO та шаром PDA.

Запропоновано наступну модель формування інтерфейсу ZnO/PDA. Модельна схема наноструктури ZnO/PDA представлена на рис. 3.13. На основі FTIR та раманівського аналізу ми припускаємо, що PDA приєднується до ZnO через –ОН групи в структурі PDA. На основі на фотолюмінісцентного аналізу, інтенсивність піків і дефекту концентрація зменшувалася після осадження PDA на ZnONR.

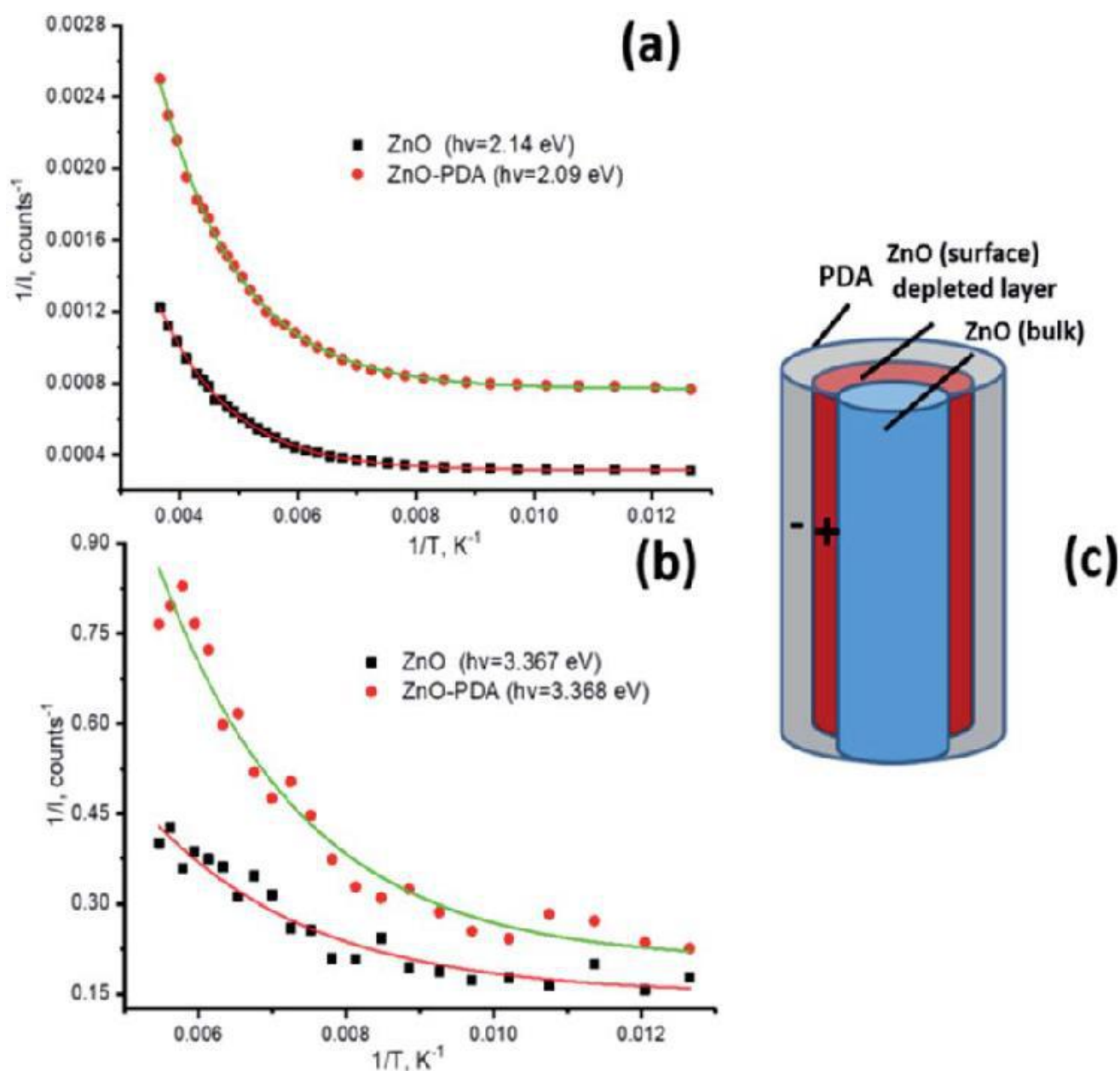


Рисунок 3.13 – Експоненціальні апроксимації для обрахунку активаційної енергії (а та б). Модель формування ZnO/PDA інтерфейсу (с).

Велика кількість точок прикріплення збільшує ймовірність формування інтерфейсу ZnO/PDA та передбачає, зокрема, дефекти ZnO, подвійно іонізовані кисневі вакансії/або кисневі проміжки. Це передбачає, що формування інтерфейсу ZnO/PDA зменшує концентрацію дефектів ZnO. Через нові стани поверхні, утворюється локальне електричне поле, що збільшує виснажливий шар ZnO. Формування додаткового локального поля призводить до зменшення енергій активації та піків фотолюмінісценції. Інтенсивність фотолюмінісценції модулюється величиною збідненого шару в ZnO. ZnO/PDA, розрахункова щільність емісійних центрів, які є пов'язаний з дефектами донора, становить приблизно  $0,87 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-3}$ . Розрахункове значення різниці довжини Дебая між ZnO та ZnO-PDA становить близько 1,2 нм. Збільшення довжини Дебая викликає розширення виснаженого шару всередину об'ємний розріз зразка і, як результат, загартування фотолюмінісценції і зміну положення піку.

Запропонований механізм гасіння фотолюмінісценції для наноструктури ZnONR-PDA можуть бути поширені на інші матеріали і композити, де збіднений шар модуляції представлено. Враховуючи, що виснажений шар може змінюватись під впливом різних зовнішніх факторів (наприклад, адсорбція молекули; зовнішнє покриття; утворення гетеропереходів; матеріал опромінення тощо), запропонований механізм також міг би пояснити принцип роботи (біо)сенсорів і детекторів.

Підсумовуючи, подальше застосування структур скла/ITO/ZnO-PDA, модифікованих антитілами можна буде використовувати для виявлення антигенів з використанням фотоелектрохімічних датчиків.

ZnO/PDA містить активні хінонові групи, які можуть реагувати з аміногрупами GOx. Реакція з додаванням реактиву Майкла та/або основи Шиффа, призвела до іммобілізації GOx на поверхні ZnO/PDA. Характеристику зразків до та після формування шару GOx проводили за допомогою циклічної вольтамперометрії (рис. 3.14 А,В). Було виявлено, що осадження GOx призвело до значного зменшення струму. Додавання глюкозного зонда призвело до посилення

струму через систему. Після іммобілізація глюкозооксидази з'являється новий пік, який відповідає коливальному режиму вигину C–O [47].

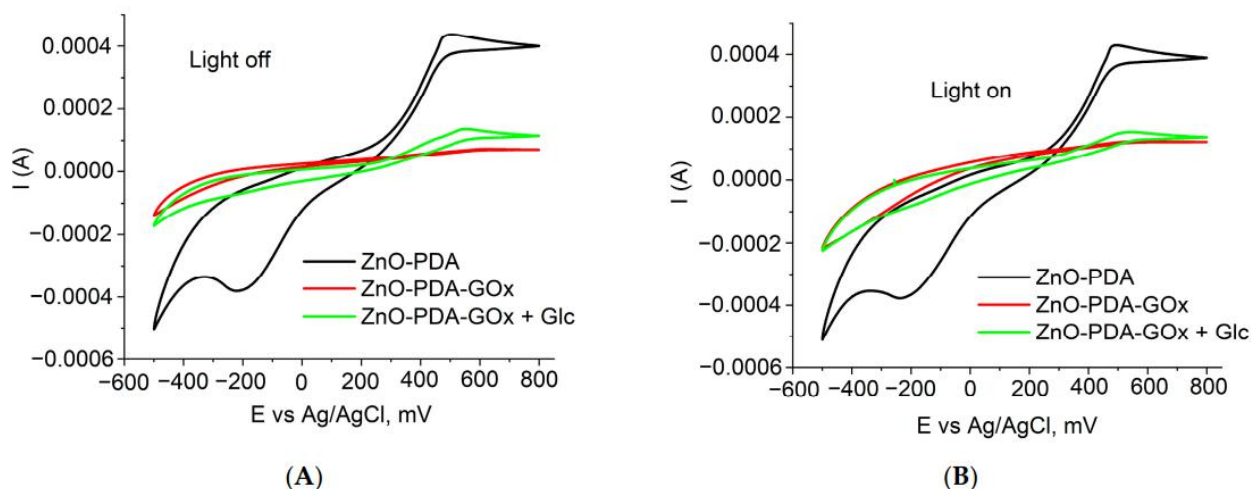


Рисунок 3.14 – Циклічні вольтамограми скляних/ZnO та скляних/ZnO-PDA/GOx електродів за відсутності глюкози та скло/ZnO-PDA/GOx у присутності 0,08 мМ глюкози: (А) вимірювання C–V в «темних» умовах; (В) C–V

Вимірювання в умовах УФ-збудження глюкозооксидази на поверхні ZnO-PDA призводить до зміщення позиції піків FTIR (1492 см<sup>-1</sup>, 1607 см<sup>-1</sup>, і 3362 см<sup>-1</sup>) 12–20 см<sup>-1</sup> до вищих значень хвильових чисел. Зсув піку можна було спостерігати внаслідок реакції між активними хіноновими групами ZnO/PDA та аміногрупи GOx. Таким чином, зміщення піку може виявитися успішним

## ВИСНОВКИ

1. *K.pneumonia* виділялась в 13,7% випадків від пацієнтів із отолярингологічною патологією, переважно в асоціаціях (95,7%) з іншими умовно-патогенними мікроорганізмами.
2. Встановлено високий рівень (73,2%) мультирезистентності серед виділених штамів *K. pneumonia* до основних груп антибіотиків. НЧ Ag мають потужний антибактеріальний та антибіоплівковий потенціал проти мультирезистентних *K. pneumoniae*.
3. Комбінування ZnO з полідопаміном призводить до зменшення концентрації дефектів, що беруть участь у фотолюмінісценції, та підвищення квантової ефективності. Структурні та оптичні властивості сформованого ZnO/PDA нанокompозиту продемонстрували можливість створення конформного PDA покриття поверх наностержнів ZnO.
4. В композиті ZnO/PDA приєднаний полідопаміну до ZnO відбувається через –ОН групи в структурі PDA, а зменшення енергії активації та  $sh_i$  піків фотолюмінісценції відбувається через формування додаткового електричного локального поля між PDA і ZnO.

**ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ**

1. Serotype and virulence genes of *Klebsiella pneumoniae* isolated from mink and its pathogenesis in mice and mink [Electronic resource] / Wang Jian-li [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, no. 1. – Mode of access: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17681-8>
2. Gastrointestinal carriage of *Klebsiella pneumoniae* in a general adult population: a cross-sectional study of risk factors and bacterial genomic diversity [Electronic resource] / Niclas Raffelsberger [et al.] // Gut Microbes. – 2021. – Vol. 13, no. 1. – P. 1939599. – Mode of access: <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1939599>
3. Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality [Electronic resource] / M. Vading [et al.] // PLOS ONE. – 2018. – Vol. 13, no. 4. – P. e0195258. – Mode of access: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195258>
4. Antibiotic Resistance: Moving From Individual Health Norms to Social Norms in One Health and Global Health [Electronic resource] / Sara Hernando-Amado [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2020. – Vol. 11. – Mode of access: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01914>
5. Surveillance, control and management of infections in intensive care units in Southern Europe, Turkey and Iran – A prospective multicenter point prevalence study [Electronic resource] / Hakan Erdem [et al.] // Journal of Infection. – 2014. – Vol. 68, no. 2. – P. 131–140. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.11.001>
6. Mortality Associated with Bacteremia Due to Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with High-Level Meropenem Resistance: Importance of Combination Therapy without Colistin and Carbapenems [Electronic resource] / Isabel Machuca [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2017. – Vol. 61, no. 8. – Mode of access: <https://doi.org/10.1128/aac.00406-17>
7. Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* in obtained samples from Ziaee Hospital of Ardakan , Yazd , Iran during 2016 to 2017. [Electronic resource] / Jamshid Ayatollahi [et al.] // Iberoamerican journal of Medicine.-

2020. – Mode of access: <http://doi.org/10.5281/zenodo.3698180>
8. Serotyping of *Klebsiella pneumoniae* and Its Relation with Capsule-Associated Virulence Genes, Antimicrobial Resistance Pattern, and Clinical Infections: A Descriptive Study in Medical Practice [Electronic resource] / Alka Hasani [et al.] // *Infection and Drug Resistance*. – 2020. – Volume 13. – P. 1971–1980. – Mode of access: <https://doi.org/10.2147/idr.s243984>
  9. Characteristics of Bacteremia Between Community-Acquired and Nosocomial *Klebsiella pneumoniae* Infection [Electronic resource] / Ren-Wen Tsay [et al.] // *Archives of Internal Medicine*. – 2002. – Vol. 162, no. 9. – P. 1021. – Mode of access: <https://doi.org/10.1001/archinte.162.9.1021>
  10. Clinical and microbiological characteristics of nosocomial, healthcare-associated, and community-acquired *Klebsiella pneumoniae* infections in Guangzhou, China [Electronic resource] / Tingting Le [et al.] // *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. – 2021. – Vol. 10, no. 1. – Mode of access: <https://doi.org/10.1186/s13756-021-00910-1>
  11. Effect of Silver Nanoparticles on Biofilm Formation and EPS Production of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* [Electronic resource] / Muhammad Hussnain Siddique [et al.] // *BioMed Research International*. – 2020. – Vol. 2020. – P. 1–9. – Mode of access: <https://doi.org/10.1155/2020/639816>
  12. Derakhshan S. Association Between Presence of Virulence Genes and Antibiotic Resistance in Clinical *Klebsiella Pneumoniae* Isolates [Electronic resource] / Safoura Derakhshan, Shahin Najjar Peerayeh, Bita Bakhshi // *Laboratory Medicine*. – 2016. – Vol. 47, no. 4. – P. 306–311. – Mode of access: <https://doi.org/10.1093/labmed/lmw030>
  13. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp [Electronic resource] / Yi-Jiun Pan [et al.] // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5, no. 1. – Mode of access: <https://doi.org/10.1038/srep15573>
  14. wzi Gene Sequencing, a Rapid Method for Determination of Capsular Type for *Klebsiella* Strains [Electronic resource] / S. Brisse [et al.] // *Journal of Clinical*

- Microbiology. – 2013. – Vol. 51, no. 12. – P. 4073–4078. – Mode of access: <https://doi.org/10.1128/jcm.01924-13>
15. Molecular Analysis of the Contribution of the Capsular Polysaccharide and the Lipopolysaccharide O Side Chain to the Virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a Murine Model of Pneumonia [Electronic resource] / Guadalupe Cortés [et al.] // Infection and Immunity. – 2002. – Vol. 70, no. 5. – P. 2583–2590. – Mode of access: <https://doi.org/10.1128/iai.70.5.2583-2590.2002>
  16. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets [Electronic resource] / Jane F. Turton [et al.] // Journal of Medical Microbiology. – 2010. – Vol. 59, no. 5. – P. 541–547. – Mode of access: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.015198-0>
  17. Candan E. D. *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors [Electronic resource] / Esra Deniz Candan, Nilüfer Aksöz // Acta Biochimica Polonica. – 2015. – Vol. 62, no. 4. – P. 867–874. – Mode of access: [https://doi.org/10.18388/abp.2015\\_1148](https://doi.org/10.18388/abp.2015_1148)
  18. The role of *Klebsiella pneumoniae* rmpA in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited [Electronic resource] / Chun-Ru Hsu [et al.] // Microbiology. – 2011. – Vol. 157, no. 12. – P. 3446–3457. – Mode of access: <https://doi.org/10.1099/mic.0.050336-0>
  19. Legese M. H. Extended-spectrum beta-lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* among Ethiopian children [Electronic resource] / Melese Hailu Legese, Gebru Mulugeta Weldearegay, Daniel Asrat // Infection and Drug Resistance. – 2017. – Volume 10. – P. 27–34. – Mode of access: <https://doi.org/10.2147/idr.s127177>
  20. Qin S. Welcome [Electronic resource] / Shihong Qin // 2010 International Conference on Mechanic Automation and Control Engineering (MACE), Wuhan, China, 26–28 June 2010 – [S. l.], 2010. – Mode of access: <https://doi.org/10.1109/mace.2010.5536537>
  21. Tominaga T. Rapid detection of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*,

- Raoultella ornithinolytica and other related bacteria in food by lateral-flow test strip immunoassays [Electronic resource] / Tatsuya Tominaga // Journal of Microbiological Methods. – 2018. – Vol. 147. – P. 43–49. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.02.015>
22. Microbial biosensors: A review [Electronic resource] / Liang Su [et al.] // Biosensors and Bioelectronics. – 2011. – Vol. 26, no. 5. – P. 1788–1799. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.005>
  23. Sharma S. Antibodies and antibody-derived analytical biosensors [Electronic resource] / Shikha Sharma, Hannah Byrne, Richard J. O'Kennedy // Essays in Biochemistry. – 2016. – Vol. 60, no. 1. – P. 9–18. – Mode of access: <https://doi.org/10.1042/ebc20150002>
  24. Immobilized Enzymes in Biosensor Applications [Electronic resource] / Hoang Hiep Nguyen [et al.] // Materials. – 2019. – Vol. 12, no. 1. – P. 121. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/ma12010121>
  25. From Microorganism-Based Amperometric Biosensors towards Microbial Fuel Cells [Electronic resource] / Eivydas Andriukonis [et al.] // Sensors. – 2021. – Vol. 21, no. 7. – P. 2442. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/s21072442>
  26. ZnO films formed by atomic layer deposition as an optical biosensor platform for the detection of Grapevine virus A-type proteins [Electronic resource] / Alla Tereshchenko [et al.] // Biosensors and Bioelectronics. – 2017. – Vol. 92. – P. 763–769. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.071>
  27. ZnO/polyaniline composite based photoluminescence sensor for the determination of acetic acid vapor [Electronic resource] / Mehmet Turemis [et al.] // Talanta. – 2020. – Vol. 211. – P. 120658. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120658>
  28. Photoluminescence immunosensor based on bovine leukemia virus proteins immobilized on the ZnO nanorods [Electronic resource] / Roman Viter [et al.] // Sensors and actuators B: chemical. – 2019. – Vol. 285. – P. 601–606. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.01.054>
  29. Electrochemical immunosensor based on ZnO nanorods-Au nanoparticles



- nanohybrids for ovarian cancer antigen CA-125 detection [Electronic resource] / Gisane Gasparotto [et al.] // *Materials science and engineering: c.* – 2017. – Vol. 76. – P. 1240–1247. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.031>
30. Mussel-Inspired surface chemistry for multifunctional coatings [Electronic resource] / H. Lee [et al.] // *Science.* – 2007. – Vol. 318, no. 5849. – P. 426–430. – Mode of access: <https://doi.org/10.1126/science.1147241>
31. Dielectric properties and thermal conductivity of epoxy composites using quantum-sized silver decorated core/shell structured alumina/polydopamine [Electronic resource] / Zhengdong Wang [et al.] // *Composites part A: applied science and manufacturing.* – 2019. – Vol. 118. – P. 302–311. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2018.12.022>
32. High performance gas sensors based on in-situ fabricated ZnO/polyaniline nanocomposite: the effect of morphology on the sensing properties [Electronic resource] / Yang Li [et al.] // *Sensors and actuators B: chemical.* – 2018. – Vol. 264. – P. 285–295. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.02.157>
33. Aguilar-Ferrer D. Recent developments in polydopamine-based photocatalytic nanocomposites for energy production: physico-chemical properties and perspectives [Electronic resource] / Daniel Aguilar-Ferrer, Jakub Szewczyk, Emerson Coy // *Catalysis today.* – 2021. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2021.08.016>
34. Photoelectrochemical response to glutathione in Au-decorated ZnO nanorod array [Electronic resource] / Xiuxiu Dong [et al.] // *Journal of materials chemistry C.* – 2019. – Vol. 7, no. 19. – P. 5624–5629. – Mode of access: <https://doi.org/10.1039/c9tc00901a>
35. Polydopamine/graphene/MnO<sub>2</sub> composite-based electrochemical sensor for in situ determination of free tryptophan in plants [Electronic resource] / Jiepei Gao [et al.] // *Analytica chimica acta.* – 2020. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.11.008>

36. Arroquia A. Self-assembled gold decorated polydopamine nanospheres as electrochemical sensor for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and tryptophan [Electronic resource] / Andrés Arroquia, Irene Acosta, M. Pilar García Armada // *Materials science and engineering: c.* – 2020. – Vol. 109. – P. 110602. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110602>
37. Synthesis and photoluminescence properties of hybrid 1D core–shell structured nanocomposites based on ZnO/polydopamine [Electronic resource] / Viktoriia Fedorenko [et al.] // *RSC advances.* – 2020. – Vol. 10, no. 50. – P. 29751–29758. – Mode of access: <https://doi.org/10.1039/d0ra04829a>
38. Про затвердження методичних вказівок "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів [Електронний ресурс]: Наказ МОЗ України від 05.04.2007 р. № 167. — Режим доступу: [https://zakononline.com.ua/documents/show/95792\\_\\_\\_684407](https://zakononline.com.ua/documents/show/95792___684407) (дата звернення: 15.12.2021). — Назва з екрана.
39. Zinc oxide nanorod based immunosensing platform for the determination of human leukemic cells [Electronic resource] / Alexander Tamashevski [et al.] // *Talanta.* - 2019. - 200. - P. 378–386. Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.064>
40. Combination of chlorhexidine and silver nanoparticles: an efficient wound infection and healing control system [Electronic resource] / P. Myronov [et al.] // *BioNanoScience.* – 2021. – Vol. 11, no. 2. – P. 256–268. – Mode of access: <https://doi.org/10.1007/s12668-021-00834-5>
41. Antibiotic sensitivity screening of klebsiella spp. and raoultella spp. isolated from marine bivalve molluscs reveal presence of ctx-m-producing *K. pneumoniae* [Electronic resource] / Fredrik Håkonsholm [et al.] // *Microorganisms.* – 2020. – Vol. 8, no. 12. – P. 1909. – Mode of access: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121909>
42. Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia [Electronic

- resource] / Hera Nirwati [et al.] // BMC proceedings. – 2019. – Vol. 13, s11. – Mode of access: <https://doi.org/10.1186/s12919-019-0176-7>
43. Anti-oxidant, anti-bacterial and anti-biofilm activity of biosynthesized silver nanoparticles using gracilaria corticata against biofilm producing *K. pneumoniae* [Electronic resource] / Govindan Nadar Rajivgandhi [et al.] // Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects. – 2020. – Vol. 600. – P. 124830. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124830>
44. Facile synthesis of novel size-controlled antibacterial hybrid spheres using silver nanoparticles loaded with poly-dopamine spheres [Electronic resource] / Hongyong Luo [et al.] // RSC advances. – 2015. – Vol. 5, no. 18. – P. 13470–13477. – Mode of access: <https://doi.org/10.1039/c4ra16469e>
45. Optical, morphological and biological analysis of zinc oxide nanoparticles (zno nps) using papaver somniferum L. [Electronic resource] / Wali Muhammad [et al.] // RSC advances. – 2019. – Vol. 9, no. 51. – P. 29541–29548. – Mode of access: <https://doi.org/10.1039/c9ra04424h>
46. Tuning optical properties of  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$  nanolaminates synthesized by atomic layer deposition [Electronic resource] / Adib Abou Chaaya [et al.] // The journal of physical chemistry C. – 2014. – Vol. 118, no. 7. – P. 3811–3819. – Mode of access: <https://doi.org/10.1021/jp411970w>
47. Optical, morphological and biological analysis of zinc oxide nanoparticles (zno nps) using papaver somniferum L. [Electronic resource] / Wali Muhammad [et al.] // RSC advances. – 2019. – Vol. 9, no. 51. – P. 29541–29548. – Mode of access: <https://doi.org/10.1039/c9ra04424h>