

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**«Розробка способу отримання наночастинок міді в культурі
мікродоростей *Dunaliella* та *Chlorella* та їх характеристика»**

Кваліфікаційна робота
студента кафедри
Корнейко Вікторії Павлівни

Допущена до захисту «__»_____20 р.

Завідувач кафедри _____

Науковий керівник:
доцент, к.б.н.
Голтвянський А.В.

Оцінка «_____»

«__»_____20 р.

Харків 2024

АНОТАЦІЯ

У роботі було запропоновано новий методологічний підхід отримання наночастинок (міді) на прикладі зразків біомаси клітин мікроводоростей вихідної культури *Dunaliella viridis* D.v-Cu.S і резистентної до іонів міді культури D.v-Cu.R за умови додаткового внесення іонів сірчаної кислоти міді до біомаси досліджуваних водоростей та визначення впливу термообробки на формування наночастинок.

Отримані дані свідчать про те, що в ультрафільтраті вихідної культури D.v.S. була присутня досить велика кількість амінокислот, пептидів та невелика кількість білків з молекулярною масою меншою за 10 кДа, порівняно з культурою D.v.R, де вони були відсутні. Зазначимо, що термообробка (121 °C за 1 атм протягом 30 хв) супроводжувалася деградацією білків рівною мірою для біомаси клітин D.v.S і D.v.R., тобто їхня оптична щільність не відрізнялася.

Виявили, що в ультрафільтраті нативних D.v.S були присутні досить великі частинки діаметром 4712 нм (близько 12 % і понад 80 % частинки з діаметром 1066 нм, тоді як в «ультрафільтраті» D.v.R виявили частинки зі значно меншим діаметром 682 нм (на їхню частку припадало близько 80%) та частинки з діаметром близько 173 нм (19%). Наявність білка в досліджуваних зразках є методичним обмеженням при визначенні наявності наночастинок методом DLS.

Показали, що термічна обробка зразків за високого тиску дала змогу отримати задовільні результати щодо відтворюваності характеристик наночастинок у біологічних зразках мікроводоростей, водночас розмірні характеристики цих частинок були різними для варіантів D.v.S. і D.v.R., і порівняно з нативними зразками.

Робота включає 69 сторінок, містить 20 рисунків. Список використаної літератури містить 60 джерел, з них 59 іноземні.

Ключові слова: *Dunaliella viridis*, іони міді, резистентність, наночастинок.

ABSTRACT

In the paper, a new methodological approach to obtaining nanoparticles (copper) was proposed on the example of samples of the biomass of microalgae cells of the original culture *Dunaliella viridis* D.v-Cu.S and the culture resistant to copper ions D.v-Cu.R, on the condition that copper sulfate ions are added to the biomass of the investigated algae and determining the effect of heat treatment on the formation of nanoparticles.

The obtained data indicate that in the ultrafiltrate of the initial culture of D.v.S. quite a large number of amino acids, peptides and a small number of proteins with a molecular weight of less than 10 kDa were present, compared to the D.v.R culture, where they were absent. Note that heat treatment (121 °C at 1 atm for 30 min) was accompanied by protein degradation to the same extent for the biomass of D.v.S and D.v.R. cells, that is, their optical density did not differ.

It was found that in the ultrafiltrate of native D.v.S there were quite large particles with a diameter of 4712 nm (about 12% and more than 80% of particles with a diameter of 1066 nm, while in the "ultrafiltrate" of D.v.R, particles with a much smaller diameter of 682 nm were found (their share was about 80%) and particles with a diameter of about 173 nm (19%). The presence of protein in the studied samples is a methodological limitation when determining the presence of nanoparticles by the DLS method.

It was shown that heat treatment of samples under high pressure allowed to obtain satisfactory results regarding the reproducibility of the characteristics of nanoparticles in biological samples of microalgae, while the dimensional characteristics of these particles were different for the variants of D.v.S. and D.v.R., and compared to native samples.

The work includes 69 pages, contains 20 drawings. The list of used literature contains 60 sources, of which 59 are foreign.

Key words: *Dunaliella viridis*, copper ions, resistance, nanoparticles.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ТА АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Загальна характеристика наночастинок.....	8
1.2. Фізичні і біологічні способи отримання наночастинок	10
1.3. Приклади отримання наночастинок із рослинних об'єктів	13
1.4. Методи отримання наночастинок з використанням мікроводоростей (сухої біомаси і живої культури)	14
1.5. Обґрунтування доцільності отримання наночастинок (міді) в культурі мікроводоростей та можливості практичного використання	17
1.6. Порівняльний аналіз токсичності наночастинок міді та іонів міді	18
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	21
2.1. Теоретична частина.....	21
2.1.1. Умови культивування мікроводоростей <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Chlorella kessleri</i> та <i>Tetraselmis suecica</i> на здатність біосинтезу наночастинок міді.....	21
2.1.2. Біосинтез наночастинок міді з морських водоростей <i>Ulva lactuca</i>	25
2.1.3. Екстракт біомаси водоростей як посередник для синтезу наночастинок оксиду міді.....	27
2.1.4. Синтез наночастинок оксиду міді з використанням екстракту <i>Anabaena cylindrica</i>	29
2.1.5. Екстракт зеленої водорості <i>Botryococcus braunii</i> для синтезу наночастинок міді.....	31
2.1.6. Синтез наночастинок оксиду міді за допомогою <i>Phormidium cyanobacterium</i>	33
2.2. Власні дослідження.....	35
2.2.1. Об'єкт дослідження та умови культивування.....	35
2.2.2. Процедура отримання маткової культури <i>D. viridis</i>	36
2.2.3. Спосіб отримання наночастинок міді в клітинах мікроводоростей <i>Dunaliella viridis</i>	37
2.2.4. Визначення спектрів зразків водоростей <i>D.v.CuS</i> і <i>D.v.CuR</i> в УФ-області.....	38
2.2.5. Визначення спектральної характеристики та наявності наночастинок в ультрафільтрах <i>D.v.S.</i> і <i>D.v.R.</i>	38
2.2.6. Статистичні методи.....	39
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	40
3.1. Теоретична частина.....	40
3.1.1. Здатність мікроводоростей <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Chlorella kessleri</i> та <i>Tetraselmis suecica</i> до біосинтезу наночастинок міді.....	39
3.1.2. Оцінка результатів біосинтезу наночастинок міді з <i>Ulva lactuca</i>	41
3.1.3. Оцінка результатів синтезу наночастинок оксиду міді шляхом біосинтезу екстракту біомаси водоростей	43

3.1.4. Оцінка результатів синтезу наночастинок оксиду міді з використанням екстракту <i>Anabaena cylindrica</i>	45
3.1.5. Результати синтезу наночастинок міді за допомогою екстракту зеленої водорості <i>Botryococcus braunii</i>	48
3.1.6. Результат синтезу наночастинок оксиду міді за допомогою <i>Phormidium cyanobacterium</i>	49
3.2. Оцінка результатів власних досліджень	50
3.2.1. Дослідження вмісту іонів міді у двох культурах мікрободоростей D.v.S. і D.v.R.....	50
3.2.2. Дослідження спектральної характеристики в УФ-області зразків D.v-Cu.S і D.v-Cu.R, отриманих у нативних умовах і після термообробки.....	52
3.2.3. Дослідження спектральної характеристики та наявності наночастинок в ультрафільтратах D.v.S. і D.v.R., отриманих у нативних умовах.....	53
3.2.4. Дослідження спектральної характеристики та наявності наночастинок в ультрафільтратах D.v.S. і D.v.R. отриманих після термообробки.....	58
ВИСНОВОК.....	61
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	62

ВСТУП

Сучасні нанобіотехнології відкривають перед науковими дослідниками та промисловими виробниками нові можливості у синтезі екологічно чистих наночастинок (НЧ). Одним із цікавих напрямків у цій галузі є зелений метод синтезу НЧ, який використовує біологічні процеси для їхнього створення. Замість хімічних реагентів, використовуваних у традиційних методах, у зеленому синтезі використовуються відновники, отримані з живих організмів.

Багато видів біологічних організмів, включаючи водорості, бактерії, гриби та рослини, були вже успішно використані для синтезу НЧ в ряді досліджень. Водорості, зокрема, виявилися перспективними у цьому відношенні через їхню здатність ефективно взаємодіяти з металами та виробляти НЧ без утворення шкідливих побічних продуктів.

У зеленому синтезі НЧ міді, використання екстрактів мікрководоростей відкриває нові можливості для створення нетоксичних та екологічно чистих матеріалів. Біологічні творці, такі як водорості, виробляють НЧ з високою продуктивністю, що робить цей процес більш доступним і економічно вигідним. Крім того, водорості можуть рости у широкому спектрі середовищ, включаючи стічні води, що робить їх ідеальними кандидатами для біологічного синтезу НЧ.

Наночастинки міді мають широкий спектр застосувань у медицині, біотехнології, косметиці та інших галузях. Вони володіють унікальними властивостями, що роблять їх привабливими для дослідження та застосування у різних сферах.

Актуальність даної теми полягає в тому, що сучасні наукові дослідження стверджують про необхідність розвитку екологічно чистих методів синтезу наночастинок для різних застосувань. Зелений синтез наночастинок з використанням біологічних матеріалів, таких як водорості, стає все більш актуальним в контексті підвищення екологічної свідомості та пошуку альтернативних, більш безпечних методів синтезу.

Метою дослідження було: визначити наявність наночастинок (міді) у двох культурах *Dunaliella viridis* D.v.S. і D.v.R., що початково різнилися за вмістом міді в клітинах, за умови додаткового внесення сірчаної кислоти міді та вплив термообробки на формування наночастинок..

Предметом дослідження є процес утворення наночастинок міді за допомогою біомаси водоростей та їх характеристики, такі як розмір та спектр розподілу частинок.

Об'єктами дослідження є водорості, як джерело біологічних матеріалів для синтезу наночастинок, а також самі синтезовані наночастинок (міді) та їхні властивості.

Завдання роботи:

1. Визначити наявність наночастинок у D.v.S. і D.v.R. культурі *Dunaliella viridis* за дотримання нативних умов.
2. Визначити наявність наночастинок у D.v.S. і D.v.R. культурі *Dunaliella viridis* за термообробки.
3. Дослідити спектральну характеристику в УФ-області у зразках D.v.S. і D.v.R. культури в нативних умовах.
4. Дослідити спектральну характеристику в УФ-області у зразках D.v.S. і D.v.R. культури після термообробки.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ТА АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика наночастинок

Основним компонентом нанотехнологій є наночастинки (НЧ). Наночастинки — це частинки розміром від 1 до 100 нанометрів, які складаються з вуглецю, металу, оксидів металів або органічної речовини [1]. Наночастинки виявляють унікальні фізичні, хімічні та біологічні властивості на нанорозмірі порівняно з їхніми відповідними частинками на вищих масштабах. Це явище зумовлене відносно більшою площею поверхні до об'єму, підвищеною реакційною здатністю або стабільністю в хімічному процесі, підвищеною механічною міцністю тощо [2]. Ці властивості наночастинок призвели до їх використання в різних сферах застосування.

Наночастинки відрізняються різними розмірами, формами та розмірами, незалежно від їх матеріалу [3]. Наночастинка може бути або нульовимірною, де довжина, ширина та висота фіксуються в одній точці, наприклад наноточки, одновимірною, де вона може мати лише один параметр, наприклад графен, двовимірною, де вона має довжину та ширину, наприклад вуглець нанотрубки або тривимірний, де він має всі параметри, такі як довжина, ширина та висота, наприклад наночастинки золота.

Численні методи синтезу або розробляються, або вдосконалюються, щоб покращити властивості та зменшити витрати на виробництво. Деякі методи модифіковано для отримання специфічних для процесу наночастинок для підвищення їх оптичних, механічних, фізичних і хімічних властивостей [3]. Значний розвиток приладобудування призвів до покращення характеристики наночастинок і подальшого застосування. Зараз наночастинки використовуються в будь-яких об'єктах, наприклад, від посудини для приготування їжі, електроніки до відновлюваних джерел енергії та

аерокосмічної промисловості. Нанотехнології є ключем до чистого та стійкого майбутнього.

Наночастинки зазвичай класифікуються на органічні, неорганічні та вуглецеві.

Органічні наночастинки. Дендримери, міцели, ліпосоми та феритин тощо є загальновідомими органічними наночастинками або полімерами. Ці наночастинки є біологічно розкладаними, нетоксичними, а деякі частинки, такі як міцели та ліпосоми, мають порожнисте ядро (рис. 1.1), також відоме як нанокапсули, і чутливі до теплового та електромагнітного випромінювання, такого як тепло та світло [4]. Ці унікальні характеристики роблять їх ідеальним вибором для доставки ліків. Місткість лікарського засобу, його стабільність і системи доставки, визначають їхню сферу застосування та їхню ефективність, окрім їх звичайних характеристик, таких як розмір, склад, морфологія поверхні тощо. Найбільш широко використовуються органічні наночастинки саме в біомедичній галузі, наприклад, в системі доставки ліків, оскільки вони ефективні, а також можуть вводитися в певні частини тіла, що відомо як цільова доставка ліків.

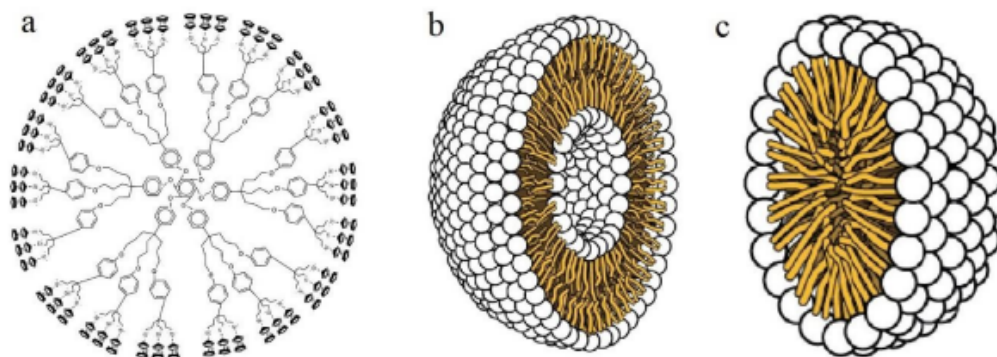


Рис. 1.1. Органічні наночастинки: а – дендримери, б – ліпосоми і с – міцели.

Неорганічні наночастинки - це частинки, які не складаються з вуглецю. Наночастинки на основі металу та оксиду металу зазвичай класифікуються як неорганічні наночастинки.

Наночастинки, які синтезуються з металів до нанометричних розмірів деструктивними або конструктивними методами, є наночастинками на основі металів. Майже всі метали можна синтезувати в наночастинки [5]. Зазвичай для синтезу наночастинок використовують алюміній (Al), кадмій (Cd), кобальт (Co), мідь (Cu), золото (Au), залізо (Fe), свинець (Pb), срібло (Ag) і цинк (Zn). Наночастинки мають відмінні властивості, такі як розміри від 10 до 100 нм, характеристики поверхні, такі як високе співвідношення площі поверхні до об'єму, розмір пор, поверхневий заряд і щільність поверхневого заряду, кристалічні та аморфні структури, сферичні та циліндричні форми, колір, реакційну здатність і чутливість. факторів навколишнього середовища, таких як повітря, волога, тепло та сонячне світло тощо.

Наночастинки на основі оксиду металу синтезуються для зміни властивостей відповідних наночастинок на основі металу, наприклад, наночастинки заліза (Fe) миттєво окислюються до оксиду заліза (Fe_2O_3) у присутності кисню при кімнатній температурі, що підвищує їх реакційну здатність порівняно з наночастинками заліза. Наночастинки оксидів металів синтезуються в основному завдяки їх підвищеній реакційній здатності та ефективності [6]. Зазвичай синтезуються оксид алюмінію (Al_2O_3), оксид церію (CeO_2), оксид заліза (Fe_2O_3), магнетит (Fe_3O_4), діоксид кремнію (SiO_2), оксид титану (TiO_2), оксид цинку (ZnO). Ці наночастинки мають виняткові властивості в порівнянні з їх металевими аналогами.

Наночастинки, повністю виготовлені з вуглецю, відомі як *вуглецеві* [7]. Їх можна класифікувати на фулерени, графен, вуглецеві нанотрубки (ВНТ), вуглецеві нановолокна та сажу, а іноді й активоване вугілля в нанорозмірі.

1.2. Фізичні і біологічні способи отримання наночастинок

У синтезі наночастинок, які можуть мати природне або синтетичне походження та виявляти унікальні властивості на нанорозмірі,

використовуються два основні підходи, які включають різні методи отримання та відомі з давніх часів. Залежно від потреби підбираються методи синтезу наночастинок. Кожен метод має як переваги, так і недоліки; спосіб виробництва вибирається в залежності від наявності потужностей. Фізичні методи підходять для дрібносерійного виробництва, оскільки хімічні методи вибираються там, де вартість виробництва є проблемою. [8, 9].

Фізичний синтез

Механічний спосіб

Кульове подрібнення

Цим методом синтезують нанокристалічні Co, Cr, W, Ag-Fe. Співвідношення кульок до матеріалів 2:1. Ємність заповнена інертним газом або повітрям і обертається з великою швидкістю навколо центральної осі. Матеріали вдавлюються між стінками ємності і кульками. Швидкість і тривалість помелу відіграють значну роль у синтезі наночастинок оптимального розміру [10, 11].

Змішування розплаву

Змішування розплавлених потоків металів на високій швидкості з турбулентністю утворюють наночастинки. Наночастинки затримуються в склянці. Метали, коли охолоджуються при великих пропорціях охолодження, можуть утворювати аморфні тверді речовини - металеві скла. Наприклад: розплавлений потік Cu-W і нагрітий потік Ti утворюють наночастинки TiW₂ [12, 13].

Імпульсна лазерна абляція

Високоімпульсний лазерний промінь фокусується на зразку і генерується плазма, яка попередньо перетворюється на колоїдний розчин наночастинок. Лазер типу групи другої гармоніки часто використовується для створення наночастинок. Елементами, що впливають на кінцеве створення, є тип лазера, деякі імпульси, тип розчинника, час імпульсації [14-16].

Метод імпульсного дротяного розряду

Найбільш широко використовуваний метод синтезу металевих наночастинок. Металевий дріт випаровується пульсуючим струмом, щоб отримати пару, яку потім охолоджують навколишнім газом для обробки наночастинок. Ця схема має, можливо, високу швидкість виготовлення та високу енергопродуктивність [17, 18]

Хімічне осадження з парової фази

Тонка плівка газоподібного реагенту осідає на підкладку приблизно при 300-1200 °С. Хімічна реакція відбувається між нагрітою підкладкою та поєднаним газом, у результаті чого на поверхні підкладки утворюється тонка плівка продукту. Прикладений тиск змінюється в діапазоні 100-10⁵. Переваги цієї технології полягають у тому, що виготовляються жорсткі, однорідні, надійні та високочисті наночастинки. Побічні продукти, що утворюються на підкладці, повинні повертатися в газоподібну фазу, видаляючи їх із підкладки [19].

Лазерний піроліз

Процес синтезу наночастинок за допомогою лазера відомий як лазерний піроліз. Інтенсивний лазерний промінь фокусується, щоб розкласти суміш газів-реагентів на наявність деякого неактивного газу, такого як гелій або аргон. Тиск газу відіграє значну роль у визначенні розмірів частинок та їх розподілу [20].

Осадження іонізованого кластерного пучка

Метод був розроблений у 1985 році. Основною метою цього методу є отримання високоякісних монокристалічних тонких плівок. Система містить джерело випаровування, сопло, через яке матеріал може розширюватися в камеру, електронний промінь для іонізації кластерів, пристрій для прискорення кластерів і підкладку, на яку можна осадити плівку наночастинок, усі розміщені у відповідному вакуумній камері. Після впливу електронним променем колекції іонізуються. Завдяки прикладеній прискорюючій напрузі кластери фокусуються

поблизу підкладки. Ймовірно, він контролює енергію, з якою кластери вдаряються об субстрат, відстежуючи прискорювальну напругу. Стійкі кластери певних матеріалів потребуватимуть значної енергії, щоб розірвати їхні зв'язки, і радше залишатимуться такими ж малими, як кластери частинок. Таким чином, плівки з нанокристалічного матеріалу можуть бути виготовлені за допомогою іонізованого кластерного пучка [21].

Деякими недоліками фізичних методів отримання є використання дорогого обладнання та високе споживання енергії, що робить їх менш популярними, ніж хімічні або біологічні методи.

Біологічний синтез

«Зелений синтез» наночастинок передбачає використання екологічно чистих, нетоксичних і безпечних реагентів. Наночастинки, синтезовані за допомогою біологічних методів або зелених технологій, мають різноманітну природу, з більшою стабільністю та відповідними розмірами, оскільки вони синтезуються за допомогою одноетапної процедури.

Загалом, зелена нанобіотехнологія означає синтез наночастинок або наноматеріалів за допомогою біологічних шляхів, таких як мікроорганізми, рослини та віруси або їх побічні продукти, такі як білки та ліпіди, за допомогою різних біотехнологічних інструментів. Наночастинки, виготовлені за допомогою зелених технологій, значно перевершують ті, що виготовляються фізичними та хімічними методами, що базуються на різних аспектах. Наприклад, екологічні технології виключають використання дорогих хімікатів, споживають менше енергії та створюють екологічно безпечні продукти та побічні продукти [22].

1.3. Приклади отримання наночастинок із рослинних об'єктів

Механізми біологічного синтезу наночастинок досі до кінця не з'ясовані. Оскільки при синтезі наночастинок зазвичай відбувається хімічне відновлення металу, то досліджуються сполуки живих клітин, які здатні виступати

відновниками. Вважається, що у процесі біологічного синтезу наночастинок задіяні вільні амінокислоти, водорозчинні білки, ферменти, флавоноїди, терпеноїди, фенольні сполуки, таніни, проантоціанідини, вуглеводи, вітаміни [23, 24]. Так, встановлено, що за умов позаклітинного синтезу золотих наночастинок грибом *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hansen відновлення металу відбувається за рахунок НАДН-залежної редуктази [25], а при синтезі срібних частинок з використанням культуральної рідини *Enterobacteria sp.* задіяні нітратредуктази [26].

Крім того, для зеленого синтезу наночастинок використовуються різні частини рослин, такі як насіння, стебла, квіти та листя; ці рослинні екстракти, в основному, використовуються для зменшення кількості наночастинок завдяки вмісту жирних кислот, алкалоїдів і флавоноїдів. Численні дослідники змішують наночастинок міді за допомогою рослинного екстракту як відновника, а також закриваючого агента. Екстракт *Gloriosa Superba L.* [27], екстракт кори *Punicagranatum* [28], частинки розміром 23 нм, синтезовані корою *T. Arjuna* [29]. Екстракт *Datura innoxia (Solanaceae)*, екстракт листя магнолії, *Artabotrys Odoratissimus (Nag Champa)*, скибка екстракту листя магнолії може виробляти наночастинок міді в діапазоні від 40 до 100 нм [30].

Також повідомлялося [31] про, синтезовані грибами, наночастинок міді, які ростуть у розчині CuSO_4 протягом 96 год, при рН 5. Види *Penicillium*, такі як *Penicillium Vaksmanii*, *Penicillium Aurantiogriseum* і *Penicillium citrinum*, виділені з ґрунту, використовувалися для синтезу наночастинок міді, де монодисперсність, рН і концентрація впливали на їх морфологію [32].

1.4. Методи отримання наночастинок з використанням мікробіодоростей (сухої біомаси і живої культури)

Мікробіодорості служать важливими біосутностями для очищення стічних вод, виробництва біопалива та великомасштабного виробництва різних

продуктів з доданою вартістю, що представляють комерційний інтерес [33, 34]. Важливим продуктом мікробіодоростей є різні металеві наночастинки. Досягнення біотехнології передбачили, що наночастинки, синтезовані з мікробіодоростей, мають величезний потенціал для широкомасштабного синтезу металевих наночастинок із перспективним застосуванням у різноманітних секторах.

Здатність мікробіодоростей виживати в різноманітних та екстремальних умовах робить їх потенційними біоагентами для розумного управління забрудненням важкими металами [35,36]. Колонії мікробіодоростей служать інтегрованими зеленими утвореннями, які можуть одночасно рости в ніші, забрудненій важкими металами, і використовувати свою стійкість до металів для біосинтезу комерційно важливих металевих наночастинок. Повідомляється, що клітини мікробіодоростей використовують метали в низьких концентраціях для виконання клітинних функцій, таких як фотосинтетична передача електронів, як кофактори в ферментативних реакціях і асиміляція N_2 . Біосинтез металевих наночастинок відкриває економічний і екологічний протокол разом із біоремедіацією забрудненого металевим середовища.

Сфера обробки біомаси водоростей в каталітичних умовах викликала великий інтерес протягом останнього десятиліття. Водорості відомі своєю здатністю гіпернакопичувати іони важких металів і перетворюватися в більш пластичні форми [37]. Тому водорості були запропоновані як модельні організми для виготовлення біонаноматеріалів. Зародження, розвиток і стабілізація наночастинок регулюються такими фізичними факторами, як рН, концентрація прекурсора, час реакції, час впливу та температура. Ці змінні можна модифікувати, щоб регулювати розмір і морфологію клітин, а також щоб уникнути агломерації.

Синтез наночастинок із широкого розмаїття ресурсів водоростей виявився одним із останніх і найбільш інноваційних напрямків біохімічних досліджень,

оскільки вони мають властивість відновлювати іони металів [38]. Наночастинки можуть бути синтезовані як внутрішньо-, так і позаклітинно залежно від виду водорості та режиму роботи.

Водорості, особливо мікрководорості, є новими та перспективними організмами, які використовуються для синтезу наноматеріалів. Вибір водоростей як агента синтезу наноматеріалів є більш перспективним, ніж інші живі організми чи біоматеріали. Дослідники використовували різні методи, такі як відкриті системи культивування (наприклад, відкриті ставки, резервуари та ставки з каналами) і закриті системи культивування (наприклад, фотобіореактори) для культивування різних видів водоростей [39].

У більшості експериментів спостерігаються наступні основні етапи біосинтезу металевих наночастинок з використанням водоростей:

- Нагрівання або кип'ятіння екстракту водоростей у воді або органічному розчині протягом визначеного періоду часу.
- Приготування молярних розчинів іонних металевих сполук.
- Як водорості, так і розчини іонних металевих сполук інкубують протягом певного періоду часу в контрольованих умовах, або з регулярним перемішуванням, або без перемішування.

Виходячи з особливостей водоростей, синтез наночастинок може бути здійснений позаклітинним або внутрішньоклітинним методом точним і кількісним способом. Як фотосинтез, так і дихальна активність у водоростей відповідають за відновлення іонів металів, що в подальшому призводить до утворення внутрішньоклітинного виробництва металевих наночастинок. Вважається, що фермент нітрогеназа бере участь у відновленні нанометалів, яке відбувається в ціанобактеріях.

Живі клітини мікрководоростей використовуються для синтезу металевих наночастинок в одноетапному процесі, який включає водний розчин, що містить солі металів, який наноситься безпосередньо на клітини під час їх

культивування. Після синтезу наночастинки вивільняються в культуральне середовище, загорнуте всередину матриці, яка часто відповідає за утворення колоїдів. Останній через свою вагу осідає в фотобіореакторі. Повторювані цикли для біосинтезу наночастинок можуть бути проведені, якщо необхідно, шляхом введення свіжого культурального середовища. Крім того, мікроводорості зберегли свою здатність до біосинтезу наночастинок, коли вони потрапили в органічні везикули. Кілька мікроорганізмів водоростей використовувалися в біосинтезі наноматеріалів шляхом вилучення біомолекул з їх клітин [40].

1.5. Обґрунтування доцільності отримання наночастинок (міді) в культурі мікроводоростей та можливості практичного використання

В даний час біологічні види, такі як водорості, широко використовуються для синтезу наночастинок. Для біогенного синтезу наночастинок використовується як жива, так і мертва біомаса водоростей, тому їх називають біонанофабриками. Водорості мають хорошу здатність поглинати метали, тому біологічний метод з використанням водоростей є економічно ефективним і екологічним [41]. Водорості містять велику кількість відновника, який відновлює солі металів до відповідних наночастинок металу без будь-яких небезпечних побічних продуктів. Водний екстракт водоростей містить вторинні метаболіти, такі як полісахариди, протеїни, дубильні речовини та стероїди як біоактивні молекули [42-44].

Наночастинки володіють ефективними антибактеріальними та протигрибковими властивостями завдяки великій площі поверхні, що дозволяє їм краще контактувати з мікробами [45]. Наночастинки можуть порушувати спіральну структуру ДНК шляхом перехресного зшивання в межах нуклеїнових кислот, а також порушувати біохімічні процеси [46].

Інтерес до НЧ на основі міді викликає їхня оптична, провідна, магнітна, каталітична, термічна та антибіотична активність завдяки покращеним фізико-хімічним властивостям завдяки їх малому співвідношенню поверхні до об'єму порівняно з об'ємним матеріалом [47, 48]. Використання необроблених водних екстрактів водоростей було досліджено декількома авторами як джерело відновлювачів і блокуючих джерел для зеленого синтезу Cu-NPs [49-54]. У цьому контексті наночастинки оксиду міді (CuO-NP) були успішно синтезовані з використанням кип'яченого водного екстракту з бурих водоростей *Bifurcaria bifurcata* та *Cystoseira trinodis* у діапазоні розмірів від 5 до 45 нм та від 6 до 7,8 нм відповідно [49, 53]. Крім того, водний екстракт бурих морських водоростей (*Sargassum polycystum*) використовувався Рамасвами та ін. [51] для отримання CuO-НЧ. Подібним чином автоклавований водний екстракт із зелених мікрководоростей *Botryococcus braunii* виробляв CuO-NP розміром від 10 до 70 нм [50]. Крім того, Бхатачарія та ін. [54] застосували дещо інший метод шляхом нагрівання при 50 °C замість кип'ятіння екстракту, щоб отримати водний екстракт із мікрководоростей *Anabaena cylindrica*, і отримали CuO-NPs з розміром частинок 3,6 нм. Важливо відзначити, що детальна характеристика компонентів водоростей, відповідальних за процес відновлення та стабілізації з використанням міді як промотора, ще не знайдена. Таким чином, актуально проводити дослідження щодо використання конкретних біомолекул у зеленому синтезі на CuO-NP, щоб розширити їх використання для біологічних застосувань. Це також може забезпечити краще розуміння для портрету його впливу на основні характеристики CuO-NP.

Біосинтезовані мікрководоростями НЧ можуть бути безпечним джерелом елементів для людського організму та бути новою їжею. Надходження таких мікрководоростей з НЧ може викликати їх пряму взаємодію з організмом людини. Метою наночастинок мікрководоростей є покращення біодоступності слідів металів.

1.6. Порівняльний аналіз токсичності наночастинок міді та іонів міді

В останні роки наукові дослідження наночастинок (НЧ) показали величезний і швидкий розвиток завдяки їх широкому застосуванню в різних галузях, включаючи електроніку, косметику, харчову промисловість і медицину. Використання виготовлених наночастинок має великий потенціал у широкому діапазоні застосувань, оскільки їх відмінні фізико-хімічні характеристики можна використовувати в залежності від застосування шляхом зміни їх розміру, властивостей поверхні та форми. Однак їхні унікальні фізико-хімічні властивості можуть впливати на їхню токсикологічну поведінку *in vivo* шляхом полегшення клітинного поглинання та переміщення частинок в організмі. Крім того, фізіологічне середовище впливає на взаємодію між біологічними системами та НЧ і може визначати долю та біобезпеку НЧ.

Мідь (Cu) є важливим елементом, необхідним для нормальних фізіологічних функцій у людей і тварин, включаючи утворення гемоглобіну, метаболізм ліків, метаболізм вуглеводів, біосинтез катехоламінів і механізм антиоксидантного захисту. Однак, коли споживання Cu перевищує діапазон біологічної толерантності, це може спричинити несприятливі наслідки, включаючи гемоліз, шлунково-кишкові розлади та пошкодження печінки та нирок. Останні токсикологічні дослідження наночастинок показали, що вони, як правило, виявляють зовсім інші токсикологічні ефекти *in vivo* порівняно з більшими частинками того самого хімічного складу. Наночастинки міді (НЧ міді) та їх окислена форма НЧ оксиду міді (CuO) широко використовуються як добавки до кормів для худоби та птиці, полімерів/пластиків і мастильних матеріалів для металевих покриттів. Незважаючи на великий потенціал НЧ Cu в біомедичному застосуванні, дослідження токсичності НЧ Cu та НЧ CuO здебільшого обмежуються дослідженнями *in vitro*. НЧ міді виявляють цитотоксичну дію на різні клітинні лінії. Крім того, НЧ CuO мають високу

цитотоксичність порівняно зі звичайними НЧ металооксиду та вуглецевими нанотрубками.

Дослідження гострої токсичності наночастинок Cu та іонів Cu раніше проводилося на мишах. Кінетику оцінювали лише в сироватці, нирках і сечі протягом 72 годин після впливу. Фізико-хімічний аналіз показує, що наночастинок міді в транспортному засобі або змодельованому кишковому середовищі демонструють тенденцію до агрегації/агломерації з низькою розчинністю. Однак НЧ Cu розчиняються в кислих умовах з високим позитивним зарядом, але меншим розчиненням порівняно з іонами Cu. Ці висновки означають, що взаємодія між фізико-хімічними характеристиками НЧ і біологічною системою може впливати на їх токсичність і поведінку *in vivo*.

Кінетичне дослідження демонструє, що рівень Cu в крові та досліджуваних органах із Cu NPs демонструє сповільнене підвищення та менше збільшення, ніж це спостерігається для іонів Cu. Однак поглинена або накопичена Cu з Cu NP демонструє повільніше зменшення в крові та перевірених органах, ніж іони Cu. Неабсорбовані Cu NPs або абсорбована Cu, дисоційована з Cu NPs, в основному виводилася з калом. *In vivo* токсичність Cu NPs виникає при набагато вищих дозах, ніж іони Cu, щоб викликати подібну відповідь з очевидними відмінностями, пов'язаними зі статтю. Крім того, Cu NPs викликають системні токсичні ефекти з функціональними та морфологічними змінами в печінці, нирках та селезінці. У сукупності, порівняно з їх іонною формою, токсичність Cu NPs *in vivo*, швидше за все, корелює з їх розчинністю у фізіологічному середовищі та їх біорозподілом [54].

Значна концентрація важких металів може впливати та перешкоджати розвитку разом із змінами морфології мікробіот. Однак мікробіоти мають здатність виробляти фікохімічні речовини, такі як хелатоутворювачі металів і активні форми кисню, які взаємодіють з нанорозмірними ядрами металів. Взаємозв'язок між ядрами металів і мікробіотами при високому

рівні металу виявився практичним способом біосинтезу металевих наночастинок для застосування різних аспектів.

Оскільки доступна література щодо синтезу наночастинок міді з мікроводоростей *Dunaliella* та *Chlorella* є обмеженою, було прийнято рішення розширити дослідження на інші мікроводорості, які також можуть бути потенційними кандидатами для синтезу наночастинок міді. Дослідники звернули увагу на інші види мікроводоростей, такі як *Ulva*, *Spirulina*, *Haematococcus*, *Scenedesmus* та інші, які також мають потенціал для синтезу наночастинок міді.

Пошук в науковій літературі був спрямований на знаходження статей та досліджень, що вивчають здатність різних видів мікроводоростей до синтезу та накопичення наночастинок міді. Виявлення таких робіт дозволило розширити обсяг літературного обзору та отримати більше даних для подальшого дослідження.

Застосування інших мікроводоростей для синтезу наночастинок міді може відкрити нові перспективи у цьому напрямку досліджень. Це дозволить збагатити наше розуміння можливостей мікроводоростей у біосинтезі наноматеріалів та знайти нові шляхи для їхнього використання в різних галузях, таких як медицина, фармація, косметологія та інші.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Теоретична частина

2.1.1. Умови культивування мікроводоростей *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella kessleri* та *Tetraselmis suecica* на здатність біосинтезу наночастинок міді

Штами мікроводоростей та умови експерименту

Штами мікроводоростей *Dunaliella tertiolecta* і *Tetraselmis suecica* були надані компанією Biorganix Mexicana з їх приватної колекції. Штам *Chlorella kessleri* (CDBB-A-12) був придбаний у “Colección nacional de cepas microbianas y cultivos celulares” від “Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional”.

Штами культивували в середовищі f/2 для штамів *D. tertiolecta* та *T. suecica* та середовищі Bold для *C. kessleri*. Весь матеріал перед використанням стерилізували в автоклаві. Усі посіви культур проводили в камері ламінарного потоку в асептичних умовах. Колбу Ерленмейера на 250 мл із 150 мл культурального середовища засіяли 3×10^5 клітинами мл^{-1} . Усі експериментальні одиниці зберігали при постійній аерації, освітлювали біля основи колб білою флуоресцентною лампою 17 Вт (Phillips ALTO II T8) та інкубували при 23 °C. В якості основи для експериментальних установок використовувався прозорий полікарбонатний лист. Період освітлення становив 12 годин, що чергувалися з 12 годинами темряви. Процес спостерігали протягом 18 днів після інокуляції (0, 3, 5, 7, 9, 1, 13, 15 і 18 днів), і 1 мл зразка відбирали з кожної експериментальної одиниці та негайно аналізували. Фотосинтетично активне випромінювання (ФАВ) вимірювали квантовим датчиком (LightScout 3681) над полікарбонатним листом. Вимірне випромінювання ФАВ відповідає випромінюванню, отриманому на основі колби. Для обробки ФАВ-фактори низької радіації (-) ($50 \text{ мкмоль фотонів м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) і високої радіації (+) ($230 \text{ мкмоль фотонів м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) були поєднані з умовами низької та високої солоності, як показано у таблиці 2.1. Для експериментів було отримано чотири обробки на штам з трьома повторами для кожного.

Таблиця 2.1

Експериментальна матриця з комбінаціями освітлення та солоності, які відповідають обробці для кожного штаму

Штам	ФАВ (мкмоль фотонів $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$)	Солоність NaCl (М)	Електропровідність (мСм/ см^{-1})	pH
<i>Ch. kessleri</i>	50	0,00043	0,82	7,1
	50	0,10000	9,87	6,8
	230	0,00043	0,85	7,1
	230	0,10000	10,00	6,8

<i>D. tertiolecta</i>	50	0,46	55,3	7,7
	50	1,50	135,0	7,4
	230	0,46	55,0	7,7
	230	1,50	136,0	7,4
<i>T. suecica</i>	50	0,46	60,7	7,7
	50	1,00	105,0	7,5
	230	0,46	63,3	7,7
	230	1,00	105,0	7,5

Аналітичні методи

Для кожного зразка, взятого з експериментальної установки у встановлені дні, контролювали підрахунок клітин, рН (Horiba, Laqua twin S010) і електропровідність (Horiba Laqua twin S070). Підрахунок клітин проводили за допомогою камери Нойбауера три рази на експериментальну одиницю в оцінювані дні. Швидкість росту (GR) розраховували за формулою. (2.1):

$$GR = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1) \quad (2.1)$$

де x_1 і x_2 представляють концентрацію клітин на момент часу в дні t_1 і t_2 , відповідно.

Для кількісного визначення об'єму клітини використовували загальний метод розрахунку біооб'єму клітини на основі геометричного віднесення. Для *C. kessleri* була використана формула сфери, тоді як для *D. tertiolecta* і *T. suecica* це було розраховано за формулою витягнутого сфероїда. На знімках, зроблених за допомогою оптичного мікроскопа з використанням програми Axion Vision 4,8, вимірювали 30 клітин для кожної обробки та визначали екваторіальний діаметр кожної клітини. У випадках *D. tertiolecta* і *T. suecica* крім діаметра вимірювали довжину. Середній об'єм клітин у кожній обробці та щільність популяції використовували для розрахунку біооб'єму культури на мілілітр.

Для кількісного визначення фотосинтетичного пігменту було взято 2 мл культурального середовища, як зазначено вище. Зразки центрифугували при

8000 об/хв протягом 15 хв, і осад виділяли. Потім осад змішували з 1 мл етанолу та обробляли ультразвуком (Bransonic 1510RDTH) протягом 15 хв. Через 24 години у холодильнику було виміряно поглинання при 470, 653 і 666 нм.

Біосинтез та оцінка наночастинок міді

Після 18 днів культивування популяції підраховували для розрахунку дози мідного купоросу ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ реактивного класу, Fermont) для кожної обробки. За основу брали максимальну популяцію кожного штаму з концентрацією 0,5 мМ CuSO_4 . Концентрацію сульфату міді регулювали пропорційно до кожної обробки відповідно до популяції клітин, щоб забезпечити однакову концентрацію сульфату міді на клітину. Після 72 годин застосування сульфату міді (21 день після інокуляції) кожну експериментальну одиницю розділили на чотири колби по 20 мл зразка для кожної. Дві колби зберігалися як вихідна експериментальна одиниця (клітини в їх культуральному середовищі), а дві інші колби були безклітинними, містили лише культуральне середовище. Колби з безклітинним середовищем отримували центрифугуванням (Hermle Z 206 A) при 6000 об/хв протягом 15 хв і шляхом відділення супернатанту.

Після 72 годин витримки міді використовували оцінки УФ-спектроскопії (Thermo Scientific, Genesys 10S) для виявлення утворення НЧ Cu. Сканована область від 200 до 700 нм показала характерні піки поглинання для ідентифікації НЧ Cu. Поверхневий плазмонний резонанс поверхонь наночастинок Cu зі сферичною формою локалізований у видимій області з максимальним поглинанням між 520 і 580 нм, тоді як виявлення різних типів CuO-НЧ перебували в УФ-області спектру. Зразки зберігали в умовах ультраморозної температури ($-80\text{ }^\circ\text{C}$) для подальшого аналізу за допомогою SEM (Hitachi SU8010) при прискорювальній напрузі 3,0 кВ [55].

2.1.2. Біосинтез наночастинок міді з морських водоростей *Ulva lactuca*

Приготування водної витяжки

Стадія попередньої обробки включала використання дистильованої води для очищення та промивання зразка. Попередньо оброблений зразок був підданий процедурі сушіння в духовці з гарячим повітрям при температурі, встановленій нижче 60 °С. Після сушіння

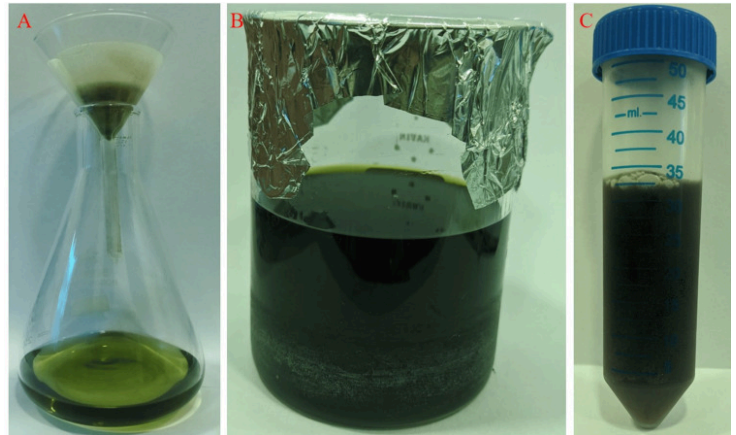


Рис. 2.1. Фільтрація (2А), водний екстракт морських водоростей *Ulva lactuca* (2В), сирий екстракт (2С)

зразок подрібнювали в грубий порошок за допомогою ступки і товкачика. Потім 50 г проби морських водоростей вносили в конічну колбу, що містила 100 мл дистильованої води. Потім суміш перемішували протягом приблизно 24 годин (рис. 2.1), після чого отриманий екстракт пропускали через муслінову тканину для фільтрації.

Синтез наночастинок міді

Водний розчин сульфату Cu (CuSO_4) (10 мМ) готували з використанням двічі дистильованої води. Об'єм 100 мл розчину CuSO_4 вносили в конічну колбу, а потім додавали по краплях 5-10 мл водного екстракту при безперервному перемішуванні за допомогою орбітального шейкера при 180 об/хв протягом 24 годин. Біосинтезований розчин піддавали візуальному огляду та подальшій оцінці за допомогою УФ-спектрофотометра 580 нм. Потім біосинтетичні зразки центрифугували при 12000 об/хв. Гранули зберігалися в ізоляції та піддавались процесу сушіння за допомогою печі з гарячим повітрям.

Антиоксидантна активність *in vitro*

Здатність поглинати радикали DPPH

Антиоксидантну здатність алкалоїдів оцінювали шляхом вимірювання їхньої здатності поглинати стабільний вільний радикал DPPH відповідно до методології, описаної Ramasamy та ін. У цьому експерименті різні концентрації алкалоїду (від 25 до 100 мкл) змішували з 2900 мкл розчину метанолу, що містив 120 мкМ DPPH. Потім суміш інкубували за відсутності світла при температурі 37°C протягом 30 хв. Поглинання вимірювали при довжині хвилі 517 нм. Відсоток інгібування (I%) вільних радикалів DPPH розраховували за допомогою рівняння, наведеного нижче.

$$\text{Відсоток інгібування (I \%)} = (\text{бланк} - \text{зразок}) / \text{холост} \times 100$$

Тут пуста проба – це абсорбція контрольної реакції, а зразок – абсорбція досліджуваної сполуки. ВНТ та аскорбінову кислоту використовували як позитивний контроль, і всі тести проводили в трьох повторах.

Загальна антиоксидантна активність (ТАА)

Загальну антиоксидантну активність алкалоїдів, отриманих із штаму морських актинобактерій, вимірювали за допомогою процедури, описаної Ramasamy et al. з невеликими змінами. Коротко, зразок об'ємом 0,3 мл був отриманий при різних концентраціях від 25 до 100 мкл. Це було досягнуто шляхом змішування проби з розчином реагенту, що складається з 0,6 М сірчаної кислоти, 28 мМ фосфату натрію та 4 мМ молібдату амонію в об'ємі 3 мл. Реакційну суміш піддавали інкубації при температурі 95 °С протягом 90 хв. на водяній бані. Поглинання всіх сумішей зразків кількісно визначали при довжині хвилі 695 нм. Загальну антиоксидантну активність кількісно визначали шляхом вимірювання кількості еквівалентів аскорбінової кислоти [56].

2.1.3. Екстракт біомаси водоростей як посередник для синтезу наночастинок оксиду міді

Біогенний синтез наночастинок оксиду міді.

При інтенсивному перемішуванні протягом 1 дня при 100 °С 10 мл екстракту водоростей (5% г/об) додавали по краплях до 100 мл 1 мМ водного розчину ацетату міді в колбі Ерленмейера (ємністю 250 мл) для синтезу НЧ CuO як позитивна реакційна суміш. Крім того, водний розчин ацетату міді без екстракту водоростей використовували як негативний контроль і зберігали в тих же умовах, що й позитивна реакційна суміш. Якщо колір позитивної реакційної суміші змінювався через 5 годин з яскраво-синього на темно-коричневий, це було ознакою того, що утворювалися CuONP, але в негативному контролі колір не змінювався. Для відстеження розвитку процесу проводилися регулярні зміни кольору та вимірювання УФ-видимого спектру. Утворені НЧ CuO збирали центрифугуванням протягом 15 хв. Потім отримані НЧ CuO повторно диспергували та очищали деіонізованою H₂O для видалення будь-якого сміття та нескоординованих біомолекул. Цю процедуру розділення та промивання повторювали тричі, щоб забезпечити відділення НЧ CuO. Отримані чисті НЧ CuO були висушені в печі для завершення процесу визначення характеристик.

Характеристика створених наночасток CuO

Створення НЧ CuO біомасою водоростей було задокументовано за допомогою УФ-видимого спектрофотометра (Nicolet evolution 100, Кембридж, Массачусетс, США) в діапазоні довжин хвиль (200-700 нм). Крім того, реакційну суміш при різних температурах (30, 40 і 50 °С) оцінювали за допомогою УФ-видимого спектрофотометра для синтезу НЧ CuO. Форму та розмір створених НЧ CuO досліджували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа (ТЕМ; JEOL JEM-2100, Токіо, Японія). Створені НЧ CuO суспендували у водному розчині; а потім краплю суспензії транспортували на сітки ТЕМ, а потім висушували перед дослідженням. Рентгенівський дифрактометр X'Pert Pro (Philips, Ейндховен, Нідерланди) був застосований для оцінки кристалічності CuONP, створених біомасою водоростей. Діапазон температур 2θ був від 4 до 70 °С. Як джерело рентгенівського випромінювання

використовувалося випромінювання Ni-фільтрованого Cu Ka з напругою 40 кВ і струмом 30 мА.

Противіробкова та антибактеріальна активність

Для тестування використовували різноманітні фітопатогенні (*Curvularia lunata* та *Fusarium oxysporium*), мікотоксикогенні (*Aspergillus flavus* та *Aspergillus terreus*) та біозастосовні (*Metarhizium anisopliae* та *Trichoderma harzianum*) гриби. Чашки Петрі містили тверде культуральне середовище без досліджуваних сполук (НЧ CuO, ацетат міді, екстракт водоростей і оксихлорид міді (хімічний фунгіцид)), а також середовище, збагачене різними концентраціями кожної досліджуваної сполуки (50, 100 і 200 мг/л). Грибний міцелій (6 мм грибового диска) переносили в центр поверхні агарової пластини, а потім інкубували при 30 °С протягом 7 днів. Розвиток росту протестованих грибів оцінювали за допомогою вимірювання радіуса колонії порівняно з контрольними культурами.

Планшети з поживним агаром засівали досліджуваними бактеріями, включаючи *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC8739 і *Klebsiella pneumoniae* ATCC 8047, за допомогою методу штрихування. Потім диски (6 мм), заповнені 100 мкл НЧ CuO, ацетатом міді, екстрактом водоростей і гентаміцином як стандартним антибіотиком (20 мкг/мл), поміщали на поверхню інокульованого агару з досліджуваними бактеріями. Планшети зберігали в холодильнику протягом 30 хвилин, щоб забезпечити дифузю досліджуваних матеріалів до росту бактерій, потім інкубували при 37°C протягом 24 годин, а потім виміряли з'явилися прозорі зони [57].

2.1.4. Синтез наночастинок оксиду міді з використанням екстракту *Anabaena cylindrica*

Приготування водоростевого екстракту

Чистий штам мікродоростей *Anabaena cylindrica* був зібраний з Інституту біотехнології та культивованій у специфічних водоростевих середовищах в асептичних умовах з належним освітленням. Біомасу сушили при температурі приблизно 50 °С протягом ночі в печі. Після сушіння висушену біомасу подрібнювали, просівали і зберігали в повітронепроникному контейнері для подальшого використання. Приблизно 1 г висушених водоростей брали на 100 мл стерильної дистильованої води в 250 мл склянку і кип'ятили при 50 °С протягом приблизно 30 хв. Потім суміш охолоджували і фільтрували через фільтрувальний папір Whatman No-1 і зберігали при 4 °С для подальшого використання в зеленому синтезі наночастинок.

Синтез наночастинок оксиду міді

100 мл 1 мМ розчину сульфату міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Merck, Індія) помістили в конічну колбу на 250 мл і помістили на нагрівач з мішалкою. Екстракт водоростей (2,5 г/100 мл; 5 г/100 мл і 10 г/100 мл) додавали по краплях до розчину CuSO_4 при постійному перемішуванні зі змінною швидкістю обертання (500–1000 об/хв) при температурі 60 °С. Вплив рН на утворення наночастинок спостерігали шляхом зміни рН розчину від 6,2 до 10,2. Для спостереження за впливом рН використовували 0,1 (Н) розчин гідроксиду натрію та 0,1 (Н) розчин соляної кислоти. Для забезпечення утворення наночастинок спостерігали зміну кольору розчину. Утворені частинки багаторазово промивали дистильованою водою і центрифугували. Початкову концентрацію розчину CuSO_4 змінювали від 0,5 до 2,5 мМ. Промиті частинки сушили в духовці при 100 °С протягом 24 годин і зберігали в герметичному контейнері для подальшого використання.

МІК (мінімальна інгібуюча концентрація) та антимікробна активність наночастинок

Антимікробну активність синтезованих НЧ CuO виявлено відносно індикаторних патогенних бактерій *Escherichia coli*. Мінімальна інгібуюча

концентрація (МІК) наночастинок була визначена методом розведення бульйону згідно з рекомендаціями Інституту клінічних і лабораторних стандартів. Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) — це найнижча концентрація, при якій ріст бактерій пригнічується, і мінімальна бактерицидна концентрація (МБК), при якій ріст бактерій повністю запобігається антибіотиками/антибактеріальними засобами.

До 10 мл розчину живильного бульйону додавали різні концентрації наночастинок (5–100 мкг/мл) проти ампіциліну як стандартного антибіотика. До кожного бульйону додавали приблизно 10 мкл бактеріальних клітин (*E. coli*), а пробірки з бактеріальними клітинами та наночастинами інкубували при 37 °С протягом 24 годин і спостерігали за ростом або появою каламутності в бульйоні. Концентрацію, при якій бактеріальні клітини не ростуть, записували як МІК. Цю концентрацію далі використовували для аналізу дифузії лунки. Для аналізу дифузії лунок свіжі культури *E. coli* засівали в асептичних умовах на стерилізовані чашки з агаром, що містять живильні середовища. Наночастинок (5–100 мкг/мл) завантажували в 5 лунок діаметром 5 мм і петрипланшети інкубували при 37 °С протягом 24 годин. Експерименти проводили в трьох примірниках, і антибактеріальну активність аналізували шляхом спостереження за діаметром зони інгібування, що розвивається навколо лунок [58].

2.1.5. Екстракт зеленої водорості *Botryococcus braunii* для синтезу наночастинок міді

Виділення та культивування зеленої водорості та приготування водоростевого екстракту

Зелену водорість виділяли методом серійних розведень і вирощували на живильному середовищі Чу-13, зміцненому 1,5 % агар-агаром. Колонії водоростей, що з'явилися після трьох тижнів інкубації, виділяли та інокулювали в рідке середовище. Для експериментів водорості вирощували для біомаси

водоростей в інкубаторі при $27 \pm 1^\circ\text{C}$, інтенсивності світла $1,2 \pm 0,2$. Інтенсивність світла Кlux і 16:8 годин світла: темновий цикл у живильному середовищі. Вирощену водоростеву біомасу центрифугували, висушували в тіні та відбирали 5 г водоростевої біомаси в колбу Ерленмейера на 250 мл разом зі 100 мл дистильованої води. Суміш автоклаували 15 хв і гарячою фільтрували через фільтрувальний папір Ватман № 1. Відфільтрований екстракт центрифугували, а супернатант використовували як відновник для отримання наночастинок металу. Приготований екстракт водоростей зберігали при 4°C у холодильнику для подальшого використання.

Синтез металевих наночастинок

5 мл екстракту водоростей додавали по краплях до 50 мл 1 мМ водного розчину ацетату міді в колбі Ерленмейера на 100 мл при інтенсивному перемішуванні при 100°C протягом 24 годин. Одночасно позитивний контроль водного розчину ацетату міді та екстракту водоростей і негативний контроль, що містить лише водний розчин ацетату міді, підтримували в однакових умовах. У позитивному контролі протягом трьох годин світло-блакитний розчин змінився на темно-коричневий. Це було ознакою утворення наночастинок міді, але в негативному контролі колір залишається незмінним. Перебіг процесу регулярно контролювався шляхом спостереження за зміною кольору та запису УФ-видимого спектру. Після завершення процесу вищевказану реакційну суміш центрифугували протягом 15 хвилин, а отриманий матеріал потім повторно диспергували та промивали деіонізованою водою для видалення сміття та будь-яких некоординованих біомолекул. Цей процес розділення та промивання проводили тричі до певного відриву наночастинок міді. Ці наночастинок міді були висушені в печі для подальшої характеристики.

Характеристика металевих наночастинок

Біовідновлення іонів металу в розчині контролювали за допомогою спектрофотометра UV-Vis NIR (модель № серії Cary), знімаючи спектри від 200 до 800 нм для кожного зразка проти дистильованої води як холостого зразка. Для характеристики використовували висушені порошки наночастинок міді та срібла. Аналіз FTIR проводили на FTIR (PerkinElmer) в діапазоні 4000–450 см⁻¹ з використанням сухого порошку металевих наночастинок. Зразки для аналізу готували в умовах навколишнього середовища та змішували з KBr, а рентгенівські дифракційні вимірювання проводили на системі Philips Xpert pro XRD (DY 1650). Форму та розмір наночастинок міді аналізували за допомогою зображень скануючої електронної мікроскопії (SEM), отриманих за допомогою скануючого електронного мікроскопа (Model-FEI Quanta 200 SEM).

Антимікробна активність синтезованих наночастинок металів

Антимікробну активність наночастинок оцінювали за допомогою методу планшетів з лунками з агаром, а мінімальну інгібуючу концентрацію визначали за допомогою аналізу розведення мікробульйону. Два штами грамнегативних бактерій *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 441) і *Escherichia coli* (MTCC 442), два штами грампозитивних бактерій *Klebsiella pneumoniae* (MTCC 109) і *Staphylococcus aureus* (MTCC 96) і штаб грибка *Fusarium oxysporum* (MTCC 2087) були використані в розслідуванні. Бактеріальні культури зберігали в чашках Петрі, що містять поживне агаризоване (NA) середовище при 37°C, а гриби *Fusarium oxysporum* підтримували в картопляно-декстрозному агарі при 25°C. Усі культури регулярно пересівали та зберігали при 4°C.

Аналіз планшета з лунками з агаром

Для оцінки антимікробної активності синтезованих наночастинок використовували метод агарової дифузії. Поживний агар, що містить мікробний інокулят, розсипали по всій чашці Петрі. Потім в охолодженому агарі, стерильним буром або наконечником асептично пробивали лунку діаметром 8–10 мм. У лунку додавали 20–40 мл концентрації наночастинок 1000 мкг/мл, а

потім чашки з агаром інкубували в стерильних умовах залежно від досліджуваного мікроорганізму. Наночастинки дифундують у агаризоване середовище та пригнічують ріст мікробів. Потім антимікробну активність наночастинок виявили за появою зони інгібування навколо лунки агару. Зону вимірювали за допомогою прозорої лінійки від одного краю до іншого краю чистої ділянки [59].

2.1.6. Синтез наночастинок оксиду міді за допомогою *Phormidium cyanobacterium*

Синтез наночастинок оксиду купруму

Для синтезу НЧ CuO *Phormidium cyanobacterium* вирощували в 500 мл колбі Ерленмейєра, що містила 100 мл цитратного мінімального середовища (СММ) та інкубували протягом 15 годин при 150 об/хв при 28 °С. Після інкубації два грами (сирої ваги) бактеріальної біомаси збирали центрифугуванням при 5000 об/хв при 5 °С протягом 10 хвилин, тричі промивали в стерильних умовах і ресуспендували в 100 мл 10⁻³ М водного розчину CuSO₄ у 500 мл колбі Ерленмейєра, інкубували при 150 об/хв протягом 42 годин при 28 °С. Біологічно синтезовані наночастинки збирали в супернатант у стерильних умовах центрифугуванням при 5000 об/хв протягом 10 хвилин і характеризували різними методами. Супернатант діалізували для видалення CuSO₄, що не прореагував. Хід реакції, тобто позаклітинний синтез наночастинок, спостерігали шляхом спостереження піку при 600 нм у різні часові інтервали, що є характеристикою CuO НЧ.

Характеристика НЧ CuO

Біологічно синтезовані наночастинки були охарактеризовані за допомогою рентгенівської дифракції (РД), спектрофотометрії, трансмісійної, скануючої електронної мікроскопії (ТЕМ та СЕМ відповідно) та інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (ІС). Зразок для ТЕМ-аналізу готували

крапельним нанесенням на мідну сітку з вуглецевим покриттям. Аналіз електронної дифракції вибраної області (АЕДВО) також проводився для підготовлених вище зразків ТЕМ. Вимірювання проводили на приладі JEOL модель 1200EX, який працював при прискорювальній напрузі 120 кВ. СЕМ вимірювання CuO НЧ, синтезованих біомасою *Phormidium cyanobacterium*, проводили на скануючому електронному мікроскопі Leica Stereoscan-440, оснащеному приставкою Phoenix EDAX. Вимірювання спектроскопії проводили на двопробеному спектрофотометрі JASCO (модель V-570) з роздільною здатністю 2 нм. XRD вимірювання плівок, відлитих із розчину, готових біогенних наночастинок на скляних підкладках проводили на приладі Phillips PW 1830, що працював при напрузі 40 кВ і струмі 30 мА з випромінюванням Cu K α . Вимірювання ІС проводили на спектрометрі Perkin Elmer Spectrum-One з роздільною здатністю 4 см⁻¹.

Розділення білків і білковий профіль

Для аналізу бактеріального білка(ів), відповідального за гідроліз попередника солі CuSO₄ до оксиду міді, 2 г бактеріальної біомаси суспендували у водному 10⁻³ М розчині CuSO₄ протягом 42 годин при 28 °С при 150 об/хв. Секретовані білки осаджували трихлороцтовою кислотою. Білковий профіль на SDS-PAGE (електрофорез у додецилсульфаті натрію–поліакриламідному гелі) (10%) супернатанту, що містить НЧ CuO, порівнювали з відповідними контролюями.

Контрольні досліді

У подібних експериментах для контролю бактеріальну біомасу суспендували в деіонізованій воді за відсутності CuSO₄, а отриманий супернатант аналізували РД та ІС на наявність наночастинок та SDS-PAGE для аналізу білкового профілю. Отриманий результат не показав утворення наночастинок CuO. В іншій серії контрольного експерименту CuSO₄ розчиняли

за відсутності бактеріальної біомаси, і отриманий результат не показав утворення CuO НЧ [60].

2.2. Власні дослідження

2.2.1 Об'єкт дослідження та умови культивування

Культура *Dunaliella viridis* Teod. var. *viridis* f. *euchlora*, штам IBASU-A N29.

Умови культивування маткової культури: живильне середовище Артарі 20 мл, плоскодонні конічні колби Ерленмейера об'ємом 250 мл, температура 24-26 °С, освітленість цілодобово на поверхні колби, лампи денного світла FD-36-E-G13 36W/2300 лм., періодичне ручне перемішування.

За прописом готували середовище Артарі модифікації Масюк для вирощування мікроводоростей *D. viridis*. Для приготування розчину використовували дистильовану воду та мінеральні солі, що вказані нижче. Кожну сіль зважували окремо, розчиняли, переливали в мірну колбу і доводили об'єм до 1 літра. Після фільтрували через скляний фільтр і визначали рН приготовленого середовища. Склад середовища (г/л): NaCl – 116 г/л, MgSO₄×7H₂O – 50 г/л, KNO₃ – 2,5 г/л, K₂HPO₄ – 0,2 г/л, рН – 6,3 -7.

Водорості *D. viridis* були вирощені за стандартними умовами у плоских конічних колбах Ерленмейера об'ємом 250 мл. Культурний об'єм становив 100 мл, а початкова концентрація клітин склала 1,3 мільйона на мілілітр.

2.2.2. Процедура отримання маткової культури *D. viridis* включала наступні кроки:

1. Культуру з різних колб переливали у одну колбу Ерленмейера та переносили в центрифужні пластикові пробірки.
2. Після цього проводили центрифугування протягом 15 хвилин при швидкості 5000 обертів за хвилину для осадження клітин.

3. Після відділення надосадової рідини, до осаду додавали чисте середовище Артарі у об'ємі 5 мл.

4. Клітини ресуспендували у свіжому середовищі, і відбирали зразок для підрахунку клітин, який розводили в 40 разів.

5. Після цього проводили підрахунок клітин мікроводоростей у камері Горяєва для визначення необхідної кількості для досягнення вихідної концентрації 1,3 мільйона клітин на мілілітр.

6. Клітини *D. viridis* 5% спиртовим розчином йоду, досягаючи кінцевої концентрації йоду 0,05%.

Підрахунок числа клітин проводили з об'єктивом 10х або 20х. Число клітин підраховували в 25 великих квадратах сітки, вибираючи 3 стовпець камери. Враховували всі клітини, що лежали в квадраті сітки, а також перетинали верхню і праву сторони квадрата. При підрахунку число клітин в великому квадраті не повинно перевищувати 20 - 30, в іншому випадку вихідну суспензію клітин розводили дистильованою водою. Для отримання достовірного результату брали 2-3 краплі культури після ретельного перемішування. Кількість клітин у 1 кубічному сантиметрі вихідної суспензії: $C = a \times 1000 / h \times S \times n$, де: a - середнє число клітин в квадраті сітки; h - глибина камери, мм; 0,1 мм; S - площа квадрата сітки, мм кв.; 1/25 мм; n - розведення вихідної суспензії (за наявності); 1000 мм куб. = 1 см куб. = 1 мл, переведення в мл.

Отримали: $C = a \times 1000 / 0,1 \times 1/25 \text{ мм} \times 25 \text{ квадратів} = a \times 10000$ тис клітин в мл або $C = a \times 0,01$ млн / мл.

Розрахунок посівного інокуляту. Обсяг поживного середовища колби 100 мл, в 1 мл повинно міститися 1,3 млн./мл клітин, в 100 мл – 130 млн / мл. В 1 мл маткового концентрату міститься A клітин, необхідно внести X мкл, щоб вихідна концентрація клітин в 100 мл склала 130 млн / мл. Отримуємо: $x = 130 /$

А. Отриманий в результаті розрахунку обсяг маткової культури вносили в кожную колбу.

2.2.3 Спосіб отримання наночастинок міді в клітинах мікроводоростей *Dunaliella viridis*

Раніше в нашій лабораторії було отримано культуру мікроводоростей *D. viridis*, здатну виживати в середовищі з високою концентрацією сірчаноокислої міді - 75 мг/л, тобто резистентну до високої концентрації міді - D.v.CuR, на відміну від вихідної культури, чутливої до іонів міді - D.v.CuS. Ці дві культури водоростей ми використовували як модельні об'єкти. Для цього 27 добову культуру D.v.CuS і D.v.CuR осаджували центрифугуванням за 5000 обертів упродовж 15 хв при кімнатній температурі (кількість клітин двох штамів у суспензії була однаковою - $2,0 \times 10^9$ і об'єм клітинних суспензій був вирівняний). Надосадову зливали, а осад клітин промивали дистильованою водою (відповідно до вихідного об'єму) і осаджували центрифугуванням за 5000 обертів упродовж 15 хв. Надосадову зливали, а осад клітин суспендували в 20 мл дистильованої води, руйнували осмотичним шоком із подальшою гомогенізацією. Отриманий гомогенат біомаси культур мікроводоростей розділяли на дві паралельні з варіанту D.v.CuS і дві паралельні з варіанту D.v.CuR, а саме: 1) 10 мл гомогенату осаджували центрифугуванням за 15000 протягом 20 хв на холоді, надосадову збирали і фільтрували через фільтр 0,22 мкм; 2) до 10 мл гомогенату вносили сірчаноокислу мідь до температурикінцевої концентрації 7 г/л, інкубували 15 хвилин з перемішуванням на магнітній мішалці; автоклавували за режиму 1атм – 30 хвилин, осаджували центрифугуванням за 15000 обертів, охолоджували до кімнатної температури і фільтрували через фільтр 0,22 мкм (мембранні фільтри, res, діаметр 47 мм, пори 0,22 мкм). Отримали 4 зразки ультрафільтрату для подальшого визначення можливої наявності наночастинок.

2.2.4. Визначення спектрів зразків водоростей D.v.CuS і D.v.CuR в УФ-області

З метою визначення зміни ступеня екстрактивності компонентів мікрowodоростей після внесення сірчаноокислої міді визначали спектри поглинання водорозчинних компонентів в 4 зразках ультрафільтрату D.v.CuS і D.v.CuR культур мікрowodоростей на спектрофотометрі Shimadzu UV-2600 за хвильових хвиль 200-400 нм.

2.2.5. Визначення спектральної характеристики та наявність наночастинок в ультрафільтратах D.v.S і D.v.R.

Для визначення розміру частинок використовували систему фотонної кореляційної спектроскопії серії Malvern Zetasizer Nano для аналізу наноматеріалів і характеристики дисперсних систем, а саме прилад: Zetasizer Nano ZS Malvern Instruments (Malvern, Great Britain), оснащений He-Ne лазером ($\lambda=633$ нм). Інтенсивність розсіяного світла детектували за кута розсіювання 173° , з атенюатором у положенні 7-10. Тривалість кожного вимірювання становила 60-80 секунд і включала 12-16 прогонів (runs). Прилад дає можливість вимірювання гідродинамічного розміру частинок і макромолекул методом динамічного світлорозсіювання (DLS) у діапазоні від 0.3 нанометра до кількох мікрометрів; дзета-потенціалу та електрофоретичної рухливості методом електрофоретичного розсіювання світла; абсолютної молекулярної маси методом статичного розсіювання світла (SLS). Вимірювання проводилися в полістирольних кюветах. Протягом вимірювання зразки термостатували при 25°C і відстоювали в кюветі протягом 15 хвилин. Спроби провести вимірювання для не відстояних розчинів призводила до неприйняттого зниження якості даних. Введені параметри системи: в'язкість 0.8968, коефіцієнт заломлення частинок (Cu) 0.25, коефіцієнт заломлення дисперсійного середовища (H_2O) 1.331.

2.2.6. Статистичні методи

Для кожного зразка здійснювалося 10 вимірювань. Автокореляційну функцію аналізували за допомогою програми Zetasizer Software з використанням алгоритмів для дистрибутивного аналізу.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Теоретична частина

3.1.1. Здатність мікроводоростей *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella kessleri* та *Tetraselmis suecica* до біосинтезу наночастинок міді

Штам із найкращою швидкістю росту був у *C. kessleri* (табл. 3.1), з найвищими значеннями в період від 0 до 9 днів, демонструючи незначне уповільнення у період від 9 до 18 днів. Умова, за якої швидкість росту зазнала найбільшого впливу для цього штаму, була L-S+. Як опромінення, так і солоність показали значний вплив на кінцеву популяцію цього штаму без взаємодії між факторами. Нижчі популяції та більші клітини *C. kessleri* можуть бути отримані в умовах високої солоності. У *D. tertiolecta* найвища швидкість росту була виявлена в період від 0 до 9 днів; однак уповільнення росту спостерігалось в період від 9 до 18 днів, досягаючи стаціонарної фази в усіх варіантах обробки. Ефект освітлення не був значущим як для кінцевої популяції, так і для клітинного об'єму *D. tertiolecta*; незважаючи на це, ці фактори взаємодіють із солоністю та мають значний вплив на популяцію та клітинний об'єм. Вміст фотосинтетичного пігменту показав варіації між обробками, з найвищими значеннями в обробках хлорофілом L-S+, що могло бути пов'язано з пристосуванням фотосинтетичного апарату до низького освітлення та солоності, що відображено у варіаціях каротиноїдів. З іншого боку, *T. suecica* не виявив значних впливів або взаємодій через фактори освітлення та солоності на кінцеву популяцію. Значні ефекти цих факторів спостерігалися лише в об'ємі клітин цього штаму, причому найбільші клітини спостерігалися в обробках із низькою солоністю. Культури *Tetraselmis suecica* при обробках L+S- і L-S- досягли стаціонарної фази росту приблизно через 15 днів культивування, тоді як в умовах L-S+ і L+S+ зростання популяції спостерігалось до 18 днів.

Утворення наночастинок міді було оцінено мікрowodоростями *Chlorella kessleri*, *Dunaliella tertiolecta* та *Tetraselmis suecica*, що розвивалися в комбінованих умовах низького (L⁻) та високого (L⁺) освітлення, з низькою (S⁻) та високою солоністю (S⁺). Освітленість становила 12 год:12 год світло/темрява. Утворення НЧ оцінювали через 72 години після впливу солі міді. НЧ оксиду міді (CuO) були виявлені спектрофотометрично як у культуральних середовищах (позаклітинні НЧ), так і в клітинах (внутрішньоклітинні НЧ) *Ch. Kessleri* з поглинанням в діапазоні від 200 до 235 нм. НЧ металевої міді (Cu_n) були виявлені з поглинанням між 540 і 560 нм при обробці клітин *C. kessleri* та *D. tertiolecta*, які вирощувалися в L+S⁻, тоді як клітини *T. suecica* показали утворення НЧ Cu_n у L-S⁻, L-S⁺ та L+S⁻. Різницю розмірів НЧ вимірювали за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEM) при обробці клітин *C. kessleri*, розмір яких варіювався від 15 до 25 нм (L-S⁻) і від 55 до 65 нм (L+S⁻). При обробці культуральним середовищем були отримані розміри НЧ від 35 до 45 нм (L-S⁻) [55].

3.1.2. Оцінка результатів біосинтезу наночастинок міді з *Ulva lactuca*

На рис. 3.1. видно, що розчин, що містить мідь, і водний екстракт пройшли процес потемніння протягом 24 годин, що свідчить про утворення наночастинок міді.

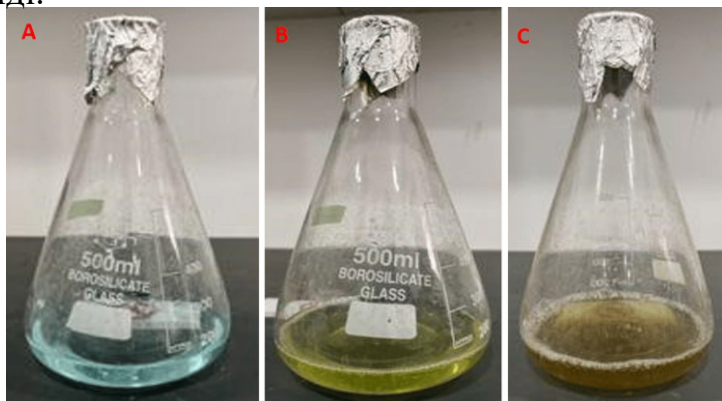


Рис. 3.1. Розчин міді (3А), початкова стадія синтезу наночастинок міді (3В) і зміна кольору через 24 години (3С)

Графік ілюструє кореляцію між рівнем поглинання та довжиною хвилі наночастинок Cu, синтезованих у поєднанні з морськими водоростями *Ulva lactuca*. Наночастинки міді, отримані з морських водоростей, показали пікове поглинання 1,2 при конкретній довжині хвилі 580 нм (рис. 3.2).

Антиоксидантну активність оцінювали за допомогою трьох стандартних методик, зокрема аналізу DPPH, загального антиоксидантного аналізу та аналізу H₂O₂. У цьому дослідженні були досліджені різні концентрації наночастинок Cu (25, 50, 75 і 100 мкг/мл), щоб оцінити їхню ефективність поглинання вільних радикалів. Висновки, отримані за допомогою аналізу DPPH, показали, що здатність поглинати вільні радикали демонструє позитивну кореляцію з кількістю наночастинок міді, таким чином демонструючи залежність від дози. Помітне підвищення рівня інгібування радикалів DPPH спостерігалось зі збільшенням концентрації наночастинок Cu. Результати дослідження свідчать про значну антиоксидантну дію наночастинок щодо радикалів DPPH. Аналіз загального антиоксиданту та аналіз H₂O₂ продемонстрували збільшення їх здатності елімінувати вільні радикали, які залежали від концентрації, подібно до аналізу DPPH. Спостережена здатність наночастинок Cu ефективно знижувати рівень H₂O₂ вказує на їхні потужні антиоксидантні властивості [56].

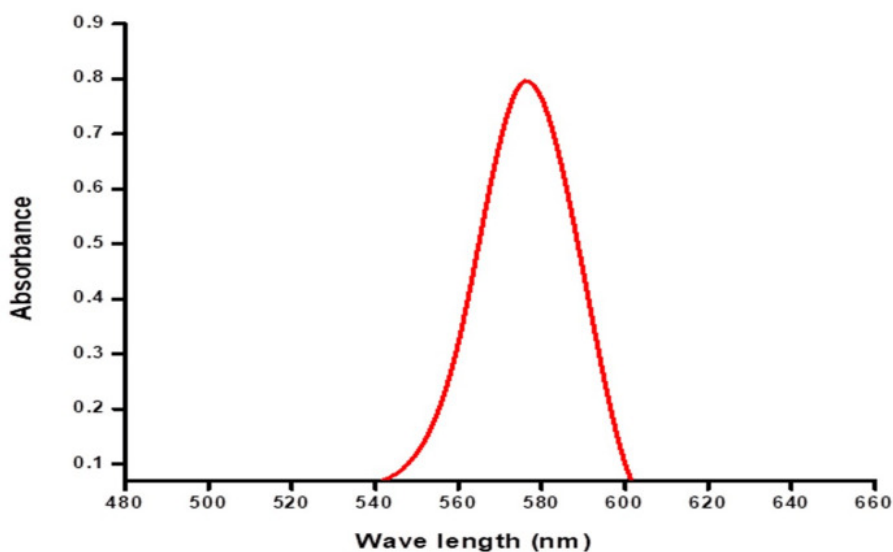


Рис.3.2. УФ-видима спектроскопія наночастинок міді з *Ulva lactuca*

3.1.3. Оцінка результатів синтезу наночастинок оксиду міді шляхом біосинтезу екстракту біомаси водоростей

Оскільки екстракт водоростей містить численні фенольні та флавоноїдні сполуки, а також вторинні метаболіти, його здатність відновлювати сполуки міді до наночастинок зростає. Основним відновником в екстракті водоростей для створення CuO НЧ можуть бути сполуки, які мають декілька функціональних груп, такі як хлорогенова кислота та кверцетин. Тому біомасу водоростей піддали синтезу CuO НЧ. УФ-видима спектроскопія показала максимальний пік поглинання при 250 нм. Їх поверхневий плазмонний резонанс при різних температурах вказує на те, що біомаса водоростей здатна створювати CuO НЧ при підвищених температурах (рис. 3.3.).

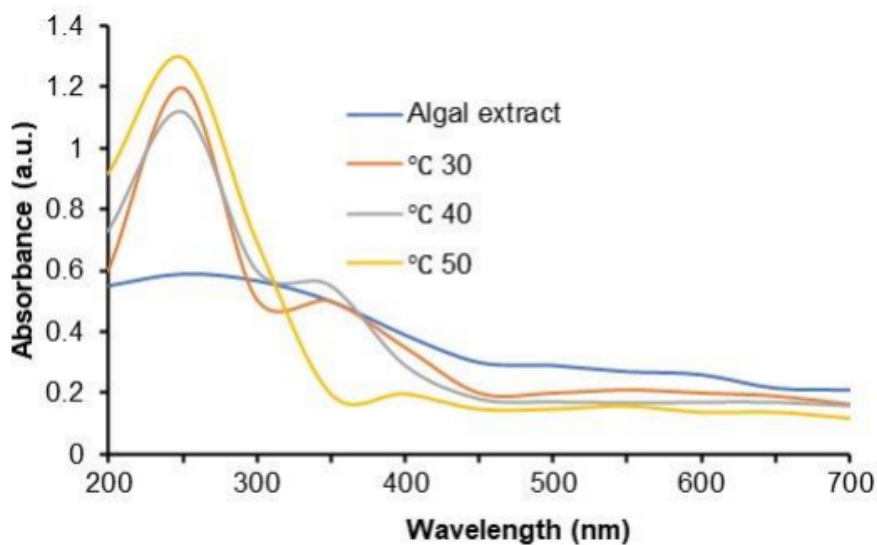


Рис.3.3. Піки поглинання зелених синтезованих CuO НЧ за допомогою спектрофотометра UV-Vis

УФ-спектр порівнювали з біомасою водоростей без додавання солі міді. Спостереження авторів узгоджується з іншими дослідженнями щодо створення CuO НЧ водоростями, які показують, що пік CuO НЧ був при 247 нм. Розмір і морфологію створених CuO НЧ було охарактеризовано за допомогою ПЕМ (рис. 3.4). CuO НЧ з'явилися в сферичній формі (середній розмір від 5 до 17 нм). Дисперговані НЧ були оточені кришкою активними метаболітами водоростей.

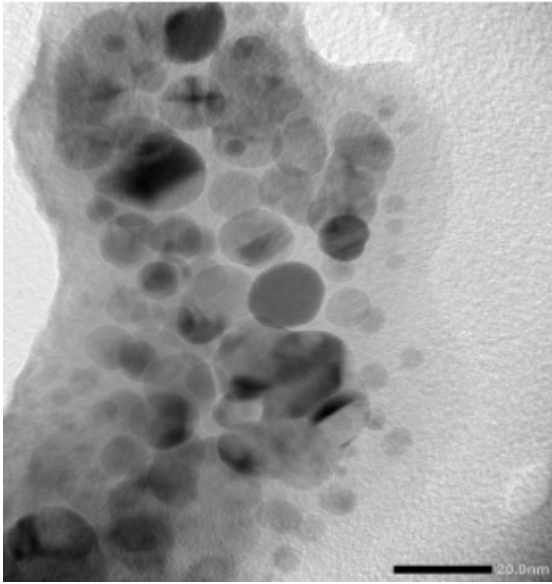


Рис. 3.1.4. ТЕМ-мікрофотографія створених НЧ Cu біомасою водоростей

022 відповідно. Кристалом мінералу був CuO кристалічної форми тенориту. Таким чином, усі спостережувані піки були подібні до тих, про які повідомляв об'єднаний комітет із стандартів порошкової дифракції (JCPDS) CuO-НЧ зі стандартною карткою JCPDS, файл №: 01-1117. Таким чином, результати однозначно підтверджують синтез CuO НЧ. Дифрактограма CuO НЧ не виявляє присутності будь-яких інших домішок, що гарантує, що отримані CuO НЧ були чистими та узгоджувалися з іншими дослідженнями.

Сполуки міді раніше застосовувалися як добриво та фунгіцид, і кілька досліджень показують, що НЧ CuO у певних концентраціях не є токсичними та ефективно пригнічують розвиток хвороб у рослин. Поточне дослідження відображало вплив CuO НЧ на фітопатогенні (*C. lunata* і *F. oxysporium*), мікотоксикогенні (*A. flavus* і *A. terreus*) і біозастосовні (*M. anisopliae* і *T. harzianum*) гриби порівняно з мідно-ацетатними, водоростями. екстракт і хімічний фунгіцид. Ріст усіх досліджуваних грибів зменшувався зі збільшенням концентрації НЧ CuO та фунгіциду, де при 50 мг діаметр колонії становив 4,02

Кристалічна структура НЧ CuO була підтверджена за допомогою XRD-аналізу, як показано на рис. Первинні сильні кути на дифрактограммі біосинтезованих CuO НЧ були видні на XRD-схемах, показуючи, що НЧ CuO були кристалографічними за своєю природою. На малюнку 1 показано дифракційні піки XRD для НЧ CuO, а також дифракційні характеристики щодо 2θ при $33,8^\circ$, $35,5^\circ$, $37,9^\circ$, $48,1^\circ$, $51,6^\circ$, $61,01^\circ$ та $66,2^\circ$, які представляють відображення Бреґґа при 110, 111, - 111, -202, 020, -113 і

$\pm 0,08$, $5,92 \pm 0,11$, $4,50 \pm 0,08$, $7,10 \pm 0,04$, $4,78 \pm 0,04$ і $3,87 \pm 0,03$ см; тоді як при 200 мг діаметр колонії становив $1,84 \pm 0,08$, $1,97 \pm 0,03$, $1,00 \pm 0,08$, $2,04 \pm 0,03$, $2,32 \pm 0,06$ і $2,42 \pm 0,05$ см *M. anisopliae*, *T. harzianum*, *C. lunata*, *F. oxysporium*, *A. flavus* і *A. terreus* відповідно. Хімічний фунгіцид продемонстрував більшу інгібіторну дію, ніж НЧ CuO. Навпаки, екстракт водоростей виявляв стимулюючу дію на ріст усіх досліджуваних грибів у дозах 50 і 100 мг, але при високій концентрації 200 мг продемонстрував незначне інгібування грибів порівняно з контролем [56].

3.1.4. Оцінка результатів синтезу наночастинок оксиду міді з використанням екстракту *Anabaena cylindrica*

Охарактеризовано синтезовані наночастинки при рН 8,2 з використанням 5 г/100 мл екстракту водоростей, швидкості перемішування 900 об/хв та концентрації 1 мМ Cu²⁺. Наночастинки мали середній розмір приблизно 3,6 нм (рис. 3.5) і площу поверхні 23,4 м²/г.

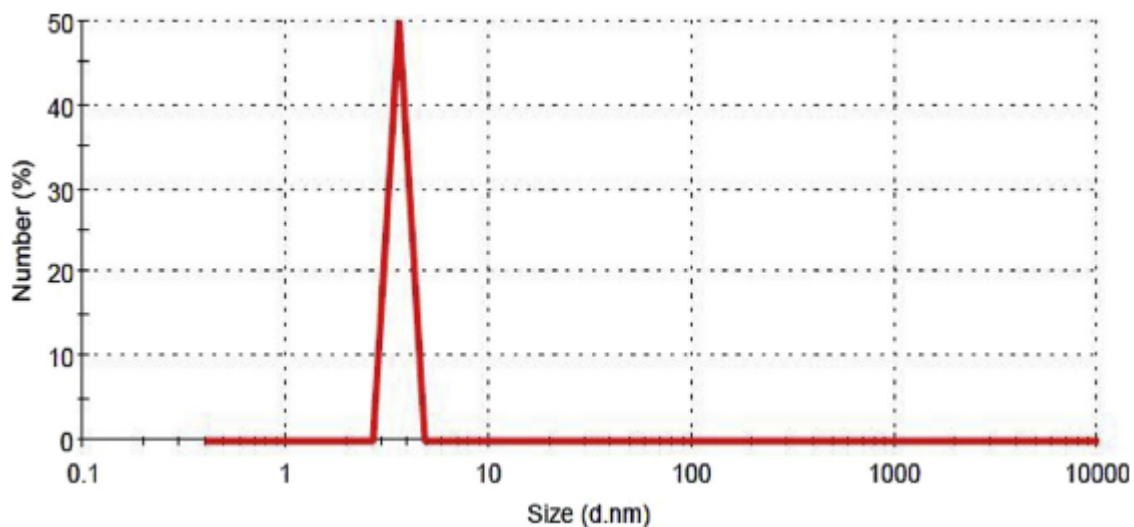


Рис. 3.5. Аналіз розміру частинок НЧ CuO (синтезованих з використанням оптимізованих умов 1 мМ Cu²⁺, рН-8,2, доза водоростей - 5 г/100 мл і 900 об/хв).

На рис. 3.6 рентгенограма металевих наночастинок показала, що положення піків при 32,3°, 35,7°, 38,6° і 48,8° відповідають моноклінній фазі

оксиду міді (CuO, JCPDS-80-1916), що розвивається при швидкості перемішування 500, 700 і 900 об/хв відповідно. Піки при 28° відповідали кремнію, отриманому з кварцового тримача зразка, який використовувався в інструменті XRD. Піки при 29° відповідали площині (110), що виключає можливе існування Cu_2O в наночастинці. Найбільш інтенсивний пік відповідав напрямку (-111), який показує кращу орієнтацію кристалів оксиду міді. Пік, що відповідає $19,2^\circ$, може бути наслідком домішок, утворених неперетвореним комплексом міді з органічною речовиною водоростей (АОМ) або позаклітинними полімерними сполуками (ЕРС). Зі збільшенням швидкості перемішування кількість неперетвореного комплексу міді зменшилася, що призвело до зниження пікової інтенсивності при 900 об/хв. Можна також припустити, що цей пік представляє целюлозні волокна, присутні в біомасі водоростей. Пік при 34° представляє целюлозні нановолокна біомаси.

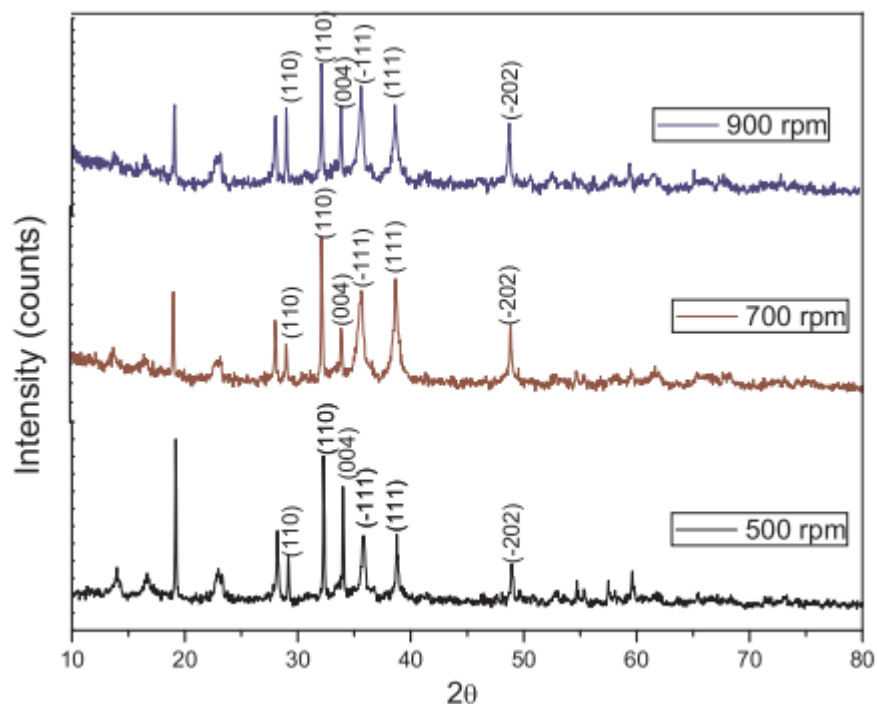


Рис. 3.6. XRD НЧ CuO при різних обертах на хвилину (1 мМ Cu^{2+} , рН-8,2, доза водоростей - 5 г/100 мл).

Було також помічено, що зі збільшенням швидкості перемішування переважна орієнтація площини (110) зменшувалася, а також розмір частинок

зменшувався зі збільшенням швидкості обертання. Це могло бути пов'язано з тим, що висока швидкість перемішування дестабілізувала ріст кристалів у певній площині, а також обмежувала ріст кристалів, що призводило до меншого розміру частинок. Середній розмір кристалітів, розрахований для наночастинок CuO при 500 об/хв, становив близько 30 нм, який зменшився до 25 нм при 700 об/хв. При ще вищій швидкості обертання, тобто 900 об/хв, отриманий середній розмір кристалітів становив приблизно 6 нм. Слід зазначити, що розмір частинок (d50), отриманий для цього зразка, становив близько 3,6 нм, що могло бути пов'язано з осіданням деяких більших частинок через броунівський рух.

Протимікробну активність НЧ CuO спостерігали проти грамнегативних бактерій *Escherichia coli*. Результати показали, що НЧ CuO були ефективними проти *E. coli*, проявляючи антимікробну активність. Було виявлено, що МІК ампіциліну становила 40 мкг/мл, тоді як МВС становила 60 мкг/мл. Але для поживного бульйону, що містить НЧ CuO, МІК розраховували як 20 мкг/мл, а отриманий МБК становив 40 мкг/мл. Ріст бактерій із застосуванням дози 40 мкг/мл НЧ CuO призводив до зони інгібування (ZOI) приблизно 4,5 мм + 0,7. МІК і МБК для НЧ CuO з розміром частинок 5–10 нм повинні становити 20 мкг/мл і 50 мкг/мл відповідно. Антимікробну дію наночастинок можна пояснити поверхневою адсорбцією іонів металів у бактеріальних клітинах, що призводить до руйнування цитоплазми та спричинення загибелі клітин. Активність залежить від концентрації наночастинок і початкової концентрації бактеріальної клітини. Було також заявлено, що антибактеріальна властивість НЧ CuO була зумовлена поверхневою адгезією на стінці бактеріальної клітини в результаті протилежних електричних зарядів. Антибактеріальна властивість наночастинок Cu пояснюється головним чином адгезією з бактеріями через їхні протилежні електричні заряди. Негативно заряджені пептидоглікани, присутні в бактеріальній клітині, роблять грамнегативні бактерії більш чутливими до позитивно заряджених НЧ CuO.

Після обробки оптимізованою дозою НЧ CuO, тобто 40 мкг/мл, повне видалення патогенів спостерігалось протягом 30 хвилин після контакту (рис. 3.7). Було помічено, що зменшення кількості колоній було отримано протягом 5 хвилин після контакту з НЧ, що призвело до відсутності утворення колоній протягом 30 хвилин. Аналіз найбільш вірогідного числа бактерій показав 50 колоній/100 мл через 5 хвилин і відсутність колоній через 30 хвилин [57].

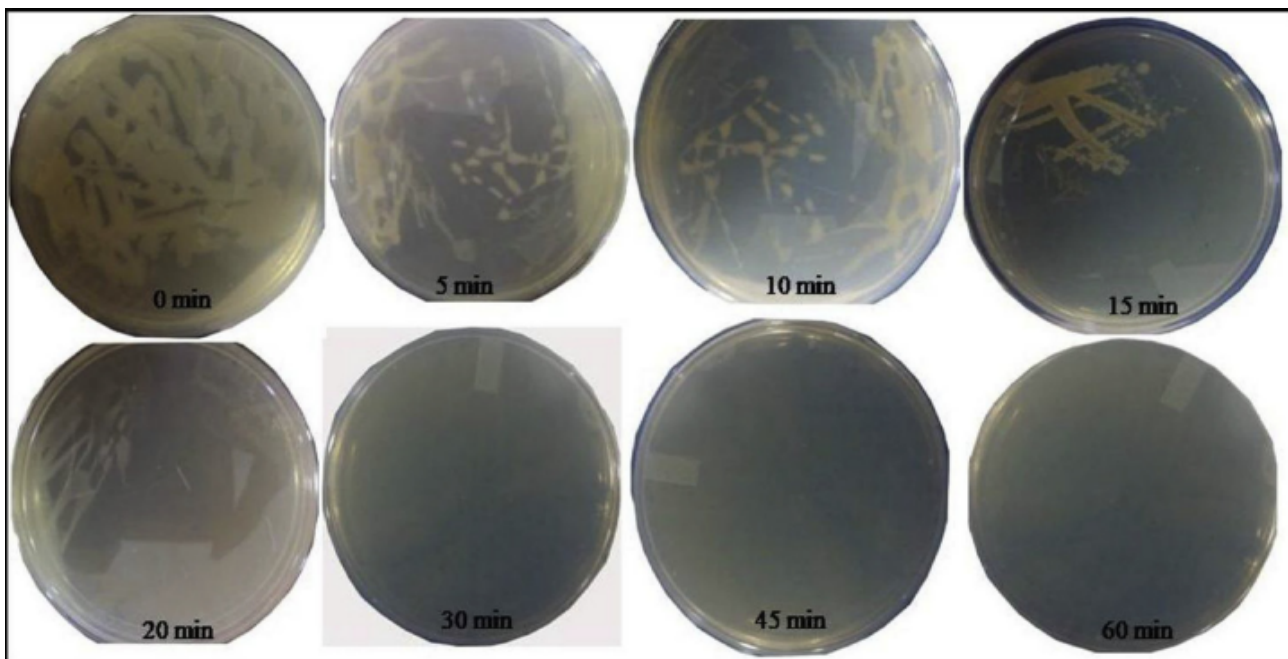


Рис. 3.7. Зростання *Escherichia coli* без часу в присутності НЧ CuO. (синтезовано з використанням оптимізованих умов 1 mM Cu²⁺, pH-8,2, доза водоростей - 5 г/100 мл і 900 об/хв).

3.1.5. Результати синтезу наночастинок міді за допомогою екстракту зеленої водорості *Botryococcus braunii*

У цьому дослідженні використовували зелену водорість *Botryococcus braunii* для біогенного синтезу наночастинок міді та срібла. Синтезовані наночастинок міді досліджували на антимікробну активність проти бактеріальних та грибкових видів. Синтезовані металеві наночастинок спочатку

були підтверджені візуальним спостереженням як зміна кольору. Крім того, УФ-видимі спектри регулярно використовуються для характеристики біогенно синтезованих наночастинок. Явище поверхневого плазмонного резонансу забезпечує зручний підпис для вказівки на утворення наночастинок міді шляхом зміни кольору в реакційній суміші. Водний екстракт зеленої водорості *B. braunii* додавали у водний розчин ацетату міді для наночастинок міді. Утворення наночастинок міді характеризувалося зміною кольору від світло-блакитного до темно-коричневого за допомогою засобів візуального спостереження, що вказує на відновлення іонів міді у відповідні наночастинки. У цьому процесі відновлення металеві наночастинки розсіюють і поглинають світло на певній довжині хвилі через резонансні збудження щільності заряду на межі розділу між провідником та ізолятором, явище, яке називається поверхневим плазмонним резонансом.

Мікрофотографії СЕМ показали морфологію біогенно синтезованих металевих наночастинок. Крім того, було виявлено, що ці біосинтезовані наночастинки є високотоксичними проти двох грамнегативних бактеріальних штамів *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 441) та *Escherichia coli* (MTCC 442), двох грампозитивних бактеріальних штамів *Klebsiella pneumoniae* (MTCC 109) і *Staphylococcus aureus* (MTCC 96), та штам грибка *Fusarium oxysporum* (MTCC 2087). Зону інгібування вимірювали методом чашки з лунками з агаром, і, крім того, мінімальну інгібіторну концентрацію визначали за допомогою аналізу розведення бульйону [59].

3.1.6. Результат синтезу наночастинок оксиду міді за допомогою *Phormidium cyanobacterium*

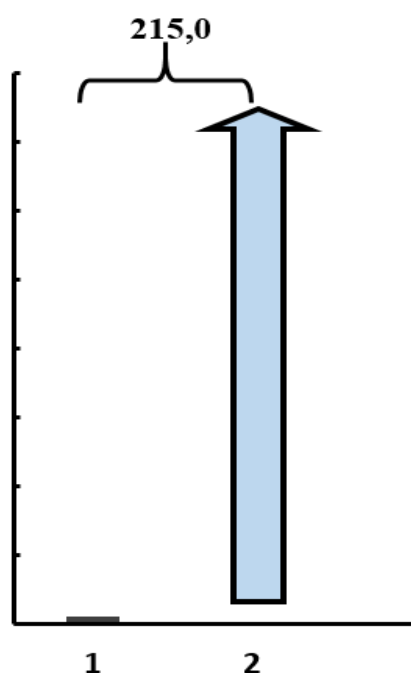
Синтез наночастинок оксиду міді відбувається шляхом позаклітинного гідролізу катіонної міді певними хелатоподібними металами аніонними білками/редуктазою, що виділяються бактеріями в простих експериментальних

умовах, таких як аеробне середовище, нейтральний рН і кімнатна температура. Білки не тільки відновлюють Cu (II) до наночастинок оксиду міді, але також відіграють значну роль у стабілізації утворених наночастинок при кімнатній температурі. Подальші аналізи підтвердили синтез наночастинок мікробним шляхом. Позаклітинну індукцію металохелатуючих білків/редуктази аналізували за допомогою SDS-PAGE [60].

3.2. Оцінка результатів власних досліджень

3.2.1. Дослідження вмісту іонів міді у двох культурах мікроводоростей

D.v.S. і D.v.R



У клітинах D.v-Cu.S, які вирощуються в стандартних умовах на середовищі Артарі, виявлено присутність 0,15 мікрограм міді на мільйон клітин, що відповідає фізіологічному рівню для цих мікроводоростей. У клітинах D.v-Cu.R, які адаптовані до росту на середовищі з іонами міді та культивуються протягом понад 25 років на середовищі Артарі з додатковим внесенням 75 міліграм сірчаноокислої міді на літр, було виявлено присутність 32,3 мікрограм міді на мільйон клітин, що є в 215 разів вищим порівняно з D.v-Cu.S.

Рис. 3.8. Кількість іонів (рис.3.8).

міді (мкг в 10^6) в клітинах D.v-Cu.S (1) і D.v-Cu.R (2) культур мікроводоростей.

З метою дослідження впливу попередньої адаптації клітин мікроводоростей до сірчаноокислої

міді на подальшу індукцію утворення наночастинок міді до біомаси клітин ($2,0 \times 10^9$) двох культур мікроводоростей (після гомогенізації) вносили по 7 г/л сірчаноокислої міді. Виявили, що з біомасою D.v-Cu.S зв'язувалося 443 мкг іонів

міді на мл біомаси, а з такою самою кількістю біомаси *D.v-Cu.R* зв'язувалося 966 мкг., тобто різниця становила 2,2 раза. Тобто кількість міді в біомасі *D.v-Cu.S* збільшувалась у 2950 разів порівняно з кількістю міді в цих клітинах до внесення сірчаної кислоти міді, для біомаси *D.v-Cu.R* це збільшення становило у 29 разів порівняно з вихідним рівнем. Отже, біомаса *D.v-Cu.R* зв'язувала у 100 разів менше міді порівняно з біомасою *D.v-Cu.S* за однакових умов.

На наступному етапі біомаси двох культур мікроводоростей розділили на два варіанти (рис. 3.9).

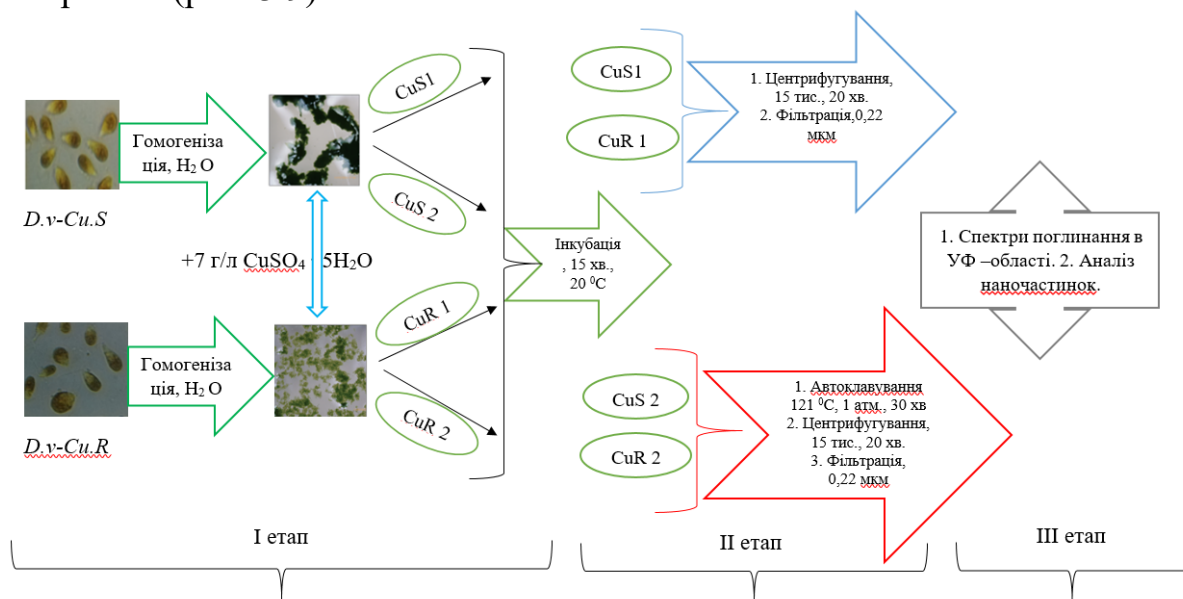


Рис. 3.9. Схема, яка демонструє етапи підготовки зразків і методи аналізу наночастинок у досліджуваних зразках.

На I етапі клітини руйнувалися, і до отриманої біомаси (кількість клітин двох штамів у суспензії була однаковою - $2,0 \times 10^9$ і об'єм клітинних суспензій був вирівняний) додатково вносили по 7 г/л сірчаної кислоти міді з подальшою інкубацією. На II етапі *D.v-Cu.S* і *D.v-Cu.R* розділяли на два варіанти: 1) зразки центрифугували і фільтрували, 2) автоклавували, а потім центрифугували і фільтрували. На III етапі в досліджуваних зразках визначали спектри поглинання в УФ-області та проводили аналіз наночастинок.

3.2.2. Дослідження спектральної характеристики в УФ-області зразків D.v-Cu.S і D.v-Cu.R, отриманих у нативних умовах і після термообробки

Отримані результати вказують на те, що в ультрафільтраті вихідної культури D.v.S. (матеріал, що проходив через мембрани в 0,22 мкм), куди вносили до біомаси мікроводоростей 7 г/л сірчаноокислої міді, була присутня досить велика кількість амінокислот, пептидів та невелика кількість білків з молекулярною масою меншою за 10 кДа.

У тому випадку, якщо ультрафільтрат було отримано з культури D.v.R, яка виявляла резистентність до сірчаноокислої міді, і до біомаси цих клітин так само вносили 7 г/л сірчаноокислої міді, то він був оптично «порожнім», тобто в ньому були відсутні речовини, що поглинали в ультрафіолетовій частині спектра (рис.3.10А).

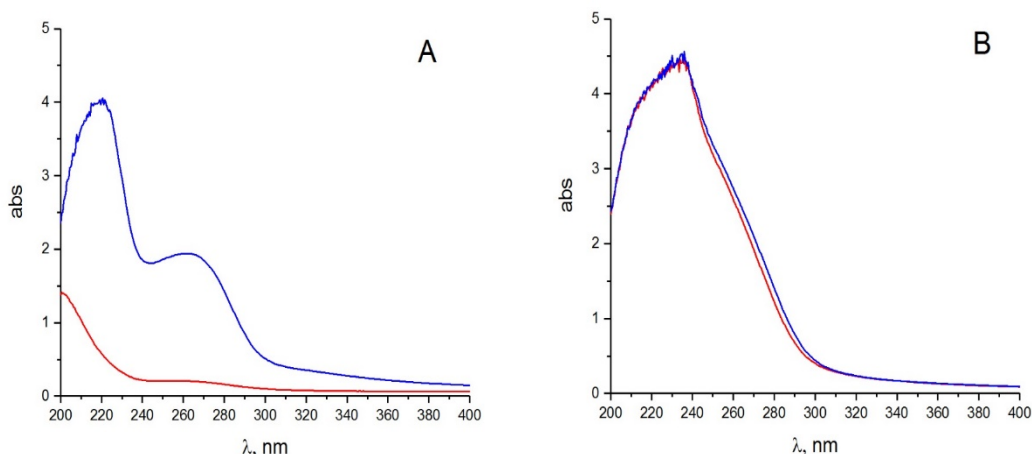


Рис.3.10. Спектри поглинання ультрафільтратів D.v.S. (синій колір) і D.v.R. (червоний) отриманих у нативних умовах (А) і після попередньої термообробки біомаси (В). Представлено типові варіанти.

Можна припустити, що іони міді в біомасі D.v.R формували значно більшу кількість високомолекулярних комплексів між амінокислотами і білками і що ці металопротеїни мають молекулярні маси більші ніж 10 кДа та, як наслідок, затримувались на фільтрах з діаметром пор 0,22 мкм, порівняно з біомасою D.v.S.

Виявили, що після термічної обробки біомаси мікроводоростей D.v.S змінювалися спектральні характеристики зразків (рис. 3.10B). У таких зразках був присутній тільки один пік поглинання з максимумом при 240 нм. Ці результати вказують на те, що частина високомолекулярних білків осідає після денатурації, а частина білків піддається гідролізу, про що свідчить збільшення поглинання при 240 нм. На користь того, що білки піддаються гідролізу, свідчать результати за спектральною характеристикою зразків, отриманих для мікроводоростей D.v.R. (рис.3.10B). У тому разі, якщо біомасу D.v.R. до центрифугування та ультрафільтрації піддавали термообробці з подальшим центрифугуванням і ультрафільтрацією, то їхня оптична щільність не відрізнялася від такої D.v.S (рис. 3.10B).

Насамкінець зазначимо, що термообробка (121 °C за 1 атм протягом 30 хв) супроводжувалася гідролізом щонайменше частини білків, а отже, збільшенням кількості амінокислот та/або коротких пептидів, і цей процес деградації був однаковий для біомаси клітин D.v.S і D.v.R.

3.2.3. Дослідження спектральної характеристики та наявності наночастинок в ультрафільтратах D.v.S. і D.v.R., отриманих у нативних умовах

На наступному етапі роботи визначали наявність і характеристики наночастинок у досліджуваних ультрафільтратах. Виявили, що в ультрафільтраті нативних D.v.S були присутні досить великі частинки діаметром 4712 нм (близько 12 % і понад 80 % частинки з діаметром 1066 нм (рис. 3.11).

Sample Name: S1/1 Average
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Copper NP.dts
Record Number: 51
Material RI: 0,25
Material Absorbtion: 0,001
Dispersant Name: CuSO4(0.024M)
Dispersant RI: 1,331
Viscosity (cP): 0,8968
Measurement Date and Time: 9 мая 2024 г. 12:00:40

Temperature (°C): 25,0
Count Rate (kcps): 139,8
Cell Description: Disposable sizing cuvette
Duration Used (s): 80
Measurement Position (mm): 1,05
Attenuator: 7

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 1148	Peak 1: 1066	87,1	537,8
Pdl: 0,390	Peak 2: 4712	12,9	828,8
Intercept: 0,963	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good

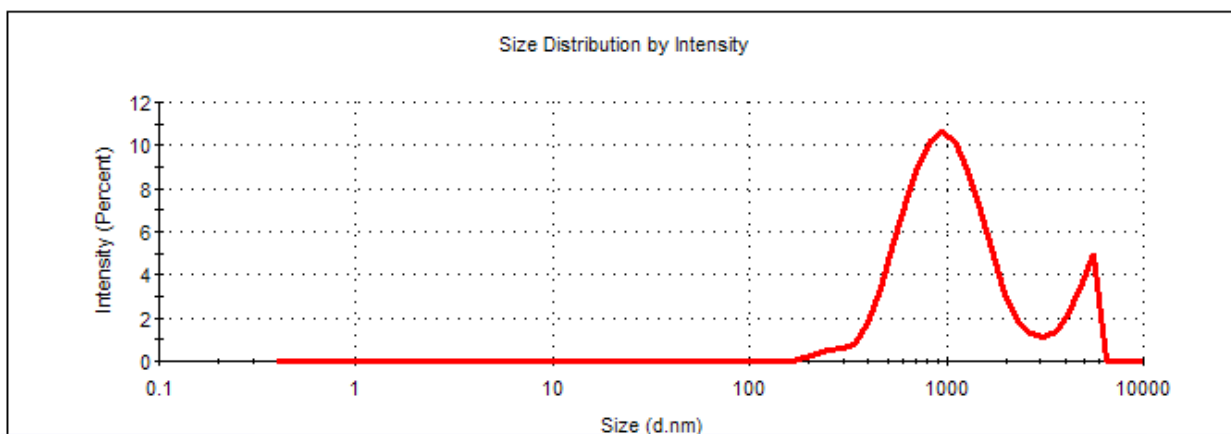


Рис. 3.11. Типова (усереднена) характеристика спектра розподілу частинок за розміром, що були присутні в зразках D.v.S, отриманих за дотримання нативних умов обробки біомаси мікроводоростей.

Разом з тим, наявність досить великої кількості крупних частинок ймовірно білкової природи призводять до поганої відтворюваності результатів і не дає змоги визначити наявність та дати об'єктивні характеристики наночастинок.

Необхідно зазначити, що у зразках «нативних» D.v.S спостерігалась незадовільна відтворюваність результатів (рис.3.12) і відповідно розбіжність автокореляційної функції (рис.3.13), а також нестабільність сигналу на детекторі, що зазвичай вказує на наявність крупних частинок - домішок.

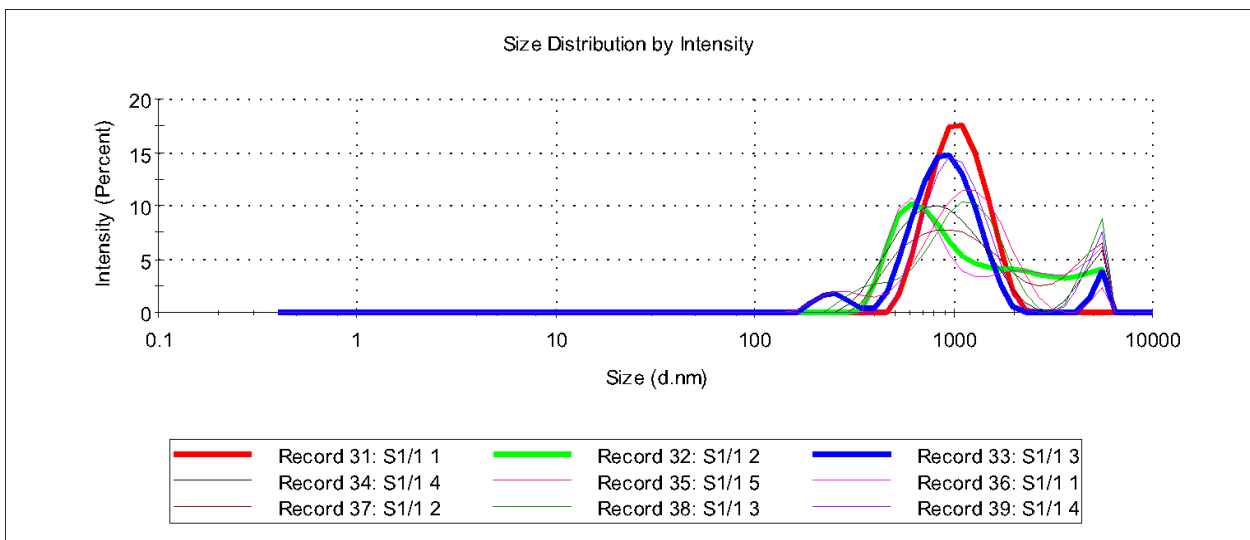


Рис.3.12. Спектри розподілу частинок за розміром, що були отримані з одного зразку D.v.S за умов дотримання нативних умов обробки біомаси мікрободоростей та вимірювалися не менше 10 разів.

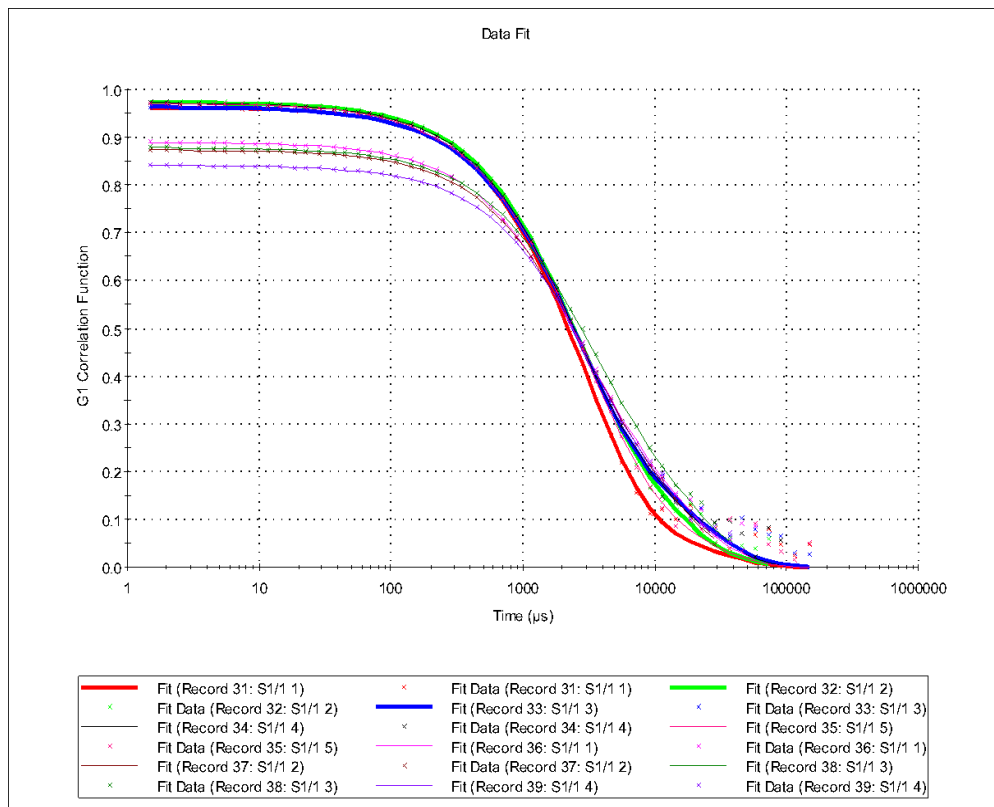


Рис.3.13. Автокореляційна крива для зразків D.v.S, що були отримані за дотримання нативних умов обробки біомаси мікрободоростей.

Отже, в «ультрафільтраті» мікрководоростей D.v.S, що був отриманий після внесення сірчаноокислої міді в концентрації 7 г/л, в якому була присутня досить велика кількість пептидів з молекулярною масою не більше 10 кДа, виявлялися великі частинки (від 1066-4712 нм), що не давало змоги визначити наявність і відповідно надати характеристики наночастинок. Можна припустити, що ці великі частинки являють собою металопротеїни.

У той же час, в «ультрафільтраті» D.v.R, який також було отримано в «нативному» варіанті, і в якому були відсутні білки, виявляли частинки зі значно меншим діаметром 682 нм (на їхню частку припадало близько 80%) та частинки з діаметром близько 173 нм (19%) (рис. 3.14).

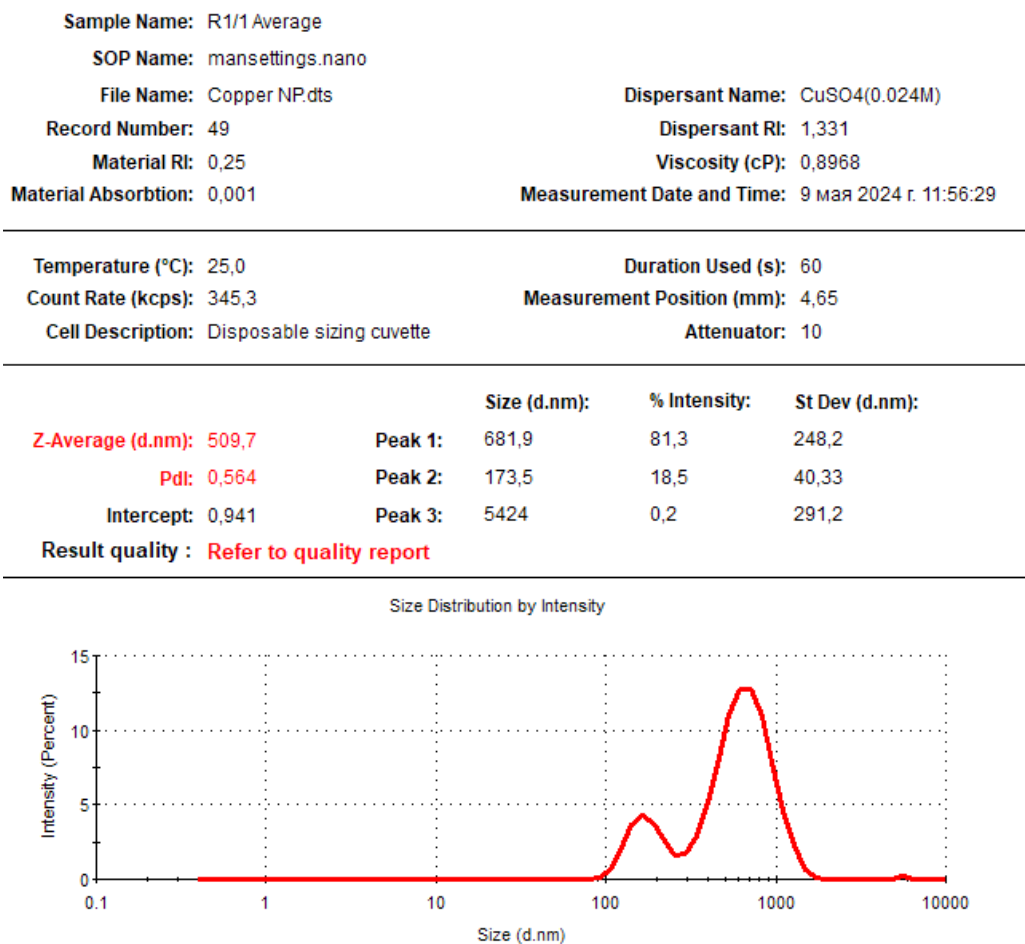


Рис. 3.14. Типова (усереднена) характеристика спектра розподілу частинок за розміром, що були присутні в зразках D.v.R, які були отримані при дотриманні нативних умов обробки біомаси мікрководоростей.

Необхідно зазначити, для варіанту зразків D.v.R мала місце задовільна відтворюваність результатів (рис.3.15) і відносно непоганий збіг автокореляційної функції (рис. 3.16).

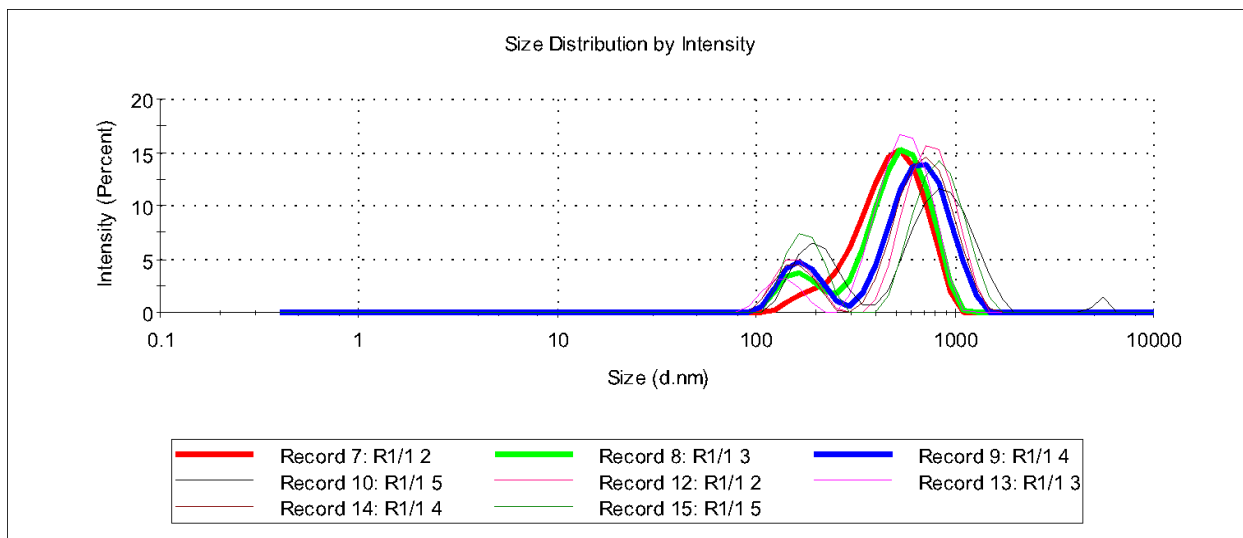


Рис.3.15. Спектри розподілу частинок за розміром, що були отримані з одного зразку D.v.R за умов дотримання нативних умов обробки біомаси мікроводоростей та вимірювалися не менше 10 разів.

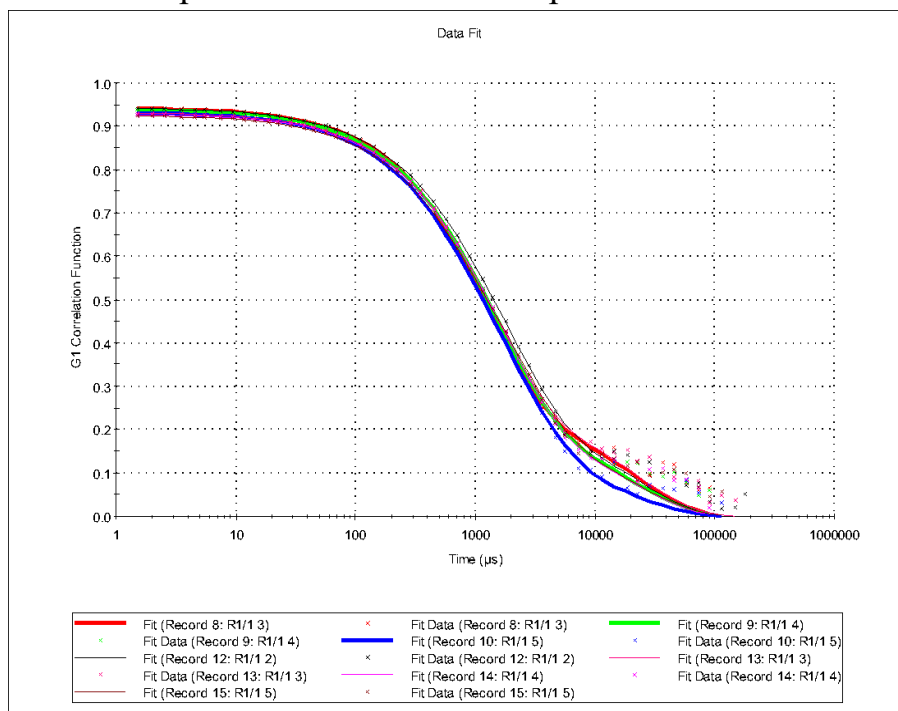


Рис.3.16. Автокореляційна крива для зразків D.v.R, що були отримані за дотримання нативних умов обробки біомаси мікроводоростей.

Отже, для зразків, отриманих у «нативному» варіанті, у культури D.v.R, що була резистентною до дії сірчаноокислої міді, характеризувалася наявністю відносно великої кількості іонів міді у клітинах до внесення додаткової великої кількості (7 г/л) сірчаноокислої міді та у зразках, що практично не містили білків, виявлялися частки із значно меншими розмірами, порівняно з клітинами культури D.v.S.

Ці результати дають змогу зробити висновок: по-перше, культура D.v.R. характеризується істотними відмінностями від культури D.v.S. за структурними характеристиками за відносної схожості їхніх функціональних особливостей (проліферативної активності та морфологічних характеристик); по-друге, наявність білка в досліджуваних зразках є методичним обмеженням при визначенні наявності наночастинок методом DLS.

У зв'язку з цим, у наступній серії експериментів було змінено метод отримання зразків, суть якого полягала в тому, що біомасу клітин, збагачену іонами міді, піддавали обробці при високій температурі (121 °C. за тиску 1 атм. протягом 30 хв.

3.2.4. Дослідження спектральної характеристики та наявність наночастинок в ультрафільтрах D.v.S. і D.v.R. отриманих після термообробки

Виявили, що відтворюваність результатів як для зразків D.v.S. так і для зразків D.v.R. була задовільною.

Так у зразках D.v.S. були присутні частинки з діаметром 163 нм і на їхню частку припадало 96% і близько 4% припадало на частинки з діаметром 27 нм (рис. 3.17).

Sample Name: S2/1 Average
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Copper NP.dts
Record Number: 52
Material RI: 0,25
Material Absorbtion: 0,001
Dispersant Name: CuSO4(0.024M)
Dispersant RI: 1,331
Viscosity (cP): 0,8968
Measurement Date and Time: 9 мая 2024 г. 12:01:00

Temperature (°C): 25,0
Count Rate (kcps): 153,8
Cell Description: Disposable sizing cuvette
Duration Used (s): 80
Measurement Position (mm): 4,65
Attenuator: 7

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 118,3	Peak 1: 163,6	96,2	79,73
Pdl: 0,264	Peak 2: 27,38	3,8	6,619
Intercept: 0,977	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good

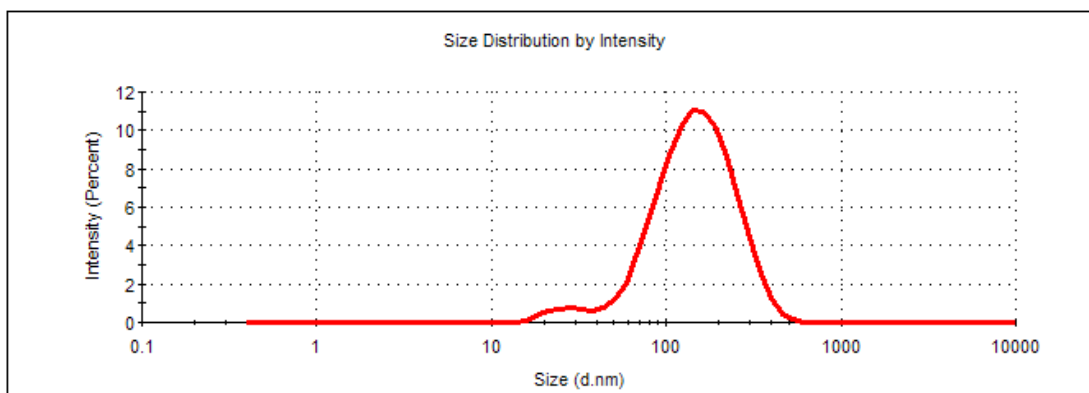


Рис. 3.17. Типова (усереднена) характеристика спектра розподілу частинок за розміром, що були присутні в зразках D.v.S отриманих після термообробки (121 °С, 1 атм. протягом 30 хв.) біомаси мікрободоростей.

У зразках D.v.R були присутні частинки з діаметром 146 нм і на їхню частку припадало 99%, і тільки 0,1% було частинок з діаметром 6 нм (рис. 3.18).

Sample Name: R2/1 Average	Dispersant Name: CuSO4(0.024M)
SOP Name: mansettings.nano	Dispersant RI: 1,331
File Name: Copper NP.dts	Viscosity (cP): 0,8968
Record Number: 50	Measurement Date and Time: 9 мая 2024 г. 12:00:23
Material RI: 0,25	
Material Absorbtion: 0,001	

Temperature (°C): 25,0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 384,0	Measurement Position (mm): 1,25
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 8

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 110,3	Peak 1: 146,1	99,9	72,83
Pd: 0,241	Peak 2: 6,450	0,1	1,517
Intercept: 0,948	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good

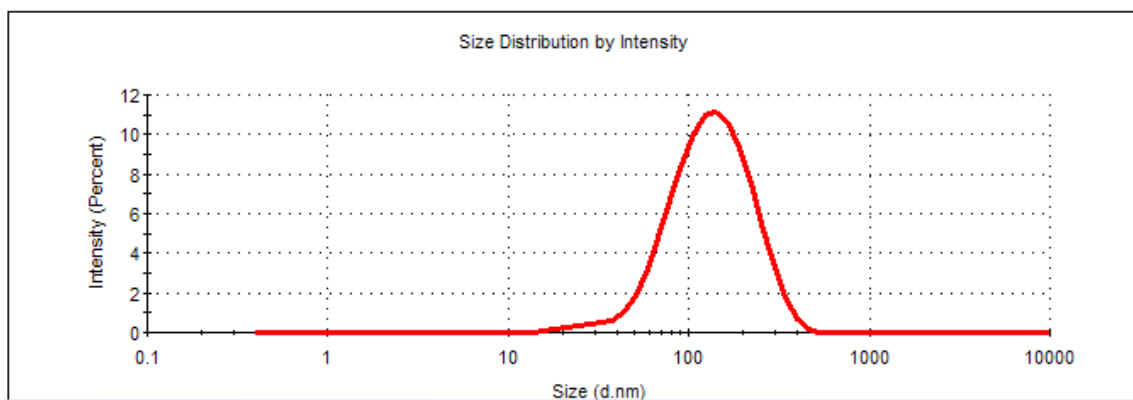


Рис. 3.18. Типова (усереднена) характеристика спектра розподілу частинок за розміром, що були присутні в зразках D.v.R отриманих після термообробки (121 °С, 1 атм. протягом 30 хв.) біомаси мікроводоростей.

Отже, термічна обробка зразків за високого тиску дала змогу отримати задовільні результати щодо відтворюваності характеристик наночастинок у біологічних зразках мікроводоростей, водночас розмірні характеристики цих частинок були різними для варіантів D.v.S. і D.v.R.

За використання методу термообробки виходили з того, що висока температура під тиском призводить до термокоагуляції білків і в такий спосіб білки, що мають відносно більші розміри порівняно з наночастинками міді, буде видалено, а отже, цей прийом дасть змогу визначити наявність наночастинок міді у зразках.

ВИСНОВКИ

1. Визначення наявності наночастинок у біомасі мікроводоростей методом DLS ускладнене через велику наявність частинок великого розміру (білків) навіть після мембранного фільтра 0,22 мкм.
2. У нативних умовах наночастинок, отримані у D.v.R, відрізнялися за розміром і відтворюваністю від D.v.S.
3. Наночастинок, отримані в культурі D.v.S. у режимі термообробки, мали більші розміри порівняно з D.v.R.
4. Склад ультрафільтрату (0,22 мкм) у D.v.R. і D.v.S сильно відрізнявся. В ультрафільтраті D.v.R. були відсутні білки та амінокислоти.
5. Термообробка (121 °C, 1 атм. протягом 30 хв.) D.v.R. і D.v.S супроводжувалася гідролізом білків рівною мірою.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Hasan, Saba. (2015). A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types. 4. 1-3.
2. Environment, A. A. (2009). Particulate matter and ozone assessment for Alberta: 2001-2007. *Alberta Environment*.
3. Cho, E. J., Holback, H., Liu, K. C., Abouelmagd, S. A., Park, J., & Yeo, Y. (2013). Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. *Molecular Pharmaceutics*, 10(6), 2093–2110. <https://doi.org/10.1021/mp300697h>
4. Jangid, P., & Prabhu Inbaraj, M. (2021). Applications of nanomaterials in wastewater treatment. *Materials Today: Proceedings*, 43, 2877–2881. doi:10.1016/j.matpr.2021.01.126
5. Salavati-Niasari, M., Davar, F., & Mir, N. (2008). Synthesis and characterization of metallic copper nanoparticles via thermal decomposition. *Polyhedron*, 27(17), 3514–3518. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2008.08.020>
6. Tai, C.Y., Tai, C., Chang, M., & Liu, H. (2007). Synthesis of Magnesium Hydroxide and Oxide Nanoparticles Using a Spinning Disk Reactor. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46, 5536-5541.
7. Bhaviripudi, S., Mile, E., Steiner, S. A., 3rd, Zare, A. T., Dresselhaus, M. S., Belcher, A. M., & Kong, J. (2007). CVD synthesis of single-walled carbon nanotubes from gold nanoparticle catalysts. *Journal of the American Chemical Society*, 129(6), 1516–1517. <https://doi.org/10.1021/ja0673332>
8. Krishnappa, K., Pandiyan, J., Paramanandham, J., & Elumalai, K. (2018). Antibacterial and mosquitocidal potentials of selected Indian medicinal plants extracts and synthesized silver nanoparticles. *Int J Zool Studies*, 3, 15-5.
9. Winterer, M., & Hahn, H. (2022). Nanoceramics by chemical vapour synthesis. *International Journal of Materials Research*, 94(10), 1084-1090.

10. Konrad, A., Herr, U., Tidecks, R., Kummer, F., & Samwer, K. (2001). Luminescence of bulk and nanocrystalline cubic yttria. *Journal of applied Physics*, 90(7), 3516-3523.
11. Rastogi, A. (2017). A mini review practice of formulations of nanoparticles. *International Journal of Chemical Synthesis and Chemical Reactions*, 3(2), 1-7.
12. Dikumar, A. I., Globa, P. G., Belevskii, S. S., & Sidel'nikova, S. P. (2009). On limiting rate of dimensional electrodeposition at meso-and nanomaterial manufacturing by template synthesis. *Surface Engineering and Applied Electrochemistry*, 45, 171-179.
13. Ponon, N. K., Appleby, D. J., Arac, E., King, P. J., Ganti, S., Kwa, K. S., & O'Neill, A. (2015). Effect of deposition conditions and post deposition anneal on reactively sputtered titanium nitride thin films. *Thin Solid Films*, 578, 31-37.
14. Patscheider, J. (2003). Nanocomposite hard coatings for wear protection. *MRS bulletin*, 28(3), 180-183.
15. Guler, U., Shalaev, V. M., & Boltasseva, A. (2015). Nanoparticle plasmonics: going practical with transition metal nitrides. *Materials Today*, 18(4), 227-237.
16. Dong, S., Chen, X., Gu, L., Zhang, L., Zhou, X., Liu, Z., ... & Cui, G. (2011). A biocompatible titanium nitride nanorods derived nanostructured electrode for biosensing and bioelectrochemical energy conversion. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(10), 4088-4094.
17. Boddolla, S., & Thodeti, S. (2018). A review on characterization techniques of nanomaterials. *International Journal of Engineering, Science and Mathematics*, 7(1), 169-175.
18. Dikumar, A. I., Globa, P. G., Belevskii, S. S., & Sidel'nikova, S. P. (2009). On limiting rate of dimensional electrodeposition at meso-and nanomaterial

manufacturing by template synthesis. *Surface Engineering and Applied Electrochemistry*, 45, 171-179.

19. Behera, S., & Nayak, P.L. (2013). In vitro Antibacterial Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using Jamun Extract Against Multiple Drug Resistant Bacteria.

20. Karthikeyan, B., & Loganathan, B. (2013). A close look of Au/Pt/Ag nanocomposites using SERS assisted with optical, electrochemical, spectral and theoretical methods. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 49, 105-110.

21. Kharissova, O. V., Dias, H. R., Kharisov, B. I., Pérez, B. O., & Pérez, V. M. J. (2013). The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in biotechnology*, 31(4), 240-248.

22. Virkutyte, J., & Varma, R. S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles: biodegradable polymers and enzymes in stabilization and surface functionalization. *Chemical Science*, 2(5), 837-846.

23. Shukla, R., Nune, S. K., Chanda, N., Katti, K., Mekapothula, S., Kulkarni, R. R., ... & Katti, K. V. (2008). Soybeans as a phytochemical reservoir for the production and stabilization of biocompatible gold nanoparticles. *Small*, 4(9), 1425-1436.

24. Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Ahmad, A., Khan, M. I., Kumar, R., & Sastry, M. (2002). Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*. *ChemBioChem*, 3(5), 461-463.

25. Shahverdi, A. R., Minaeian, S., Shahverdi, H. R., Jamalifar, H., & Nohi, A. A. (2007). Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: a novel biological approach. *Process Biochemistry*, 42(5), 919-923.

26. Pawar D., shaikh S., Shulaksana D., kanawade R. Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 2016, 203

27. Kaur P., Thakur R., Chaudhury A. Green Chem. Lett. Rev., 2016, 9:33

28. Yallappa S., Manjanna J., Sindhe M.A., Satyanarayan N.D., Pramod S.N., Nagaraja K. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2013, 110:108
29. Lee H.J., Lee G., Jang N.R., Yun J.H., Song J.Y., Kim B.S. *Nanotechnology*, 2011, 1:371
30. Pavani K.V., Srujana N., Preethi G., Swati T. *Lett. Appl. Nanobiosci.*, 2013, 2:110
31. Honary S., Barabadi H., Gharaei-Fathabad E., Naghibi F. *Dig J Nanomater Bios*, 2012, 7:999
32. Nagarajan, D., Kusmayadi, A., Yen, H. W., Dong, C. D., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2019). Current advances in biological swine wastewater treatment using microalgae-based processes. *Bioresource technology*, 289, 121718.
33. Van Vuuren, D. P., Meinshausen, M., Plattner, G. K., Joos, F., Strassmann, K. M., Smith, S. J., ... & Reilly, J. M. (2008). Temperature increase of 21st century mitigation scenarios. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(40), 15258-15262.
34. Aslam, A., Thomas-Hall, S. R., Mughal, T., Zaman, Q. U., Ehsan, N., Javied, S., & Schenk, P. M. (2019). Heavy metal bioremediation of coal-fired flue gas using microalgae under different CO₂ concentrations. *Journal of environmental management*, 241, 243-250.
35. Pandey, V. D. (2010). Bioremediation of heavy metals by microalgae. *Algal biotechnology: new vistas*, 287-296.
36. Fawcett, D., Verduin, J. J., Shah, M., Sharma, S. B., and Poinern, G. E. J. (2017). A review of current research into the biogenic synthesis of metal and metal oxide nanoparticles via marine algae and seagrasses. *J. Nanosci.* 2017, 1–15. doi: 10.1155/2017/8013850
37. Ponnuchamy, K., and Jacob, J. A. (2016). Metal nanoparticles from marine seaweeds—a review. *Nanotechnol. Rev.* 5, 589–600. doi: 10.1515/ntrev-2016-0010

38. Narala, R. R., Garg, S., Sharma, K. K., Thomas-Hall, S. R., Deme, M., Li, Y., et al. (2016). Comparison of microalgae cultivation in photobioreactor, open raceway pond, and a two-stage hybrid system. *Front. Energy Res.* 4:29. doi: 10.3389/fenrg.2016.00029
39. Mukherjee, A., Sarkar, D., & Sasmal, S. (2021). A review of green synthesis of metal nanoparticles using algae. *Frontiers in Microbiology*, 12, 693899.
40. Bilal, M., Rasheed, T., Sosa-Hernández, J. E., Raza, A., Nabeel, F., & Iqbal, H. M. (2018). Biosorption: an interplay between marine algae and potentially toxic elements—a review. *Marine drugs*, 16(2), 65.
41. Salvador, N., Garreta, A. G., Lavelli, L., & Ribera, M. A. (2007). Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Scientia Marina*, 71(1), 101-114.
42. Sangeetha, S., Dhayanithi, N. B., & Sivakumar, N. (2014). Antibacterial activity of *Sargassum longifolium* and *Gracilaria corticata* from Gulf of Mannar against selected common shrimp pathogens.
43. Jin, J., Dupré, C., Legrand, J., & Grizeau, D. (2016). Extracellular hydrocarbon and intracellular lipid accumulation are related to nutrient-sufficient conditions in pH-controlled chemostat cultures of the microalga *Botryococcus braunii* SAG 30.81. *Algal research*, 17, 244-252.
44. Afifi, H. A. M., Geweely, N. S., Galal, H. S., Abdelrahim, S. A., & Al-Qudsi, F. M. S. (2016). Antimicrobial Activity of Gold Nanoparticles (AuNPs) on Deterioration of Archeological Gilded Painted Cartonnage, Late Period, Saqqara, Egypt. *Geomicrobiology Journal*, 33(7), 1–8. <https://doi.org/10.1080/01490451.2015.1062064>.
45. Speranza, G., Gottardi, G., Pederzoli, C., Lunelli, L., Canteri, R., Pasquardini, L., ... & Anderle, M. (2004). Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials*, 25(11), 2029-2037.

46. Huang, H. H., Yan, F. Q., Kek, Y. M., Chew, C. H., Xu, G. Q., Ji, W., ... & Tang, S. H. (1997). Synthesis, characterization, and nonlinear optical properties of copper nanoparticles. *Langmuir*, *13*(2), 172-175.
47. Khodashenas, B., & Ghorbani, H. R. (2014). Synthesis of copper nanoparticles: An overview of the various methods. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *31*, 1105-1109.
48. Gu, H., Chen, X., Chen, F., Zhou, X., & Parsaee, Z. (2018). Ultrasound-assisted biosynthesis of CuO-NPs using brown alga *Cystoseira trinodis*: Characterization, photocatalytic AOP, DPPH scavenging and antibacterial investigations. *Ultrasonics Sonochemistry*, *41*, 109-119.
49. Arya, A., Gupta, K., Chundawat, T. S., & Vaya, D. (2018). Biogenic synthesis of copper and silver nanoparticles using green alga *Botryococcus braunii* and its antimicrobial activity. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2018.
50. Ramaswamy, S. V. P., Narendhran, S., & Sivaraj, R. (2016). Potentiating effect of ecofriendly synthesis of copper oxide nanoparticles using brown alga: antimicrobial and anticancer activities. *Bulletin of Materials Science*, *39*, 361-364.
51. Abboud, Y., Saffaj, T., Chagraoui, A., El Bouari, A., Brouzi, K., Tanane, O., & Ihssane, B. (2014). Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles (CONPs) produced using brown alga extract (*Bifurcaria bifurcata*). *Applied nanoscience*, *4*, 571-576.
52. Bhattacharya, P., Swarnakar, S., Ghosh, S., Majumdar, S., & Banerjee, S. (2019). Disinfection of drinking water via algae mediated green synthesized copper oxide nanoparticles and its toxicity evaluation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *7*(1), 102867.
53. Lee, I. C., Ko, J. W., Park, S. H., Lim, J. O., Shin, I. S., Moon, C., Kim, S. H., Heo, J. D., & Kim, J. C. (2016). Comparative toxicity and biodistribution of copper nanoparticles and cupric ions in rats. *International journal of nanomedicine*, *11*, 2883–2900. <https://doi.org/10.2147/IJN.S106346>

54. Salas-Herrera, G., González-Morales, S., Benavides-Mendoza, A., Castañeda-Facio, A. O., Fernández-Luqueño, F., & Robledo-Olivo, A. (2019). Impact of microalgae culture conditions over the capacity of copper nanoparticle biosynthesis. *Journal of Applied Phycology*. doi:10.1007/s10811-019-1747-8
55. S B, S., Pitchiah, S., Suresh, V., & Ramasamy, P. (2023). Biosynthesis of Copper Nanoparticles From Seaweed *Ulva lactuca* and Their In Vitro Antioxidative Potential. *Cureus*, 15(11), e48985. <https://doi.org/10.7759/cureus.48985>
56. Alsalamah, S. A., Alghonaim, M. I., Mohammad, A. M., & Abdel Ghany, T. M. (2023). Algal biomass extract as mediator for copper oxide nanoparticle synthesis: Applications in control of fungal, bacterial growth, and photocatalytic degradations of dyes. *BioResources*, 18(4), 7474–7489. <https://doi.org/10.15376/biores.18.4.7474-7489>
57. Bhattacharya, P., Swarnakar, S., Ghosh, S., Majumdar, S., & Banerjee, S. (2018). Disinfection of drinking water via algae mediated green synthesized copper oxide nanoparticles and its toxicity evaluation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 102867. doi:10.1016/j.jece.2018.102867
58. Arya, A., Gupta, K., Chundawat, T. S., & Vaya, D. (2018). Biogenic Synthesis of Copper and Silver Nanoparticles Using Green Alga *Botryococcus braunii* and Its Antimicrobial Activity. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2018, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/7879403>
59. Rahman, A., Ismail, A., Jumbianti, D., Magdalena, S., & Sudrajat, H. (2009). Synthesis of copper oxide nano particles by using *Phormidium cyanobacterium*. *Indonesian Journal of Chemistry*, 9(3), 355-360. <https://doi.org/10.22146/ijc.21498>