

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

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**АНАЛІЗ СПОСОБІВ ОТРИМАННЯ НАНОЧАСТИНОК МІДІ В
КУЛЬТУРІ МІКРОВОДОРОСТЕЙ, ЇХ ХАРАКТЕРИСТИКА ТА
БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ**

Кваліфікаційна робота
студента кафедри
Хлопцевої Анни Андріївни

Допущена до захисту «__»_____25 р.

Завідувач кафедри _____

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

Оцінка «_____»

«__»_____25 р.

Харків 2025

АНОТАЦІЯ

У роботі було розглянуто методи культивування мікроводоростей та способи отримання наночастинок міді, за допомогою водного екстракту з мікроводоростей, який містить біоактивні сполуки з відновними властивостями.

Було досліджено методи характеристики наночастинок міді отриманих з використанням культури мікроводоростей, для їх первинної ідентифікації, вивчення морфології, підтвердження кристалічної структури та оцінки їх чистоти. Серед цих методів: УФ-видима спектроскопія, скануюча та трансмісійна електронна мікроскопія, метод динамічного розсіювання світла, рентгенівський дифракційний аналіз, енергодисперсійна рентгенівська спектроскопія та Фур'є-інфрачервона спектроскопія.

В результаті дослідження фізико-хімічних властивостей наночастинок міді отриманих з культури мікроводоростей було ідентифіковано функціональні групи (гідроксильні, амінні, карбоксильні, нітрильні та вуглеводневі групи), що характерні для біоактивних молекул виділених з екстракту мікроводоростей, які беруть участь у відновленні, формуванні морфології, розмірів та стабільності наночастинок міді.

Було охарактеризовано широкоспектрову активність наночастинок міді, зокрема виражену антибактеріальну та часткову протигрибкову дію, високу ефективність у знезараженні зразків води, низьку токсичність для досліджуваних риб і клітин ссавців, а також значну фотокаталітичну активність (деградація барвників).

Робота включає 138 сторінок, містить 63 рисунка. Список використаної літератури містить 79 джерел, з них 77 іноземні.

Ключові слова: мікроводорості, наночастинки міді, нанобіотехнології.

RESUME

This study explores the cultivation methods of microalgae and the synthesis of copper nanoparticles using aqueous extracts derived from microalgae, which contain bioactive compounds with reducing properties.

Characterization techniques for copper nanoparticles biosynthesized via microalgal cultures were examined for their preliminary identification, morphological analysis, confirmation of crystalline structure, and purity assessment. These techniques include UV-Visible spectroscopy, scanning and transmission electron microscopy, dynamic light scattering, X-ray diffraction analysis, energy-dispersive X-ray spectroscopy, and Fourier-transform infrared spectroscopy.

As a result of the physicochemical analysis of copper nanoparticles obtained from microalgal cultures, functional groups were identified — such as hydroxyl, amine, carboxyl, nitrile, and hydrocarbon groups — characteristic of the bioactive molecules present in the microalgal extract. These groups are involved in the reduction process, morphological formation, size regulation, and stabilization of the copper nanoparticles.

The broad-spectrum activity of the copper nanoparticles was characterized, including pronounced antibacterial and partial antifungal effects, high efficiency in water sample disinfection, low toxicity towards tested fish species and mammalian cells, and significant photocatalytic activity (dye degradation).

The work comprises 138 pages and includes 63 figures. The reference list contains 79 sources, of which 77 are foreign.

Keywords: microalgae, copper nanoparticles, nanobiotechnology.

АНОТАЦІЯ	2
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ТА АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Коротка характеристика наночастинок	9
1.2. Біологічні методи отримання наночастинок	13
1.3. Методи які використовують для характеристики наночастинок міді	15
1.4. Результати досліджень щодо властивостей наночастинок міді	20
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	25
2.1. Синтез наночастинок оксиду міді за допомогою мікроводоростей <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Chlorella kessleri</i> та <i>Tetraselmis suecica</i>	25
2.1.1. Підготовчі роботи..	25
2.1.2. Культивування мікроводоростей <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Chlorella kessleri</i> та <i>Tetraselmis suecica</i> .	25
2.1.3. Вимірювання фотосинтетично активного випромінювання..	25
2.1.4. Аналітичні методи характеристики	27
2.1.5. Біосинтез наночастинок міді	27
2.1.6. УФ-видима спектроскопія.	28
2.1.7. Статистичний аналіз.	28
2.2. Синтез наночастинок оксиду міді за допомогою екстракту мікроводоростей <i>Botryococcus braunii</i>	29
2.2.1 Підготовчі роботи.	29
2.2.2. Ізоляція, культивування та приготування екстракту мікроводоростей <i>Botryococcus braunii</i> .	29
2.2.3 Біосинтез наночастинок міді.	30
2.2.4. Методи фізико-хімічної характеристики наночастинок міді.	30
2.2.5. Антимікробна активність синтезованих наночастинок міді.	31
2.3. Синтез наночастинок оксиду міді за допомогою екстракту мікроводоростей <i>Anabaena cylindrica</i>	32
2.3.1 Підготовчі роботи.	32
2.3.2. Приготування екстракту мікроводоростей <i>Anabaena cylindrica</i> .	32
2.3.3 Біосинтез наночастинок оксиду міді.	33
2.3.4. Методи фізико-хімічної характеристики наночастинок оксиду міді.	33
2.3.5. МІК (мінімальна інгібуюча концентрація) та антибактеріальна активність наночастинок оксиду міді.	35
2.3.6. Вплив наночастинок оксиду міді на бактерії у питній воді.	36

2.3.7. Тест на токсичність наночастинок оксиду міді для живих організмів.	37
2.3.8. Аналіз морфологічних змін клітин ссавців у відповідь на дію наночастинок оксиду міді.	38
2.4. Синтез наночастинок оксиду міді за допомогою мікроводоростей <i>Zygnema sp.</i>	39
2.4.1. Підготовчі роботи..	39
2.4.2. Біосинтез наночастинок оксиду міді..	39
2.4.3. Ідентифікація та первинна характеристика синтезованих наночастинок оксиду міді.	40
2.4.4. Активність створених наночастинок оксиду міді проти бактерій і <i>Candida albicans</i> .	40
2.4.5. Активність створених наночастинок оксиду міді проти грибів.	41
2.4.6. Фотокаталітичне розкладання барвників за допомогою наночастинок оксиду міді	41
2.5. Синтез наночастинок оксиду міді за допомогою екстракту мікроводоростей <i>Coelastrella terrestris</i>	42
2.5.1. Підготовчі роботи.	42
2.5.2. Приготування екстракту мікроводоростей <i>Coelastrella terrestris</i> .	43
2.5.3. Біосинтез наночастинок оксиду міді..	43
2.5.4. Фізико-хімічна характеристика синтезованих наночастинок	45
2.5.5. Антибактеріальна активність синтезованих наночастинок міді..	46
2.5.6. Фотокаталітичне розкладання барвників за допомогою наночастинок оксиду міді	46
2.6. Синтез наночастинок оксиду міді за допомогою екстракту мікроводоростей <i>Chlorella vulgaris</i>	47
2.6.1. Підготовчі роботи.	47
2.6.2. Приготування екстракту мікроводоростей <i>Chlorella vulgaris</i> .	48
2.6.3. Біосинтез наночастинок оксиду міді.	48
2.6.4. Методи фізико-хімічної характеристики наночастинок оксиду міді.	49
2.6.5. Антибактеріальна активність синтезованих наночастинок оксиду міді	49
2.7. Синтез наночастинок оксиду міді за допомогою екстракту мікроводоростей <i>Arthrospira maxima</i>	49
2.7.1. Підготовчі роботи.	49
2.7.2. Приготування екстракту мікроводоростей <i>Arthrospira maxima</i> .	50

2.7.3. Біосинтез наночастинок оксиду міді	50
2.7.4. Методи фізико-хімічної характеристики наночастинок оксиду міді	50
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	52
3.1. Характеристика наночастинок міді синтезованих за допомогою мікроводоростей <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Chlorella kessleri</i> та <i>Tetraselmis suecica</i>	52
3.2. Характеристика наночастинок оксиду міді синтезованих за допомогою екстракту мікроводоростей <i>Botryococcus braunii</i>	61
3.3. Характеристика наночастинок оксиду міді синтезованих за допомогою екстракту мікроводоростей <i>Anabaena cylindrica</i>	68
3.4. Характеристика наночастинок оксиду міді синтезованих за допомогою мікроводоростей <i>Zygnema sp.</i>	83
3.5. Характеристика наночастинок оксиду міді синтезованих за допомогою мікроводоростей <i>Coelastrella terrestris</i>	93
3.6. Характеристика наночастинок оксиду міді синтезованих за допомогою екстракту мікроводоростей <i>Chlorella vulgaris</i>	119
3.7. Характеристика наночастинок оксиду міді синтезованих за допомогою екстракту мікроводоростей <i>Arthrospira maxima</i>	123
ВИСНОВКИ	126
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:	127

ВСТУП

Упродовж останніх десятиліть нанотехнології стали провідним напрямом розвитку у багатьох галузях науки та техніки, через дослідження взаємозв'язку між фізико-хімічними властивостями наночастинок і їхніми формою та розмірами. Серед неорганічних наночастинок, особливий інтерес викликають наночастинок міді (CuNPs), які поєднують у собі низьку собівартість, доступність, високу електро- та теплопровідність, антибактеріальні та фотокаталітичні властивості.

Однак традиційні методи отримання наночастинок часто пов'язані з використанням токсичних реагентів, дорогого обладнання і значним енергоспоживанням. У зв'язку з цим зростає інтерес до розробки та дослідження біологічних способів синтезу наночастинок, зокрема з використанням мікробіодоростей, здатних не лише акумулювати іони металів, але й перетворювати їх у стабільні наноформи.

Отримання наночастинок із передбачуваними та контрольованими характеристиками потребує всебічного вивчення як методів синтезу, так і підходів до їх подальшої характеристики. Комплексний аналіз дозволяє не лише оптимізувати умови синтезу, але й забезпечити контроль за чистотою, стабільністю, морфологічними та структурними особливостями наночастинок та їх функціональними властивостями, зокрема антимікробною активністю, що визначає потенціал використання наноматеріалів у різних галузях.

Актуальність теми дослідження полягає в тому, що наночастинок, зокрема на основі міді, завдяки своїм унікальним фізико-хімічним та біологічним властивостям, набувають дедалі ширшого застосування в біомедичній, сільськогосподарській та екологічній сферах. Проте традиційні методи їх синтезу є енерговитратними, токсичними та малоефективними. У цьому контексті біологічні підходи, особливо із застосуванням мікробіодоростей, стають

перспективною альтернативою. Вивчення характеристик наночастинок міді та оптимальних умов їх синтезу є важливим етапом для забезпечення контролю якості, а також отримання наночастинок із високою стабільністю, бажаними фізико-хімічними властивостями та вираженою біологічною та фотокаталітичною активністю.

Метою роботи є ознайомитися зі способами отримання наночастинок міді за допомогою культури мікроводоростей, охарактеризувати фізико-хімічні властивості біосинтезованих наночастинок та визначити їх біологічну активність.

Предметом дослідження є біосинтез наночастинок міді за допомогою культури мікроводоростей, їх фізико-хімічні властивості та активність.

Об'єктами роботи є мікроводорості, синтезовані за допомогою них наночастинок та їх властивості.

Завдання роботи:

1. Ознайомитись з методами культивування мікроводоростей та способами отримання наночастинок з культури мікроводоростей.
2. Ознайомитись з методами характеристики наночастинок міді отриманих з використанням культури мікроводоростей.
3. Дослідити фізико-хімічні властивості наночастинок міді отриманих з використанням культури мікроводоростей.
4. Визначити активність наночастинок міді отриманих з використанням культури мікроводоростей.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ТА АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Коротка характеристика наночастинок

На сучасному етапі розвитку науки, який триває вже понад 20 років, спостерігається активна мініатюризація технологічних процесів у таких галузях, як хімія, біологія, медицина та сільське господарство, що стало основою для появи якісно нового напрямку — нанотехнологій [78]. Нанотехнології перетворилися на один із ключових напрямів у різних сферах науки, оскільки завдяки сучасним технологіям дослідники поступово почали усвідомлювати взаємозв'язок між фізико-хімічними властивостями наночастинок і їхніми формою та розмірами [71].

Наночастинка (НЧ) – частинка речовини довільної форми і розмірами від 1 до 100 нанометрів. Займаючи проміжне положення між окремими атомами та молекулами, НЧ проявляють принципово інакші, порівняно з макросвітом, фізичні та хімічні властивості [79]. Крім хімічних, оптичних та теплових характеристик, деякі матеріали проявляють різні властивості при дослідженні їх у наномасштабі. Однією з відомих причин цього явища є їхній високий коефіцієнт співвідношення сторін, що для різних НЧ може зумовлювати виявлення різноманітних характеристик [22]. Залежно від їхнього складу наночастинки загалом поділяються на три основні класи: органічні, вуглецеві та неорганічні.

До класу органічних наночастинок належать НЧ, що складаються з білків, вуглеводів, ліпідів, полімерів або інших органічних сполук. Найвідомішими прикладами цього типу є дендримери, ліпосоми, міцели та білкові комплекси, як-от феритин (рис. 1.1). Ці наночастинки зазвичай є нетоксичними, біорозкладними, і в окремих випадках, наприклад для ліпосом, можуть мати порожнисте ядро. Органічні НЧ чутливі до теплового та електромагнітного випромінювання, такого як тепло і світло. Крім того, вони часто формуються за

рахунок нековалентних міжмолекулярних взаємодій, що робить їх менш стабільними за природою, але водночас забезпечує можливість їх виведення з організму.

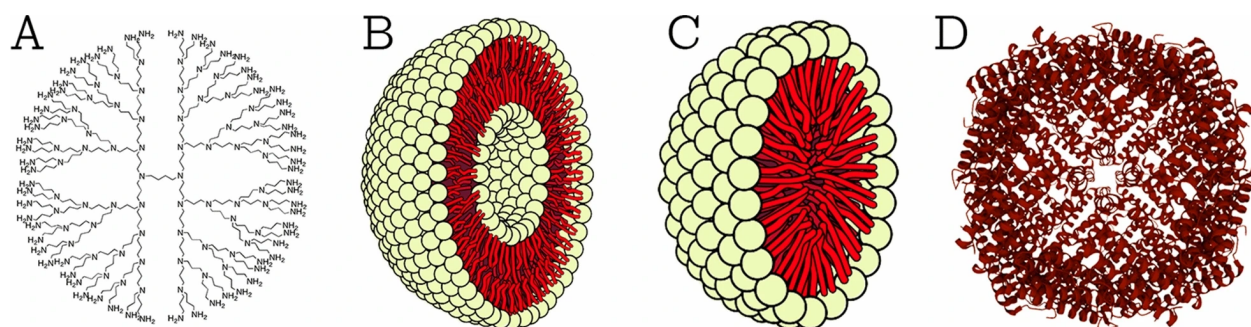


Рис. 1.1. Типи органічних наночастинок: А – дендримери; В – ліпосоми; С – міцели; і D – феритин.

Вуглецеві наночастинок, відповідно, складаються виключно з атомів вуглецю. Відомими прикладами цього класу є фулерени, буквально вуглецеві наночастинок (carbon black), або сажові наночастинок, та вуглецеві квантові точки (рис. 1.2). Завдяки своїй винятковій електропровідності, високій міцності, біосумісності, а також оптичним, тепловим і сорбційним властивостям, вуглецеві НЧ застосовуються в широкому спектрі галузей, зокрема для біомедичних застосувань: доставки ліків, протиракових та протизапальних застосувань [40, 33].

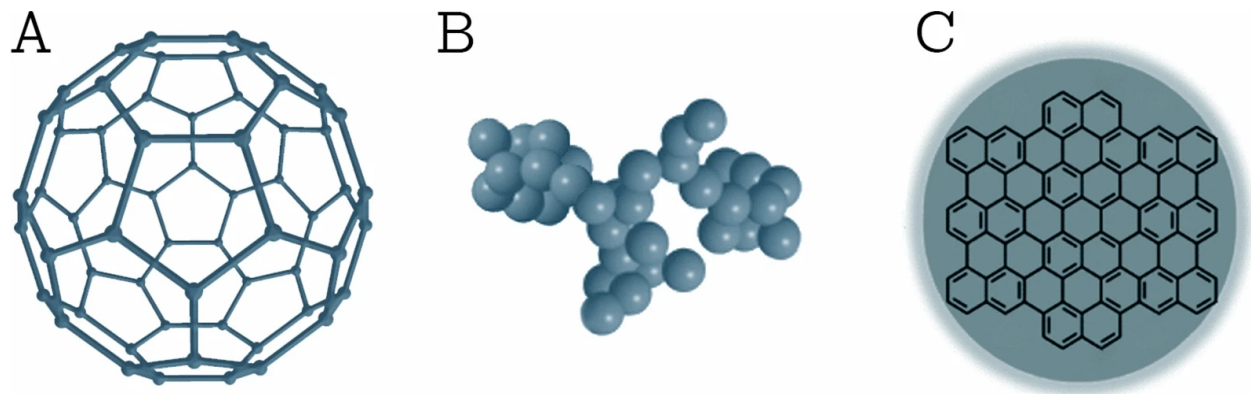


Рис. 1.2. Різні типи вуглецевих наночастинок: А – фулерен C60; В – сажові наночастинок; і С – вуглецеві квантові точки.

Клас неорганічних наночастинок охоплює наночастинки, які не складаються з вуглецю або органічних матеріалів. Типовими прикладами є металеві, керамічні та напівпровідникові наночастинки [40].

Майже всі метали можуть бути синтезовані в наночастинки. Найпоширенішими металами для синтезу НЧ є алюміній (Al), кадмій (Cd), кобальт (Co), мідь (Cu), золото (Au), залізо (Fe), свинець (Pb), срібло (Ag) і цинк (Zn). Ці НЧ мають відмінні характеристики поверхні, такі як високий коефіцієнт поверхні до об'єму, розмір пор, поверхневий заряд і густина поверхневого заряду, кристалічні та аморфні структури, різні форми, наприклад, сферичні та циліндричні, а також різняться за реактивністю і чутливістю до зовнішніх факторів, таких як повітря, волога, тепло і сонячне світло тощо. Наночастинки на основі оксидів металів синтезуються для модифікації властивостей відповідних наночастинок на основі металів, наприклад, наночастинки заліза (Fe) миттєво окислюються до оксиду заліза (Fe_2O_3) у присутності кисню при кімнатній температурі, що збільшує їх реактивність порівняно з наночастинками заліза. Наночастинки оксидів металів мають виняткові властивості порівняно з їх металевими аналогами [30].

Наночастинки міді (CuNPs) викликають значний інтерес завдяки своїм механічним, електричним, магнітним і тепловим властивостям. Однією з переваг міді є її доступність і низька вартість, що робить виробництво CuNPs потенційно вигідним [25]. Нещодавно різноманітні застосування металевих наночастинок були досліджені в біомедичних, сільськогосподарських, екологічних та фізико-хімічних галузях. CuNPs як один із видів провідних матеріалів має багато застосувань, таких як каталізatori та тверді мастила [77]. В сільському господарстві CuNPs використовуються для контролю ряду патогенів, таких як гриби та деякі бактерії, а також як стимулятори підвищення врожайності [65]. Також, НЧ мають багато потенційних переваг для навколишнього середовища. До прикладу, вони можуть використовуватися для підвищення ефективності

очищення води, фільтрації повітря та рекультивації ґрунтів, зменшення забруднення та розробки нових видів відновлюваних енергетичних технологій [5].

Методи виробництва наночастинок постійно досліджуються та розробляються. Залежно від джерела електронів методи синтезу можна поділити на: біологічний, якщо відновником є біологічний організм (бактерії, гриби, водорості, рослини); хімічний, якщо відновником є хімічна сполука; фізичний, якщо джерело електронів є фізичним (наприклад, електрика) [25]. Хімічні та фізичні методи, які використовуються традиційно, характеризуються значними обмеженнями. Вони потребують використання дорогого та складного обладнання, що значно підвищує вартість процесу, ці методи зазвичай вимагають тривалого часу синтезу та характеризуються низькою енергоефективністю, а також мають ускладнений контроль над розміром, формою, морфологією та стабільністю наночастинок, що знижує точність і якість кінцевого продукту [78, 53]. Наночастинки можуть легко потрапити в навколишнє середовище через різні джерела, зокрема промислові викиди, споживчі продукти та медичні процедури, а потрапивши в довкілля, наночастинки важко контролювати та моніторити [5]. Отже, на сьогодні, завдяки фізико-хімічним властивостям та численним застосуванням наночастинок, наукова спільнота приділила значні зусилля для розробки відповідних синтетичних технологій для виробництва наночастинок. Проте різні фізико-хімічні підходи до синтезу металевих наночастинок, як було зазначено, є обмеженими [71].

Біологічний синтез є екологічно чистою альтернативою традиційним методам синтезу і спрямований на уникнення або мінімізацію токсичних складових, що використовуються за фізико-хімічними методами та здатні успішно конкурувати з ними за швидкістю, керованістю та зменшенням собівартості кінцевої продукції, при цьому навіть покращуючи фізичні та хімічні властивості наночастинок. Впродовж останнього десятиліття доведено, що

різноманітні біологічні системи, зокрема рослини, водорості, бактерії, дріжджі, гриби і віруси, завдяки здатності біомолекул, таких як білки, ферменти, амінокислоти, флавоноїди та цукри, можуть відновлювати іони металів до наночастинок, одночасно впливаючи на їхню форму, розмір і стабільність [78, 5]. В тому числі мікроводорості виділяються як потенційне джерело різноманітних біомолекул, таких як білки, пігменти, вуглеводи, алкалоїди, терпени, пептиди та деякі ароматичні сполуки, які можуть бути залучені в процеси відновлення йонів металів для утворення та стабілізації металевих наночастинок без утворення токсичних побічних продуктів. Здатність мікроводоростей до утворення металевих наночастинок пов'язана з процесами детоксикації через наявність важких металів в навколишньому середовищі, де розвиваються клітини [65].

1.2. Біологічні методи отримання наночастинок

Металеві наночастинки можуть бути отримані за допомогою біологічних, хімічних і фізичних методів. Для отримання НЧ зокрема наночастинок міді, необхідні три основні елементи. По-перше, прекурсор, який забезпечує іони міді. По-друге, відновник, що постачає електрони для перетворення йонів міді в атоми міді. За умови правильних температурних і рН-умов третій компонент – поверхнево-активна речовина – агрегує отримані атоми міді у CuNPs. Залежно від джерела електронів методи синтезу можна поділити на: біологічний, якщо відновником є біологічний організм (бактерії, гриби, водорості, рослини); хімічний, якщо відновником є хімічна сполука; фізичний, якщо джерело електронів є фізичним [25]. Хімічні та фізичні методи, які використовуються традиційно, характеризуються значними обмеженнями, і, попри широке поширення традиційних технологій одержання НЧ, вони, зазвичай, трудомісткі, пов'язані з ризиком і потенційною небезпекою для навколишнього середовища і живих організмів.

Біологічний синтез, що базується на застосуванні бактерій, грибів, водоростей, рослинних екстрактів та інших біологічних агентів, є екологічно чистою альтернативою традиційним методам синтезу і спрямований на уникнення або мінімізацію токсичних складових, властивим фізико-хімічним методам, і водночас здатні успішно конкурувати з ними за швидкістю, керованістю, біоконверсією та зменшенням собівартості кінцевої продукції [78, 66]. Фактором, що забезпечує екологічність біологічних методів синтезу є те, що для того, щоб виживати в середовищах із високим вмістом металів, організми адаптувалися, розвиваючи механізми, що дозволяють їм справлятися з цими умовами. Ці механізми можуть включати зміну хімічної природи токсичного металу так, що він більше не спричиняє токсичності, внаслідок чого утворюються наночастинки відповідного металу. Таким чином, формування наночастинок є «побічним продуктом» механізму опору до певного металу, і це може бути використано як альтернативний спосіб їх отримання [57, 78]. Водорості є організмами, які здатні поглинати важкі метали з навколишнього середовища, а також синтезувати металеві наночастинки. Оскільки водорості поглинають метали та знижують концентрацію металевих іонів, їх називають "біонанофабриками", здатними синтезувати металеві наночастинки як з живої, так і з мертвої сухої біомаси [22]. Останнім часом дослідники зосередилися на використанні водоростей для синтезу біосумісних та екологічно чистих наночастинок для різних біологічних застосувань, особливо в наномедицині.

Біосинтез наночастинок може бути позаклітинним (екзогенним), внутрішньоклітинним (ендогенним) і за використання специфічних біохімічних сполук [34]. Біосинтез ендогенних НЧ базується на здатності деяких організмів вилучати метали з середовища та накопичувати їх [51]. Одним із прикладів внутрішньоклітинного синтезу наночастинок є дослідження Salas-Herrera et al. [65], у якому мікроводорості *Chlorella kessleri*, *Tetraselmis suecica* та *Dunaliella tertiolecta* використовувалися для біосинтезу наночастинок міді. Культури

водоростей інкубували в стандартних середовищах за контрольованих умов, після чого обробляли іонами Cu^{2+} . Було встановлено, що розмір, морфологія та ефективність утворення НЧ залежали від штаму, солоності середовища й освітлення. Хоча ендогенний синтез є ефективним, він має обмеження, що ускладнюють його використання в промислових масштабах, а саме неможливість прямо контролювати морфологію наночастинок, а також труднощі пов'язані з екстракцією, ізоляцією та очищенням НЧ [51].

Позаклітинні методи охоплюють синтез наночастинок з використанням екстракту різних біологічних тканин, що можуть бути підготовлені за різних методологій. У позаклітинному процесі іони відновлюються за допомогою білків, полісахаридів, ферментів і органічних кислот у середовищі [43]. Прикладом позаклітинного синтезу наночастинок є дослідження Arya та співавт. [11], у якому для синтезу мідних наночастинок використовували екстракт зеленої водорості *Botryococcus braunii*. Біомаса водоростей була попередньо відділена, висушена, автоклавована та профільтрована, після чого отриманий екстракт застосовували як відновник у реакції з ацетатом міді. Утворення наночастинок супроводжувалося зміною кольору розчину і підтверджувалося спектроскопічно.

1.3. Методи які використовують для характеристики наночастинок міді

При виборі методів для характеристики наночастинок, отриманих у ході дослідження, першочерговим кроком є визначення цільових параметрів, які необхідно встановити відповідно до мети та завдань роботи. Вибір методик залежить не лише від того, які саме властивості наноматеріалу цікавлять дослідника, а й від наявних технічних можливостей лабораторії, чутливості приладів, бюджету дослідження та складності зразків. Комплексна характеристика дозволяє встановити структурні, фізико-хімічні, оптичні,

електричні, магнітні, механічні та біологічні властивості НЧ, що критично важливо для їх подальшого застосування. Умовно всі напрямки характеристики НЧ можна поділити на такі основні категорії:

Морфологічна та топографічна характеристика

Цей напрямок включає аналіз розміру, форми, ступеня агрегації/агломерації, дисперсності, пористості, морфології та площі поверхні наночастинок. Для цього використовують, зокрема, скануючу електронну мікроскопію (SEM), для дослідження морфології, в тому числі розміру, форми та агрегації НЧ, трансмісійну електронну мікроскопію (ТЕМ), що дозволяє візуалізувати наночастинки у двовимірному зображенні та визначити їх локалізацію і кристалічну структуру [40]. Зазвичай в цьому контексті для характеристики НЧ частіше використовують трансмісійну електронну мікроскопію, однак, оскільки зображення ТЕМ формуються шляхом проєкції сигналу на екран, важко визначити перекриття частинок або дослідити їхню тривимірну структуру за допомогою двовимірного зображення. Натомість скануюча електронна мікроскопія фіксує електрони, що випромінюються з поверхні досліджуваного зразка, що краще підходить для візуалізації поверхневих структур наночастинок [12]. Крім цього, для характеристики НЧ може бути застосовано метод динамічного розсіювання світла (DLS), що дозволяє визначити розподіл наночастинок за розмірами у колоїдних розчинах. Принцип роботи DLS базується на аналізі броунівського руху частинок у рідкому середовищі, і навіть попри те, що вдається виміряти лише середній розмір часток, і неможливо сказати, чи це окремі наночастинки чи агломерати, цей метод забезпечує високу статистичну надійність результатів [41]. Метод Брунау–Еметта–Теллера (BET) використовується для визначення поверхневої площі НЧ. Принцип методу базується на адсорбції та десорбції азоту на поверхні матеріалу: створюється частковий вакуум, що дозволяє азоту адсорбуватися на поверхні наночастинок при низьких температурах, після чого зразок нагрівається, і азот

десорбується, а кількість адсорбованого азоту вимірюється. Отримані дані використовуються для побудови ізотерм, що дають можливість розрахувати поверхневу площу матеріалу [36].

Структурна та хімічна характеристика

Ці методи допомагають визначити форму, розмір, фазу, кристалічну структуру, хімічний склад, заряд і стабільність наночастинок, що важливо для розуміння їхніх властивостей. Структурна характеристика НЧ проводиться за допомогою рентгеноструктурного аналізу (XRD), який дозволяє виявити фазовий склад і ступінь кристалізації, таким чином дозволяючи зробити висновок стосовно кристалічної структури наночастинок [40]. Найпоширенішими методами обробки XRD-профілів є методи Шерера, Вільямсона–Голла та Уоррена–Авербаха. Вони відрізняються за точністю, складністю розрахунків і обсягом інформації, що ми можемо в результаті отримати. Енергодисперсійна рентгенівська спектроскопія (EDX), у свою чергу, використовується для якісного визначення елементного складу зразків. Метод працює на основі взаємодії електронного пучка з атомами зразка, що призводить до збудження електронів і подальшого випромінювання характеристичних рентгенівських променів [67]. Широке застосування в контексті досліджень та характеристики НЧ має фур'є-інфрачервона спектроскопія (FTIR), яка працює на основі поглинання інфрачервоного випромінювання молекулами, що викликає їхні коливання та дозволяє визначити функціональні групи. Цей метод важливий для аналізу наночастинок, оскільки допомагає виявити хімічні зв'язки, структуру та стабілізуючі агенти, що беруть участь у синтезі [58, 40].

Характеристика оптичних, електронних та електричних властивостей

За допомогою методів УФ-видимої спектроскопії, фотолюмінесцентної спектроскопії та інших визначають такі параметри, як здатність до поглинання та відбиття світла, фотоактивність, фіксують перехід електронів з основного стану в збуджений тощо [40]. Принцип дії УФ-видимої спектроскопії, як найбільш

поширеного в даному випадку методу, базується на вимірюванні поглинання світла у видимому та ультрафіолетовому діапазонах, що дозволяє визначити енергетичні переходи електронів у матеріалі. Визначення характерних піків поглинання для НЧ дає можливість зробити висновок про успішність їх синтезу та специфічні електронні властивості. Ці піки можуть зміщуватися залежно від розміру, форми та умов синтезу наночастинок, що надає інформацію про їх морфологію та стабільність [44].

Характеристика магнітних властивостей

Для наночастинок, здатних проявляти магнітну активність, досліджують величину магнітного моменту, тип магнетизму (феро-, суперпарамагнетизм тощо), залишкову намагніченість. Такі властивості мають значення в медицині (наприклад, при створенні магнітних носіїв для доставки ліків), в каталітичних процесах та наноробототехніці [40]. Згідно з даними літератури, НЧ демонструють найкращі властивості, коли їхній розмір є меншим за критичне значення — тобто 10–20 нм. На такому нанорівні магнітні властивості частинок значно посилюються, що робить їх надзвичайно цінними для різноманітних застосувань [45].

Характеристика термічних властивостей

Сюди належить визначення температури плавлення, точок фазових переходів, теплоємності, термостабільності та теплопровідності. Визначення цих параметрів є важливим при виборі умов зберігання та експлуатації НЧ, а також для оцінки їх стабільності у виробничих процесах та визначенні оптимальних умов для їх отримання.

Характеристика механічних властивостей

Вивчається міцність наночастинок при розтягуванні або стисканні, їх твердість, пружність, жорсткість та в'язко-пружні властивості. Ці характеристики стають ключовими при використанні НЧ у матеріалознавстві, створенні наноматеріалів або біоінженерії [40].

Характеристика токсичних властивостей

Наночастинки викликають значне занепокоєння щодо їх впливу на навколишнє середовище через свої малі розміри та водночас високі каталітичні властивості, тому все частіше дослідники приділяють увагу їх взаємодії з організмами та екосистемами [63]. Таким чином, з метою визначення токсичності НЧ у літературі описано використання різних методологій. Наприклад, у дослідженні [11] для оцінки антимікробної активності CuNPs, отриманих методом біологічного синтезу, використовували метод агарових лунок, що дозволяє визначити зони інгібування росту, та метод мікророзведення в бульйоні, для визначення мінімальної інгібуючої концентрації (MIC). Для реалізації методу мікророзведення використовують мікропланшети, у які додають фіксований об'єм поживного середовища, стандартну кількість бактеріальних клітин (наприклад, 5×10^5 КУО/мл) та різні концентрації наночастинок. Після інкубації планшетів оцінюють ріст мікроорганізмів. Мінімальною інгібуючою концентрацією (MIC) буде вважатися найменша концентрація наночастинок, при якій відсутнє помутніння, тобто не спостерігається видимого росту бактерій [14]. Метод агарових лунок у свою чергу — це класичний лабораторний підхід для оцінки антибактеріальної активності різних сполук, зокрема НЧ. Він ґрунтується на дифузії тестованої речовини з лунки в агаризоване середовище, де ростуть мікроорганізми: якщо речовина має антимікробну активність, навколо лунки утворюється зона інгібування росту бактерій [24]. У роботі [46] також описано використання методу дискової дифузії, що загалом має подібний принцип: стерильне поживне середовище інокують суспензією мікроорганізмів, після чого на поверхню агару розміщують стерильні паперові диски, просочені певною кількістю досліджуваних наночастинок. Після інкубації чашок у відповідних умовах оцінюють утворену навколо диска, так само, зони інгібування, і її діаметр буде свідчити про рівень антимікробної активності, тобто чим більша зона, тим вищий ефект [14]. В іншій роботі [16], крім згаданих вище методів, для

дослідження цитотоксичності на клітинні культури (CHO і AGS) застосували МТТ-тест. Принцип цього аналізу полягає у визначенні життєздатності клітин на основі активності їх мітохондріальних ферментів. У живих клітинах мітохондріальні дегідрогенази здатні метаболізувати жовтий, водорозчинний барвник МТТ (тетразолій) у фіолетові кристали формагану. Мертві клітини не мають функціональних мітохондрій, тому не здатні утворювати формаган, а відповідно – не забарвлюють середовище [2]. Морфологічні зміни в клітинах, наприклад, як в згаданому дослідженні, можуть бути проаналізовані за допомогою флуоресцентного фарбування АО/ЕВ і DAPI.

1.4. Результати досліджень щодо властивостей наночастинок міді

Властивості мідних наночастинок значною мірою залежать від умов їх отримання, зокрема методу синтезу, температури, рН середовища, концентрації реагентів та часу реакції. Ці чинники впливають на розмір, форму, стабільність і функціональну активність наночастинок, зумовлюючи їхні фізико-хімічні та біологічні характеристики [27]. Відповідно, результати досліджень можуть суттєво відрізнятися залежно від обраного способу синтезу та використаних реагентів.

У процесі відновлення НЧ розсіюють і поглинають світло на певній довжині хвилі через резонансні збудження заряду на межі між провідником (металом) і ізолятором — це і є явище, відоме як поверхневий плазмонний резонанс (SPR) [11]. Під час проведення УФ-видимої спектроскопії характерний пік з'являється на певній довжині хвилі світла якраз через наявність SPR-електронів на поверхні частинок [35]. Поверхневий плазмонний резонанс на поверхнях сферичних наночастинок міді знаходиться у видимому діапазоні з максимальною абсорбцією між 520 і 700 нм, тоді як виявлення різних типів наночастинок оксиду міді (CuONPs) відбувається в УФ-області спектру, тобто в

діапазоні 200–350 нм [65, 35, 62]. Аналіз характерних піків у спектрах поглинання забезпечує простий і ефективний метод контролю якості синтезу та моніторингу фізико-хімічних властивостей НЧ. У випадку XRD-дослідження для наночастинок оксиду міді вони демонструють характерні дифракційні піки, які відповідають моноклінній кристалічній структурі — це означає, що атоми міді та кисню у складі наночастинок впорядковані у специфічну, асиметричну кристалічну ґратку [3, 60, 46].

Як показали спостереження [19], наночастинки міді проявляють високу термічну стабільність — до 70 % маси зберігається при нагріванні до 900 °С, а також мають ендотермічний характер з піком поглинання тепла при 609,61 °С. Крім цього було встановлено, що температура реакції визначає форму наночастинок: підвищення температури веде до збільшення розміру частинок через поверхневе плавлення й злиття [54, 35]. Щодо розмірів наночастинок під час синтезу, то важливим є концентрація рослинного екстракту: збільшення концентрації призводить до зростання кількості фітохімічних сполук, які відповідають за відновлення й стабілізацію наночастинок. Це пришвидшує реакцію відновлення солі міді, що, своєю чергою, сприяє утворенню більшої кількості НЧ меншого розміру. Важливим чинником є також тип солі, використаної як прекурсор: наприклад, у присутності NaOH при використанні CuCl_2 утворюються трикутні або тетраедричні частинки, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ формує стрижневі наночастинки, тоді як CuSO_4 — сферичні. Концентрація самої солі також впливає на розмір: її підвищення веде до утворення більших частинок. Значну роль у визначенні морфології наночастинок відіграє рН реакційного середовища. При підвищенні рН утворюються дрібні сферичні наночастинки, тоді як при низьких значеннях рН формуються більші наночастинки, які можуть мати стрижневу або трикутну форму [27, 52]. Загалом розмір мідних наночастинок коливається в межах від 5 до 150 нм. У результаті біологічного

синтезу найчастіше спостерігаються стабільні й добре дисперговані частинки діаметром 40–56 нм. Крім того, у деяких дослідженнях були зафіксовані агрегати НЧ розміром до 200 нм, з переважно неправильною формою окремих частинок розміром 13–45 нм [6, 73].

У роботі [3] досліджено антибактеріальну активність наночастинок оксиду міді проти восьми бактеріальних штамів. Метод агарових лунок показав високу активність, найбільшу чутливість проявили *E. coli* та *E. faecalis* (MIC 31,25 $\mu\text{g}/\text{мл}$), тоді як *K. pneumoniae* виявилася найбільш стійкою (MIC 250 $\mu\text{g}/\text{мл}$). Більшість інших досліджень у літературі підтверджують високу антимікробну активність наночастинок, особливо проти грамнегативних бактерій, як раз таких як *E. coli* та *S. aureus* [35]. Наночастинки легко проникають у бактеріальні клітини, викликаючи токсичність і окислювальний стрес, що призводить до порушення мембран та клітинних процесів [17]. Таким чином, основною причиною токсичності є дисоціація наночастинок з вивільненням іонів Cu^{2+} та генерація активних форм кисню (ROS), які спричиняють окисний стрес і енергетичне виснаження клітин [20].

Біосинтезовані наночастинки оксиду міді також проявляють високу фотокаталітичну активність завдяки здатності генерувати активні форми кисню під впливом сонячного світла. Завдяки вузькій ширині забороненої зони НЧ є ефективним фотокаталізатором, здатним активізуватися під впливом природного сонячного світла. Наприклад, дослідження [10] продемонструвало, що біосинтезовані НЧ забезпечують до 65% деградації метилового зеленого та метилового помаранчевого за 60 хвилин. У іншій роботі [70] отримані наночастинки оксиду міді показали вищу ефективність у деградації метилового синього: при дозі каталізатора 50 мг досягнуто 80,67% деградації, а при 210 хвилинах опромінення — до 97,67%. Хоча ефективність фотокаталітичної деградації барвників за участю біосинтезованих наночастинок міді може

варіюватися залежно від умов синтезу, типу барвника [31] та експериментального дизайну, узагальнені результати численних досліджень свідчать про високий потенціал цих наноматеріалів як ефективних фотокаталізаторів для очищення стічних вод.

Фур'є-інфрачервона спектроскопія (FTIR), як вже було зазначено, використовується дослідниками для ідентифікації різних функціональних груп наночастинок. Поглинання відбувається тоді, коли інфрачервоне світло FTIR взаємодіє з хімічними зв'язками або коливаннями, які відповідають певній резонансній частоті. У наночастинок оксиду міді спостерігаються виражені піки, що відповідають групам O–H, C=O, C–N, C–H і C=C, які підтверджують наявність груп, відповідальних за відновлення і стабілізацію CuNPs [35, 46, 11, 16]. Природні біоактивні речовини (флавоноїди, феноли, білки, ефіри, тощо) діють як стабілізатори та капуючі агенти, що забезпечує стійкість біологічно синтезованих наночастинок до агрегації протягом 30 днів або більше [35, 62]. У цьому ж контексті варто відзначити, що наночастинок, отримані з використанням рослинних екстрактів, мають вищу антиоксидантну активність порівняно з наночастинками, синтезованими хімічним методом, що зумовлено наявністю флавоноїдів і фенольних сполук. У роботі [62] біосинтезовані наночастинок продемонстрували значну цитотоксичність щодо ракових клітинних ліній і при цьому не спричиняли суттєвої токсичності для нормальних клітин (у порівнянні зі стандартним хіміотерапевтичним препаратом — цисплатином). В іншому дослідженні [17] стверджується щодо зниження росту клітин раку легень (A549), ракових клітин шийки матки (HeLa), шляхом пошкодження ДНК та апоптозу через регуляцію генів-супресорів пухлин біосинтезованими наночастинками оксиду міді.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Синтез наночастинок оксиду міді за допомогою мікроводоростей *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella kessleri* та *Tetraselmis suecica*

2.1.1. Підготовчі роботи. У роботі [65] використовували культури мікроводоростей *Dunaliella tertiolecta* і *Tetraselmis suecica*, що були надані компанією Biorganix Mexicana зі своєї приватної колекції. Штам *Chlorella kessleri* (CDBB-A-12) був отриманий з національної колекції мікробних штамів та

клітинних культур (Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares) від Центру досліджень та підвищених навчань Національного політехнічного інституту (“Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional”). Штами культивувалися у середовищі f/2 для солоноводних штамів та середовищі Bold для *C. kessleri*. Весь матеріал стерилізувався в автоклаві перед використанням, а всі посіви проводилися в ламінарному боксі при асептичних умовах.

2.1.2. Культивування мікроводоростей *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella kessleri* та *Tetraselmis suecica*. Колби Ерленмейера об'ємом 250 мл, наповнені 150 мл середовища, були інокульовані з концентрацією 3×10^5 клітин/мл⁻¹. Усі експериментальні зразки забезпечувалися постійною аерацією, освітлювалися на основі колб 17-ватною білою люмінесцентною лампою (Phillips ALTO II T8) та інкубувалися при температурі 23 °C. Прозорий полікарбонатний лист використовувався як підставка для експериментальних зразків. Освітлення тривало 12 годин, чергуючись з 12 годинами темряви. Процес моніторився протягом 18 днів після інокуляції (0, 3, 5, 7, 9, 13, 15 та 18 днів), і 1 мл зразка брали з кожного експериментального блоку для негайного аналізу.

2.1.3. Вимірювання фотосинтетично активного випромінювання. Фотосинтетично активне випромінювання (ФАВ) вимірювали за допомогою квантового сенсора (LightScout 3681) на поверхні полікарбонатного листа. Отримані дані про ФАВ відповідали рівню випромінювання на основі колби. Було поєднано фактори низького (–) (50 мкмоль фотонів м⁻²с⁻¹) та високого освітлення (+) (230 мкмоль фотонів м⁻²с⁻¹) з низькою та високою солоністю (табл. 2.1) Для кожного штаму

проводилося по чотири обробки, кожна з трьома повтореннями.

Таблиця 2.1

Експериментальна матриця з комбінаціями освітлення та солоності, які відповідають умовам обробки 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

2.1.4. Аналітичні методи характеристики. Для кожного зразка, відібраного з експериментальної установки у визначені дні, проводили підрахунок клітин, вимірювали рН (Horiba, Laqua twin S010) та електропровідність (Horiba, Laqua twin S070). Підрахунок клітин проводився за допомогою камери Нойбауера тричі для кожної експериментальної одиниці в дні оцінки. Швидкість росту (GR) обчислювалася за формулою:

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

де x_2 і x_1 – концентрація клітин у моменти часу на дні t_2 і t_1 відповідно.

Для визначення об'єму клітин використовувався загальний метод розрахунку об'єму клітин на основі геометричних формул. Для *C. kessleri* застосовувалася формула для сфери, а для *D. tertiolecta* та *T. suecica* — формула для витягнутого сфероїда [64]. За допомогою оптичного мікроскопа та програми Axion Vision 4.8 було виміряно 30 клітин для кожного обробленого зразка, а також виміряно екваторіальний діаметр кожної клітини. У випадку *D. tertiolecta* та *T. suecica* додатково вимірювали довжину клітин. Значення середнього об'єму клітин у кожному обробленому зразку та густоти популяції використовувалися для розрахунку об'єму культури на мілілітр. Для кількісного визначення фотосинтетичних пігментів відбиралося 2 мл культури, зразки центрифугували при 8000 об/хв протягом 15 хвилин, і виділяли утворений осад. Осад змішували з 1 мл етанолу та обробляли ультразвуком (Bransonіc 1510R-DTH) протягом 15 хвилин. Після 24 годин зберігання при низькій температурі вимірювали абсорбцію на довжинах хвиль 470, 653 та 666 нм.

2.1.5. Біосинтез наночастинок міді. Після 18 днів культивування популяції були підраховані для розрахунку доз сульфату міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ реактивної якості, Fermont) для кожної обробки. Максимальна популяція кожного штаму бралася за основу з концентрацією 0,5 мМ сульфату міді. Концентрація CuSO_4 була відкоригована пропорційно кожній обробки відповідно

до клітинної популяції, щоб забезпечити однакову концентрацію CuSO_4 на клітину. Через 72 години після застосування сульфату міді (21 день після інокуляції), кожен експериментальну одиницю поділили на чотири колби по 20 мл зразка в кожній. Дві колби залишили як вихідну експериментальну одиницю (клітини в їхньому культуральному середовищі), а дві інші колби були без клітин, містили лише культуральне середовище. Колби без клітин отримували шляхом центрифугування (Hermle Z 206 A) при 6000 об/хв протягом 15 хвилин і відокремлення супернатанту.

2.1.6. УФ-видима спектроскопія. Через 72 години впливу міді було проведено оцінку за допомогою УФ-видимої спектроскопії (Thermo Scientific, Genesys 10S) для виявлення сформованих наночастинок міді (CuNPs). Аналізована область від 200 до 700 нм показала характерні піки поглинання для ідентифікації наночастинок міді. Поверхневий плазмонний резонанс на поверхнях сферичних CuNPs знаходиться у видимому діапазоні з максимальною абсорбцією між 520 і 580 нм, тоді як виявлення різних типів наночастинок оксиду міді (CuONPs) відбувалося в УФ-області спектру, що узгоджується з інформацією наявною в літературі [48]. Зразки зберігалися в умовах значення температури $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ для подальшого аналізу методом скануючої електронної мікроскопії (SEM) (Hitachi SU8010) при прискорювальній напрузі 3,0 кВ.

2.1.7. Статистичний аналіз. Статистичний аналіз виконували в програмі R, використовуючи тест Дункана ($\alpha \leq 0.05$) для

порівняння середніх значень за допомогою пакета agricolae. Вплив освітлення та солоності на кінцеву чисельність популяції та об'єму оцінювали за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA 2 × 2), що є розповсюдженим статистичним методом визначення кореляцій набору факторів на різні процеси [49]. Якщо дані не відповідали припущенню про нормальність розподілу, їх змінювали за допомогою пакета car для R [65].

2.2. Синтез наночастинок оксиду міді за допомогою екстракту мікроводоростей *Botryococcus braunii*

2.2.1 Підготовчі роботи. У роботі [11] використовували культуру водорості *Botryococcus braunii*, яка була зібрана з озера Удайсагар, Удайпур (Раджастхан, Індія). Агар-агар та ацетат міді мають аналітичну чистоту та були придбані у компанії Sigma-Aldrich. Бактеріальні штами *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 441), *Escherichia coli* (MTCC 442), *Klebsiella pneumoniae* (MTCC 109) та *Staphylococcus aureus* (MTCC 96), а також штам грибів *Fusarium oxysporum* (MTCC 2087) були отримані з колекції мікроорганізмів Microbial Type Collection, Чандігарх, Індія.

2.2.2. Ізоляція, культивування та приготування екстракту мікроводоростей *Botryococcus braunii*. Зелена водорість була ізольована методом серійного розведення та вирощувалася на живильному середовищі Chu-13, зміцненому 1,5% агар-агару. Колонії мікроводоростей, що з'явилися після трьох тижнів інкубації, були виділені та інокульовані в рідке середовище. Для експериментів мікроводорості вирощували для отримання біомаси у інкубаторі за температури $27 \pm 1^\circ\text{C}$, при інтенсивності світла $1,2 \pm 0,2 \text{ klx}$ та світло-

темновому циклі 16:8 год у живильному середовищі. Отриману біомасу водоростей центрифугували, висушували в тіні та додавали 5 г біомаси у 250 мл колбу Ерленмейера разом із 100 мл дистильованої води. Суміш автоклаували протягом 15 хвилин та проводили гарячу фільтрацію через фільтрувальний папір Whatman №1. Очищений екстракт центрифугували, а супернатант використовували як відновник для приготування наночастинок. Підготовлений екстракт мікроводоростей зберігали в холодильнику при температурі 4°C для подальшого використання.

2.2.3 Біосинтез наночастинок міді. До 50 мл водного розчину 1 мМ ацетату міді у 100 мл колбі Ерленмейера додавали 5 мл екстракту мікроводоростей краплями при інтенсивному перемішуванні за температури 100°C протягом 24 годин. Одночасно підтримували позитивний контроль (розчин ацетату міді з екстрактом мікроводоростей) та негативний контроль (тільки водний розчин ацетату міді) в аналогічних умовах. У позитивному контролі вже через три години світло-блакитний розчин набув темно-коричневого забарвлення, що вказувало на утворення наночастинок міді. У негативному контролі зміни кольору не спостерігалось. Хід реакції контролювали шляхом спостереження за зміною кольору та запису УФ-видимого спектра. Після завершення процесу реакційну суміш центрифугували 15 хвилин, а отриманий осад повторно диспергували та промивали дистильованою водою. Процес відокремлення та промивання проводили тричі, щоб забезпечити належне очищення CuNPs. Отримані НЧ висушували в сушильній шафі для подальшої характеристики.

2.2.4. Методи фізико-хімічної характеристики наночастинок міді. Біовідновлення іонів металів у розчині контролювали за допомогою UV-Vis NIR спектрофотометра (модель Cary series), реєструючи спектри в діапазоні 200–800 нм для кожного зразка, використовуючи дистильовану воду як контрольний

зразок. FTIR-аналіз проводили на FTIR-спектрометрі (PerkinElmer) у діапазоні 4000–450 cm^{-1} , використовуючи висушені порошки наночастинок міді. Зразки для аналізу готували за кімнатної температури, змішуючи їх із KBr. Рентгенівську дифракцію (XRD) виконували на рентгенівському дифрактометрі Philips Xpert pro XRD (DY 1650). Форму та розмір НЧ аналізували за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEM), отримуючи зображення за допомогою скануючого електронного мікроскопа (модель FEI Quanta 200 SEM).

2.2.5. Антимікробна активність синтезованих наночастинок міді.

Антимікробну активність наночастинок оцінювали за допомогою методу агарових лунок, а мінімальну інгібуючу концентрацію (MIC) визначали методом розведення в мікробульйоні [21]. У дослідженні використовували дві грампозитивні бактеріальні культури: *Klebsiella pneumoniae* (MTCC 109) і *Staphylococcus aureus* (MTCC 96), дві грамнегативні бактеріальні культури: *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 441) і *Escherichia coli* (MTCC 442), а також штам гриба *Fusarium oxysporum* (MTCC 2087). Бактеріальні культури зберігали у чашках Петрі на поживному агарі (NA) при 37°C, а гриб *Fusarium oxysporum* – на картопляно-декстрозному агарі (PDA) при 25°C. Усі культури регулярно пересівали і зберігали при 4°C.

Метод лунок використовували для оцінки антибактеріальної активності синтезованих НЧ. Поживний агар, що містить мікробний інокулят, рівномірно розподіляли по чашці Петрі. Після охолодження асептично утворювали лунку діаметром 8–10 мм за допомогою наконечника. У кожен лунку вносили 20–40 мкл розчину наночастинок із концентрацією 1000 мкг/мл, і чашки з агаром інкубували в стерильних умовах відповідно до вимог тестових мікроорганізмів. Наночастинки дифундували в агаризоване середовище та інгібували ріст мікроорганізмів. Антимікробну активність оцінювали за появою зони інгібування навколо лунки. Її діаметр вимірювали за допомогою прозорої лінійки, фіксуючи відстань від одного краю чистої зони до іншого.

Під час проведення методу розведення в бульйоні готували маточний розчин наночастинок з концентрацією 2000 мкг/мл. Для первинного тестування розчин розводили до концентрацій 1000 мкг/мл, 500 мкг/мл і 250 мкг/мл. Наночастинки, які виявили активність проти мікроорганізмів на цьому етапі, піддавали вторинному тестуванню, де їх розводили до концентрацій 200 мкг/мл, 100 мкг/мл, 50 мкг/мл, 25 мкг/мл, 12.5 мкг/мл і 6.250 мкг/мл. Для розведення використовували ДМСО (диметилсульфоксид) в якості розчинника. Найвищий ступінь розведення, який забезпечував щонайменше 99% інгібування росту мікроорганізмів, визначався як мінімальна інгібуюча концентрація (MIC). Значення MIC значною мірою залежить від розміру інокуляту, під час тестування у суміші повинно міститися приблизно 10^8 клітин/мл [11].

2.3. Синтез наночастинок оксиду міді за допомогою екстракту мікроводоростей *Anabaena cylindrica*

2.3.1 Підготовчі роботи. У роботі [16] використовували чисту культуру мікроводоростей *Anabaena cylindrica*, яка була отримана з Інституту біотехнології та вирощена у спеціальних середовищах для водоростей за асептичних умов з належним освітленням. Зразки з поверхні води (SW) були зібрані з озера, що розташоване в Калькутті, Індія. Місце збору зразків було обрано, оскільки вода з цих джерел використовується для пиття місцевими жителями. Клітинні лінії ссавців, включаючи клітини людського шлункового епітелію (AGS) та клітини яєчників китайського хом'яка (CHO), які застосовуються для досліджень на токсичність тестувальних речовин [72, 39], були придбані в Національному центрі клітинної науки (NCCS), Пуна, Індія. Клітинні лінії вирощували в середовищах RPMI 1640 та DMEM відповідно, з додаванням 10% (v/v) фетальної бичачої сироватки (FBS), 100 одиниць на

мілілітр пеніциліну та 100 мкг на мілілітр стрептоміцину. Клітини утримували в інкубаторі з вологістю при температурі 37 °C в атмосфері з 5% CO₂.

2.3.2. Приготування екстракту мікроводоростей *Anabaena cylindrica*.

Біомаса була висушена при температурі близько 50 °C протягом ночі в печі. Після висушування біомасу подрібнили в порошок, просіяли і зберігали в герметичному контейнері для подальшого використання. Приблизно 1 г висушених водоростей було взято на 100 мл стерильної дистильованої води в колбі об'ємом 250 мл та кип'ячено при 50 °C протягом близько 30 хв. Суміш охолоджувалася і фільтрувалася через фільтрувальний папір Whatman No-1, після чого зберігалася при 4 °C для подальшого використання у біосинтезі наночастинок.

2.3.3 Біосинтез наночастинок оксиду міді. 100 мл 1 mM розчину сульфату міді (CuSO₄·5H₂O, Merck, Індія) було взято в конічну колбу об'ємом 250 мл і розміщено на магнітному нагрівачі з мішалкою. Екстракт водоростей (2,5 г/100 мл; 5 г/100 мл і 10 г/100 мл) додавали краплями до розчину CuSO₄ з постійним перемішуванням при змінній швидкості обертання (500–1000 об/хв) при температурі 60 °C. Вплив pH на утворення наночастинок спостерігався шляхом зміни pH розчину від 6,2 до 10,2. Для спостереження ефекту pH використовували 0,1 (N) розчин гідроксиду натрію і 0,1 (N) розчин хлоридної кислоти аналітичної чистоти. Спостерігалася зміна кольору розчину, що свідчило про процес утворення наночастинок. Утворені наночастинок були неодноразово промиті дистильованою водою та відцентрифуговані. Початкову концентрацію розчину CuSO₄ змінювали від 0,5 до 2,5 mM. Промиті НЧ висушували в печі при 100 °C протягом 24 годин і зберігали в герметичному контейнері для подальшого використання.

2.3.4. Методи фізико-хімічної характеристики наночастинок оксиду міді. Розмір наночастинок був визначений за допомогою

аналізатора Zetasizer (Malvern Instruments, Великобританія). Поверхневу площу НЧ визначали за методом БЕТ за допомогою аналізатора площі поверхні Quantachrome (Autosorb-1; Quantachrome Instruments, США). Аналіз рентгенівської дифракції (XRD) був проведений для вивчення структури синтезованих наночастинок оксиду міді (CuONPs). Дані XRD зразка були записані за допомогою дифрактометра XPERTPRO (Philips, PANalytical, Нідерланди) в діапазоні 2θ від 10° до 80° із застосуванням рентгенівського випромінювання CuK α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), використовуючи нікелевий фільтр, при температурі 25°C , напрузі 45 кВ і силі струму 35 мА. Для визначення функціональних груп, присутніх у синтезованих НЧ, був проведений аналіз за допомогою інфрачервоної спектроскопії в діапазоні від 400 до 4000 cm^{-1} (Perkin Elmer, США). Структурну морфологію НЧ було визначено за допомогою сканувального електронного мікроскопа з польовою емісією (FESEM). Фотографії FESEM були отримані за допомогою Gemini Zeiss SupraTM 35 V P Model (Carl Zeiss, Німеччина) із прискорювальною напругою 4,9 кВ. FESEM у поєднанні з енергоспектральною дисперсійною спектроскопією (EDS) використовували для визначення елементного складу наночастинок. Аналіз за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа (TEM, Technai G2

30ST, FEI Company, США) був проведений для аналізу розміру, форми та морфології НЧ. Рентгенівська фотоелектронна спектроскопія (XPS, 5000 XPS-аналізатор, Versaprobe-II, США) була проведена для вивчення хімічного стану та складу отриманих НЧ. Зразки були аналізовані в межах від 0 до 1100 електронвольт (eV) для визначення енергії зв'язку електрона. Параметри визначення характеристик наведені в таблиці (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Параметри визначення характеристик наночастинок оксиду міді

№	Параметри	Використані прилади
1	Розмір частинок	Zetasizer (Malvern Instruments, Великобританія)
2	Площа поверхні	Метод БЕТ за допомогою аналізатора площі поверхні Quantachrome (Autosorb-1; Quantachrome Instruments, США)
3	Рентгенівська дифракція (XRD)	Дифрактометр XPERTPRO (Philips, PANalytical, Нідерланди)
4	Сканувальний електронний мікроскоп з польовою емісією (FESEM) та енергодисперсійна рентгенівська спектроскопія (EDS)	Gemini Zeiss Supra™ 35 V P Model (Carl Zeiss, Німеччина)
5	Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є (FTIR)	Perkin Elmer, США

6	Аналіз за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа (TEM)	Technai G2 30ST, FEI Company, США
7	Рентгенівська фотоелектронна спектроскопія (XPS)	5000 XPS-аналізатор, Versaprobe-II, США

2.3.5. МІК (мінімальна інгібуюча концентрація) та антибактеріальна активність наночастинок оксиду міді. Антибактеріальна активність синтезованих наночастинок оксиду міді була досліджена проти патогенних бактерій *Escherichia coli*. Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) наночастинок визначалася за методом розведення в бульйоні. Якщо мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) — це найнижча концентрація, при якій зростання бактерій інгібується, то мінімальна бактерицидна концентрація (МБК) — це концентрація, при якій зростання бактерій повністю припиняється під дією антибіотиків/антибактеріальних агентів [75]. До 10 мл поживного бульйону додавали різні концентрації НЧ (5–100 мкг/мл) напротивагу ампіциліну як стандартному антибіотику. До кожного бульйону додавали приблизно 10 мкл бактеріальних клітин (*E. coli*), і пробірки з бактеріальними клітинами та наночастинами інкубували при 37 °С протягом 24 годин, спостерігаючи за ростом або появою каламутності в бульйоні. Цю концентрацію використовували для проведення дифузійного тесту в лунках. Для цього культури *E. coli* асептично висівали на стерилізовані чашки з агаром, що містять живильне середовище. Наночастинки (5–100 мкг/мл) додавали в 5 лунок діаметром 5 мм, і інкубували чашки при 37 °С протягом 24 годин. Експерименти проводили в трьох повтореннях, а антимікробну активність оцінювали за діаметром зони інгібування, яка утворювалася навколо лунок. Цей метод є стандартним для визначення антибактеріальної активності досліджуваної речовини і використовується у більшості досліджень [24].

2.3.6. Вплив наночастинок оксиду міді на бактерії у питній воді.

Найбільш ймовірну кількість (MPN) бактеріальних клітин було проаналізовано одразу після збору води з поверхні (SW) озера, де відповідно було отримано аналізовані зразки. Фізичні характеристики зразків, що використовувалися, наведено в таблиці (табл. 2.3). В 250 мл конічну колбу було додано приблизно 100 мл кожного зразка і оптимізовану дозу наночастинок оксиду міді, та закривали ватно-марлевими пробками для запобігання контамінації. Зразки асептично відбирали і аналізували на наявність бактеріальних колоній за методом штрихових посівів на 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45 та 60 хвилин, а також проводили аналіз з метою визначення MPN. Чашки Петрі та пробірки для MPN-аналізу інкубували при 44 °C протягом 24 годин і оцінювали ріст бактеріальних колоній. MPN методологія є поширеною практикою у випадках коли постає завдання визначення кількості бактеріальних клітин у зразках води [38].

Таблиця 2.3

Фізичні характеристики поверхневої води

Параметри	Значення
pH	7,64
Каламутність (NTU)	17,5
Загальна кількість розчинених твердих речовин (TDS, мг/л)	9,4
Хімічне споживання кисню (COD, мг/л)	41,5
Електропровідність ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	7,2
MPN (на 100 мл)	16 000
Сульфати (мг/л)	27,5

Хлориди (мг/л)	185
Натрій (мг/л)	14,2
Калій (мг/л)	0,8
Кальцій (мг/л)	5,7
Магній (мг/л)	0,6

2.3.7. Тест на токсичність наночастинок оксиду міді для живих організмів. Широке застосування наноматеріалів зрештою призводить до потрапляння їх в водне середовище, що викликає занепокоєння і шкідливий вплив на водні організми. Тому проводяться численні дослідження в контексті розробки біосинтезованих наночастинок з метою визначення їх токсичності [1], і в контексті даної роботи було обрано модель *Channa punctatus*. Експериментальна група була представлена *Channa punctatus*, що зазнали впливу оптимізованої дози (40 мкг/мл) наночастинок оксиду міді, концентрація якої була визначена за допомогою методу лунок. Контрольну групу складали риби, які перебували у прісній воді. Дослідження тривало 15 днів з трьома повтореннями, відбиралися зразки крові з хвостової вени риб кожного дня за допомогою одноразового шприца, покритого ЕДТА. Відразу після забору крові робилися мазки на чисті скельця і залишали їх для висихання на повітрі протягом 12 годин. Далі фіксували метанолом і забарвлювали 5% розчином Гімза на 5 хвилин. Важливо зазначити, що зразки води відбирали як з контрольної, так і з експериментальної групи для аналізу можливого вимивання міді з CuONPs за допомогою іонної хроматографії.

Вплив наночастинок оксиду міді на життєздатність клітин ссавців був досліджений за допомогою МТТ-аналізу, який базується на перетворенні МТТ на

кристали формагану мітохондріальними дегідрогеназами. Клітини CHO та AGS (1×10^4 клітин на лунку) висівали у кожен лунку 96-лункового планшета. Після нічної інкубації клітини обробляли різними концентраціями CuONPs протягом 24 та 48 годин, і далі до кожної лунки додавали 100 мкл 0,5% (w/v) розчину МТТ, розчиненого в фосфатному буфері (PBS), і клітини інкубували при 37 °C протягом 4 годин. Після цього культуральне середовище було видалено, і до кожної лунки додавали 150 мкл DMSO для розчинення кристалів формагану. Абсорбцію вимірювали при довжині хвилі 490 нм за допомогою мікропланшетного спектрофотометра. У літературі також є інформація про застосування МТТ-аналізу з метою оцінки цитотоксичності наночастинок оксиду міді для клітин раку шийки матки (HeLa) [2], а також ракових клітин шлунка (AGS) [13].

2.3.8. Аналіз морфологічних змін клітин ссавців у відповідь на дію наночастинок оксиду міді. Аналіз з використанням акридину помаранчевого/етридіум броміду (АО/ЕВ) та DAPI були проведені з метою відрізнити живі клітини від тих, що перебувають на стадії апоптозу або некрозу, а також для оцінки морфологічних змін клітин після впливу CuONPs. Клітини AGS та CHO обробляли НЧ протягом 12 і 24 годин. Цей метод забарвлення поєднує диференціальне поглинання флуоресцентних барвників, що зв'язуються з ДНК, а також морфологічні зміни хроматину, які відбуваються в ядрі клітини. Він дозволяє розрізняти життєздатні, апоптичні та клітини, що зазнали некрозу. Акридин помаранчевий проникає в усі клітини і, зв'язуючись з дволанцюговою ДНК, світиться зеленим. У свою чергу, етридіум бромід проникає лише в нежиттєздатні клітини, вбудовується в їх ДНК і світиться яскраво-червоним або помаранчевим [47]. Таким чином, живі клітини забарвлюються рівномірно в яскраво-зелений колір; ранні апоптичні клітини мають яскраво-зелені забарвлені ділянки конденсованого або фрагментованого хроматину в ядрі; а клітини, що зазнали некрозу, мають рівномірно яскраво-помаранчевий колір. Після обробки

клітин наночастинками, до них додаються барвники АО/ЕВ в концентрації 100 мкг/мл і DAPI (10 мМ), який є флуоресцентним барвником, що зв'язується з ДНК, або частково вбудовується, і фарбує ядро клітин у синій колір [15]. Потім клітини інкубуються при кімнатній температурі в тіні протягом 30 хвилин перед спостереженням під флуоресцентним мікроскопом Olympus для оцінки їхнього стану [16].

2.4. Синтез наночастинок оксиду міді за допомогою мікроводоростей *Zygnema sp.*

2.4.1. Підготовчі роботи. У роботі [4] використовували *Zygnema sp.*, досліджена, ідентифікована, культивована і очищена на безмікробному середовищі Chu-10, яке містить: 0,10 мг/л K_2HPO_4 , 0,40 мг/л KNO_3 , 0,40 мг/л $CaCl_2$, 0,20 мг/л Na_2SiO_3 , 0,25 мг/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,30 мг/л лимонної кислоти, 0,30 мг/л ферум цитрату, 0,50 мг/л $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,50 мг/л H_3BO_3 , 0,01 мг/л $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,02 мг/л $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Після зростання біомаса була зібрана, висушена протягом 5 днів у тіні, а потім подрібнена до порошкоподібного стану для подальших досліджень. У подальшому для аналізу активності створених наночастинок оксиду міді проти грибів використовували різні гриби, зокрема *Aspergillus flavus*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporium* та *Mucor circinelloid*.

2.4.2. Біосинтез наночастинок оксиду міді. Був підготовлений 1 мМ водний розчин ацетату міді як прекурсор. 10 мл екстракту *Zygnema sp.* (5% г/в) було додано до 100 мл підготовленого прекурсора в скляну колбу об'ємом 250 мл для синтезу CuONPs. Реакційну суміш інтенсивно перемішували протягом 18 годин при 80 °C. Через 7 годин колір змінився з яскраво-синього на темно-коричневий, що було ознакою утворення CuONPs. Водний розчин мідного ацетату (1 мМ) без екстракту *Zygnema sp.* використовувався як негативний контроль у тих самих умовах. Розчин, що містить CuONPs, був центрифугований

протягом 15 хвилин при 10000 об/хв. Осаджені CuONPs були повторно дисперговані та очищені за допомогою деіонізованої води для видалення небажаних залишків, зібрані та висушені в печі для подальших етапів характеристики.

2.4.3. Ідентифікація та первинна характеристика синтезованих наночастинок оксиду міді. Для виявлення синтезованих CuONPs використовувався УФ-видимий спектрофотометр (Nicolet evolution 100, Cambridge, MA, США) у діапазоні довжин хвиль від 200 до 700 нм. Для визначення розміру та форми синтезованих CuONPs використовувався трансмісійний електронний мікроскоп (TEM) (JEOL JEM-2100, Токіо, Японія). Синтезовані наночастинок оксиду міді розчинили у воді, після чого наносили на сітку TEM і висушували перед дослідженням. Аналіз за допомогою Фур'є-інфрачервоної спектроскопії (FTIR) (Agilent Cary 630 FTIR) із застосуванням таблеток з калій броміду (KBr) був проведений для визначення функціональних груп, що сприяють утворенню CuONPs. Частоти в діапазоні 4000–400 cm^{-1} були виміряні з роздільною здатністю 4 cm^{-1} . Кристалічність синтезованих CuONPs була визначена за допомогою рентгенівського дифрактометра X'Pert Pro (Philips, Ейндховен, Нідерланди) (XRD) при температурі від 4 до 70 °C у діапазоні 2 θ . Рентгенівські промені для аналізу створювались за допомогою мідного анода, через нікелевий фільтр, при напрузі 40 кВ і струмі 30 мА.

2.4.4. Активність створених наночастинок оксиду міді проти бактерій і *Candida albicans*. Для аналізу використовували різні бактерії, зокрема *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Escherichia coli* ATCC8739, *Salmonella typhi* (ATCC 6539), *Enterococcus faecalis* (ATCC 10,541), а також дріжджі *Candida albicans* ATCC 10,221. Тестовані бактерії інокулювали на агар-агарі в чашках Петрі, а *Candida albicans* інокулювали на поверхні агару із екстрактом солоду методом посіву штрихом. У шарі агару робили лунки (6 мм), після чого в кожную лунку додавали 100 мкл наночастинок оксиду міді. Амоксицилін (20 мкг/мл)

використовувався як стандартний антибіотик, а клотримазол (1000 мкг/мл) — як стандартний протигрибковий засіб. Активність НЧ порівнювали також з ацетатом міді при тій самій концентрації та умовах. Підготовлені чашки Петрі витримували 20 хвилин при 5 °С, щоб дати змогу досліджуваним речовинам проникнути в агар до початку росту мікроорганізмів. Після цього їх інкубували 24 години при 37 °С, вимірюючи утворені зони інгібування навколо лунок.

2.4.5. Активність створених наночастинок оксиду міді проти грибів.

Експеримент проводили на агаризованому середовищі у чашках Петрі, де середовище поділяли на варіанти: без додавання CuONPs, з додаванням ацетату міді, а також з додаванням комерційного фунгіциду — оксихлориду міді. Окрім контрольних варіантів, використовували середовища, збагачені різними концентраціями тестованої речовини (50, 100 і 200 ppm). На центр кожної чашки висаджували фрагмент грибу діаметром 6 мм і інкубували протягом 6 днів при температурі 28 °С. Оцінку розвитку грибів здійснювали шляхом порівняння радіуса колоній досліджуваних грибів із радіусом колоній у контрольних зразках.

2.4.6. Фотокаталітичне розкладання барвників за допомогою наночастинок оксиду міді. Опромінення барвників у фотокаталітичній системі призводить до їх розкладу під дією активних форм кисню (ROS), зокрема гідроксильних радикалів ($\cdot\text{OH}$) [29]. Фотокаталітичну активність наночастинок досліджували для розкладання двох барвників — RR195 і RB — упродовж різного часу (від 15 до 105 хвилин) і при різних температурах (від 10 до 50 °С). Фотокаталітична реакція складалась з 50 мл розчину барвника (10 мг/мл) та 50 мкг/мл НЧ. Суміш для фотокаталітичної реакції інкубували під дією сонячного

світла протягом заданого часу. Також, у межах того ж експерименту, реакційну суміш інкубували при різних температурах протягом оптимального часу, встановленого в результаті попереднього експерименту. Після кожного проміжку часу та при кожному значенні температури розчин центрифугували при 10000 об/хв впродовж 5 хвилин. Оптичну густину отриманого супернатанту вимірювали за допомогою УФ–видимого спектрофотометра (JENWAY 6305) на довжині хвилі 538 нм для барвника RR195 і 554 нм — для RB відповідно [4]. Ефективність розкладання (DE), або відсоток розкладу, барвників наночастинками оксиду міді обчислювали за наступною формулою:

$$DE\% = \frac{\text{Initial absorbance} - \text{Final absorbance}}{\text{Initial absorbance}} \times 100 [29].$$

2.5. Синтез наночастинок оксиду міді за допомогою екстракту мікроводоростей *Coelastrella terrestris*

2.5.1. Підготовчі роботи. У роботі [46] для біологічного синтезу наночастинок оксиду міді, фотокаталітичних експериментів та аналізу антибактеріальної активності, використовували мікроводорість *Coelastrella terrestris* (номер у базі NCBI: MK294227.1), яка була отримана з кафедри ботаніки Університету Моханлала Сухадії, Удайпур, Раджастхан, Індія. Усі придбані хімічні реактиви були придбані в компанії Himedia, LOBA Chemie Pvt. Ltd. та Merck, аналітичного класу чистоти й використовувалися без додаткового очищення. Протягом експерименту використовувалися стерильні матеріали, щоб уникнути контамінації культур. У цьому дослідженні для вирощування

Coelastrella terrestris використовувалося поживне середовище BG-11. Культивування проводили у пробірках об'ємом 50 мл, які містили 20 мл середовища BG-11, при температурі 27 ± 1 °C, освітленості 14,5 Вт/м² та світловому режимі 16 годин світла і 8 годин темряви. Для отримання великої кількості біомаси культуру поступово пересівали: спочатку у колби Ерленмейера об'ємом 250 мл, а потім у більші колби об'ємом 1000 мл. Культури підтримували у стабільних умовах шляхом регулярної заміни середовища та збирали під час експоненційної фази росту. Надалі для оцінки антимікробної активності використовували два тестові патогени — *S. aureus* (грампозитивний) та *Pseudomonas aeruginosa* (грамнегативний) — були отримані з медичного коледжу Джайпуру, Раджастхан, Індія. Отриману культуру патогенів пересівали та зберігали у бульйоні Лурія-Бертані (Hi-media) для подальшого використання. Вміст гліцерину підтримували у співвідношенні 7:3 (v/v) при –80 °C.

2.5.2. Приготування екстракту мікроводоростей *Coelastrella terrestris*.

Зібрану біомасу водоростей центрифугували при 5000 об/хв протягом 15 хвилин за кімнатної температури. Отриманий осад збирали та тричі промивали деіонізованою водою, тоді як супернатант видаляли. Після цього осад висушували в сушильній шафі при температурі 35 °C протягом 24 годин. Суху біомасу подрібнювали в порошок за допомогою ступки та товкача до отримання дрібнодисперсної маси. У цьому дослідженні було зазначено, що оптимальною є концентрація 5 г/100 мл екстракту водоростей для синтезу наночастинок оксиду міді, тому для даного дослідження була обрана така сама концентрація. Для цього 5 г порошку водорості розчиняли у 100 мл деіонізованої води та витримували у водяній бані при 45 °C протягом 30 хвилин. Отриманий водний екстракт центрифугували при 5000 об/хв, і супернатант використовували для біосинтезу НЧ.

2.5.3. Біосинтез наночастинок оксиду міді. Біосинтез наночастинок оксиду міді здійснювався за допомогою простої методики співосадження (рис. 2.1).

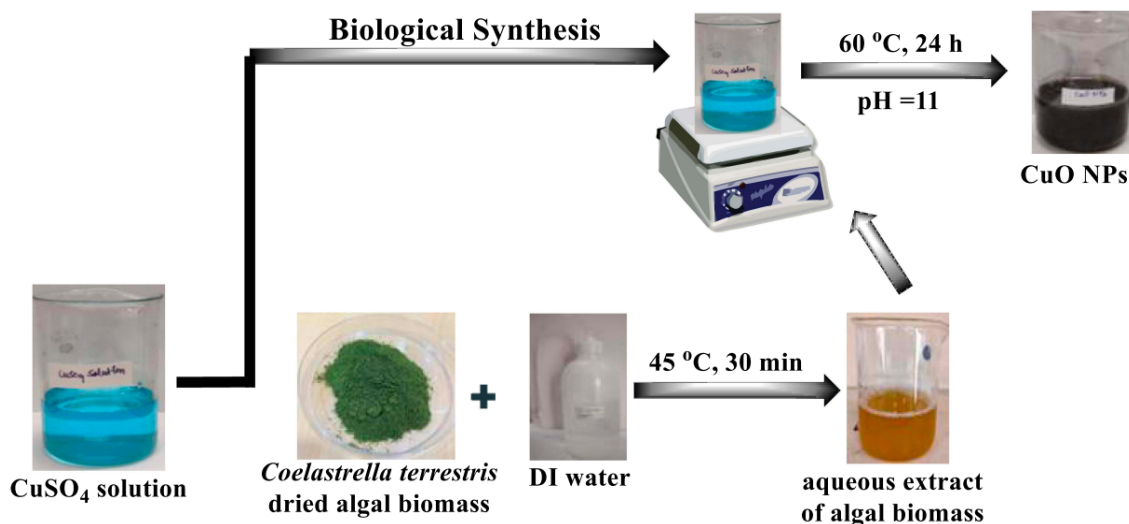


Рис. 2.1. Схематичне зображення біологічного синтезу наночастинок оксиду міді).

У мірну склянку об'ємом 250 мл поміщали 100 мл 0,2 М розчину мідного купоросу та нагрівали до температури 60 °С. При цій самій температурі до розчину мідного купоросу при постійному перемішуванні додавали 15 мл приготованого водного екстракту мікроводоростей. Потім у реакційну суміш по краплі додавали 0,1 N розчин NaOH до досягнення рН 11. Суміш перемішували безперервно протягом 24 годин при 60 °С. Після 24 годин розчин, що містив НЧ, центрифугували, залишкову біомасу мікроводоростей відокремлювали та видаляли, а НЧ промивали тричі деіонізованою водою. Отримані НЧ висушували в сушильній шафі при температурі 80 °С протягом ночі та зберігали в герметичному контейнері для подальшого використання. Змінюючи об'єм розчину екстракту водоростей, можна було суттєво контролювати розмір і форму синтезованих наночастинок оксиду міді. Вплив об'єму екстракту на формування НЧ досліджувався для трьох різних значень (15 мл, 20 мл та 25 мл) при незмінних інших параметрах. Позначення CuO-1, CuO-2 та CuO-3 відповідали

наночастинкам, синтезованим за допомогою 15 мл, 20 мл та 25 мл екстракту водоростей відповідно.

2.5.4. Фізико-хімічна характеристика синтезованих наночастинок. За допомогою різноманітних методів характеристики було визначено структурні, оптичні та морфологічні властивості синтезованих НЧ. При кімнатній температурі рентгенівські дифракційні (XRD) спектри були отримані в діапазоні $2\theta = 30^{\circ} - 70^{\circ}$ з використанням рентгенівського дифрактометра Rigaku Ultima IV (Японія) з CuK-випромінюванням довжиною хвилі 1,5406 Å. За допомогою XRD-спектрів було проаналізовано структуру, орієнтацію, розмір кристалітів та щільність дислокацій. Для визначення функціональних груп, присутніх у мікрowodоростях і синтезованих НЧ, проводили фур'є-інфрачервону спектроскопію (FTIR) (Bruker Alpha, США) у діапазоні 400–4000 cm^{-1} . Дослідження УФ-видимого спектру поглинання проводились у діапазоні довжин хвиль 200–800 нм за допомогою спектрофотометра Hitachi UH5300 з метою визначення ширини забороненої зони матеріалу за методом Тауца.

Польова емісійна скануюча електронна мікроскопія (FESEM) у поєднанні з енергодисперсійною рентгенівською спектроскопією (EDS) (JEOL-7610F) використовувалася для дослідження форми та елементного складу наночастинок. Розподіл НЧ за розміром визначали за допомогою аналізатора Zetasizer (Malvern Instruments, Велика Британія). Спектр поглинання барвника в УФ-видимому діапазоні отримували у 4 мл скляній кюветі за допомогою спектрофотометра Systronics 2371. Цифровий рН-метр (Hanna) застосовували для вимірювання рН розчину. Вміст розчинених речовин (TDS) у розчині барвника визначали за допомогою TDS-метра HM Digital. Електропровідність розчину вимірювали за допомогою кондуктометра на базі мікроконтролера (Systronics). Хімічне споживання кисню (COD) визначали за допомогою приладу COD Digester (Royal

Scientific). Для обробки експериментальних даних та побудови графіків використовували програмне забезпечення OriginPro.

2.5.5. Антибактеріальна активність синтезованих наночастинок міді.

Мінімальну інгібуючу концентрацію (MIC) трьох біологічно синтезованих (CuO-1, CuO-2 і CuO-3) наночастинок оксиду міді визначали за допомогою тесту Кірбі-Бауера та методу агарових лунок. У чашки Петрі з агаром Мюллера-Хінтона (МН) наносили різні об'єми суспензії НЧ: 50 мкл, 75 мкл, 100 мкл, 150 мкл та 200 мкл разом із позитивним (антибіотик) та негативним контролем. Інокулят розводили до стандарту мутності 0,5 МакФарланда (приблизно 150 мільйонів клітин на мілілітр) і тестові патогени (*S. aureus* та *P. aeruginosa*) рівномірно наносили на поверхню чашек. Далі асептично утворювали лунки діаметром 6–8 мм і до кожної лунки додавали по 10–50 мкл розчину наночастинок оксиду міді у відповідній зазначеній вище концентрації. Чашки Петрі інкубували при температурі 34 °С протягом ночі, а наступного дня вимірювали зону інгібування (ZOI). Найнижча концентрація, що повністю пригнічувала ріст бактерій, визначається як мінімальна інгібуюча концентрація (MIC) кожного зразка НЧ.

Антибактеріальну активність синтезованих НЧ додатково оцінювали методом дискової дифузії (disc diffusion method), або тест Кірбі-Бауера, що також є стандартним методом досліджень антибактеріальної активності [50], проти патогенів *S. aureus* та *P. aeruginosa*. Різні чашки Мюллер-Хінтона рівномірно засівали обома тестовими штамами патогенів. Стерильні диски (HiMedia) просочували 100–150 мкл розчину НЧ і залишали на днях для висихання. Після висихання диски розміщували на інокульованій поверхні чашок. Зону інгібування бактерій вимірювали після 24 годин інкубації при температурі 34 °С.

2.5.6. Фотокаталітичне розкладання барвників за допомогою наночастинок оксиду міді.

Фотокаталітичну активність CuONPs досліджували шляхом вивчення деградації барвника AB10B під впливом видимого світла із

використанням комерційної лампи розжарювання потужністю 60 Вт (Philips). Для усунення всіх інших випромінювань, крім видимого світла, застосовували водяний світлофільтр. 0,05 г порошку CuONPs диспергували в 40 мл розчину барвника AB10B і витримували в темряві, повільно перемішуючи протягом 30 хвилин для встановлення рівноваги адсорбції/десорбції. Фотокаталітичну реакцію розпочинали після освітлення розчину джерелом світла, при цьому зразки обережно відбирали крапельницею кожні 15 хвилин, уникаючи захоплення частинок каталізатора. Швидкість фотодеградації оцінювали за допомогою вимірювання поглинання при 618 нм за допомогою УФ-видимого спектрофотометра. Параметри, такі як рН розчину барвника, концентрація барвника та кількість каталізатора, змінювали для досягнення оптимальних умов. рН розчину змінювали шляхом додавання 0,1 N розчинів H_2SO_4 та NaOH , які були попередньо стандартизовані. Усі фотокаталітичні експерименти виконувалися двічі для забезпечення точності та достовірності результатів. Було розраховано відсоток деградації барвника (ефективність розкладання, DE), а також константу швидкості фотодеградації (k) використовували рівняння побудови графіка першого порядку, припускаючи кінетику псевдопершого порядку:

$$\ln(C_0 / C_t) = kt \text{ [46].}$$

2.6. Синтез наночастинок оксиду міді за допомогою екстракту мікроводоростей *Chlorella vulgaris*

2.6.1. Підготовчі роботи. У роботі [60] культуру *Chlorella vulgaris* було отримано з Madras Christian College (Chennai) у стерильній конічній колбі та культивовано в середовищі Bold Basal. Ріст мікроводорості підтримувався при температурі 28 °C та освітленості 4000 люкс протягом 30 днів. Після 30 днів росту біомасу було зібрано, висушено у сушильній шафі при 45 °C протягом 24 годин

та гомогенізовано. Отриманий дрібний порошок зберігали при температурі 18 °С для подальших досліджень.

2.6.2. Приготування екстракту мікроводоростей *Chlorella vulgaris*.

Екстракт водоростей було приготовано шляхом додавання 1 г порошку *Chlorella vulgaris* до 100 мл ДМСО, після чого розчин перемішували на магнітній мішалці протягом 1 години. Потім розчин фільтрували за допомогою фільтрувального паперу Whatman, і збирали отриманий екстракт (рис. 2.6.1).



Рис. 2.2. А – отриманий дрібний порошок *Chlorella vulgaris*; В – підготовка екстракту мікроводоростей.

2.6.3. Біосинтез наночастинок оксиду міді. Було взято близько 100 мл 1 мМ ацетату міді, і 2 мл екстракту *Chlorella vulgaris* додавали по краплях. Реакційну суміш безперервно перемішували та інкубували протягом 42 годин при температурі 80–100 °С. Зміна кольору з блакитного на коричневий свідчила про утворення наночастинок оксиду міді. Реакційну суміш центрифугували при 14000 об/хв протягом 20 хвилин. Супернатант видаляли, а осад промивали водою і знову центрифугували. Цю процедуру повторювали тричі. Наночастинки оксиду міді осідали на дні пробірки, і потім осад розчиняли у ДМСО та знімали спектр у видимій/ультрафіолетовій області.

2.6.4. Методи фізико-хімічної характеристики наночастинок оксиду міді. Синтезовані наночастинок оксиду міді були досліджені за допомогою спектроскопії у видимій/ультрафіолетовій області. НЧ оцінювали в діапазоні довжин хвиль від 200 до 600 нм. Форма та розмір синтезованих НЧ визначалися за допомогою аналізу методом СЕМ (скануючої електронної мікроскопії). Для характеристики кристалічної структури CuNPs проводився рентгеноструктурний аналіз (XRD). Елементний склад підготовлених наночастинок визначали за допомогою аналізу EDAX.

2.6.5. Антибактеріальна активність синтезованих наночастинок оксиду міді. Антибактеріальну активність синтезованих CuNPs оцінювали методом мінімальної інгібуючої концентрації проти двох грамнегативних бактерій (*Escherichia coli* та *Klebsiella pneumoniae*) і двох грампозитивних бактерій (*Staphylococcus aureus* та *Bacillus subtilis*), а також двох культур грибів (*Candida albicans* та *Aspergillus niger*) [60].

2.7. Синтез наночастинок оксиду міді за допомогою екстракту мікроводоростей *Arthrospira maxima*

2.7.1. Підготовчі роботи. Для проведення експериментальної частини дослідження [55] було використано мікроводорість *Arthrospira maxima*, які були придбані в компанії E2E Biotech Pvt Ltd (Бенгалуру, Карнатака, Індія). Отримані чисті культури *Arthrospira maxima* були розмножені на живильному середовищі CFTRI з додаванням 1,5% агар-агару для його зміцнення. Усі роботи з культурою проводились з дотриманням стандартних асептичних умов. Вирощування водоростей здійснювалося у спеціально обладнаному культивацийному приміщенні при температурі $27 \pm 1^\circ\text{C}$, інтенсивності світла $1,2 \pm 0,2$ Люкс та фотоперіоді 16:8 годин. Для підтримання життєздатності та активного росту культури регулярно проводилось пересівання у свіже поживне середовище.

Отриману біомасу *Arthrospira maxima* використовували для подальших експериментальних досліджень.

2.7.2. Приготування екстракту мікроводоростей *Arthrospira maxima*.

Для проведення біосинтезу НЧ були підготовлені як рідкі, так і сухі екстракти мікроводоростей *Arthrospira maxima*. Рідкий екстракт готували шляхом гомогенізації чистих клітин водоростей. Для цього відбирали 2 мл культури *Arthrospira maxima*, гомогенізували за допомогою скляних кульок до отримання однорідної суспензії та використовували безпосередньо для синтезу наночастинок. Для приготування сухого екстракту зразки водоростей спочатку збирали у чашки Петрі та висушували в сушильній шафі при температурі 60°C протягом ночі. Після повного висихання мікроводорості зіскрібали скальпелем, подрібнювали в порошок за допомогою ступки з товкачем до отримання однорідної дрібнодисперсної маси. Далі 2 г порошку розчиняли у 20 мл дистильованої води, після чого суміш центрифугували при 1800 об/хв протягом 20 хвилин. З отриманого супернатанту відбирали 2 мл, які використовували для біосинтезу.

2.7.3. Біосинтез наночастинок оксиду міді. Для біосинтезу наночастинок оксиду міді до 20 мл 1 мМ водного розчину ацетату міді поступово, по краплях, додавали 2 мл підготовленого екстракту *Arthrospira maxima*. Реакційну суміш постійно перемішували на магнітній мішалці при температурі 100–120°C протягом кількох годин. У ході реакції спостерігали поступову зміну кольору розчину: з синього він змінювався на коричневий, а згодом набув червоно-цегляного відтінку, що свідчило про утворення наночастинок оксиду міді.

2.7.4. Методи фізико-хімічної характеристики наночастинок оксиду міді. Отримані наночастинки оксиду міді піддавалися фізико-хімічній характеристиці з використанням УФ-видимої спектроскопії (UV-Vis), сканувальної електронної мікроскопії (SEM) та енергодисперсійного

рентгенівського аналізу (EDAX). З метою спостереження за відновленням іонів міді у розчині використовували спектрофотометр Shimadzu UV-1700, що складається з інструментів подвійного випромінювання. Спектри реєстрували в діапазоні від 200 до 1100 нм з інтервалом у 5 хвилин для кожного зразка, використовуючи дистильовану воду для контролю, роздільна здатність при цьому становила 5 нм. Для дослідження морфології поверхні та розміру синтезованих НЧ використовували сканувальний електронний мікроскоп TESCAN – VEGA 3. Хімічний склад і вміст елементів у зразку визначали методом енергодисперсійного рентгенівського аналізу за допомогою аналізатора X1 Analyzer AMETEX, що дозволило встановити наявність міді та інших елементів, які входили до складу отриманих НЧ [55].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Характеристика наночастинок міді синтезованих за допомогою мікроводоростей *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella kessleri* та *Tetraselmis suecica*

Найбільшу швидкість росту показав штам *C. kessleri* (табл. 3.1), з максимальними значеннями в період з 0 по 9 день, демонструючи уповільнення у період з 9 по 18 день. Умова, за якої швидкість росту зазнала найбільшого впливу для цього штаму, була L-S+ (низьке освітлення, висока солоність). Як освітлення, так і солоність показали значний вплив на кінцеву популяцію цього штаму без взаємодії між факторами (рис. 3.1, табл. 3.2). Менші популяції та більші клітини *C. kessleri* спостерігались в умовах високої солоності.

Табл. 3.1

Темпи росту мікробіодоростей (день⁻¹) — середні значення (± стандартне відхилення), отримані для кожного експерименту у різні часові інтервали. Середні значення, позначені однаковими літерами, не відрізняються статистично значуще

Штам	Обробка	Темпи росту мікробіодоростей (день ⁻¹)		
		0–9 дні	9–18 дні	0–18 дні
<i>C. kessleri</i>	L-S-	0.48 (0.027) ab	0.21 (0.017) a	0.70 (0.018) a
	L-S+	0.39 (0.027) cd	0.18 (0.033) ab	0.57 (0.043) bc
	L+S-	0.59 (0.047) ab	0.25 (0.011) a	0.75 (0.056) a
	L+S+	0.51 (0.062) ab	0.19 (0.041) ab	0.70 (0.040) a

<i>D. tertiolecta</i>	L-S-	0.51 (0.014) ab	0.06 (0.028) bc	0.58 (0.015) b
	L-S+	0.43 (0.024) bc	0.06 (0.031) bc	0.50 (0.028) efg
	L+S-	0.52 (0.001) a	0.02 (0.014) c	0.54 (0.013) bcd
	L+S+	0.49 (0.012) ab	0.03 (0.017) c	0.53 (0.005) cde
<i>T. suecica</i>	L-S-	0.28 (0.146) de	0.20 (0.180) ab	0.49 (0.033) g
	L-S+	0.21 (0.143) e	0.31 (0.150) a	0.52 (0.016) ef
	L+S-	0.26 (0.087) e	0.23 (0.082) a	0.50 (0.004) efg
	L+S+	0.31 (0.058) de	0.17 (0.059) ab	0.49 (0.023) fg

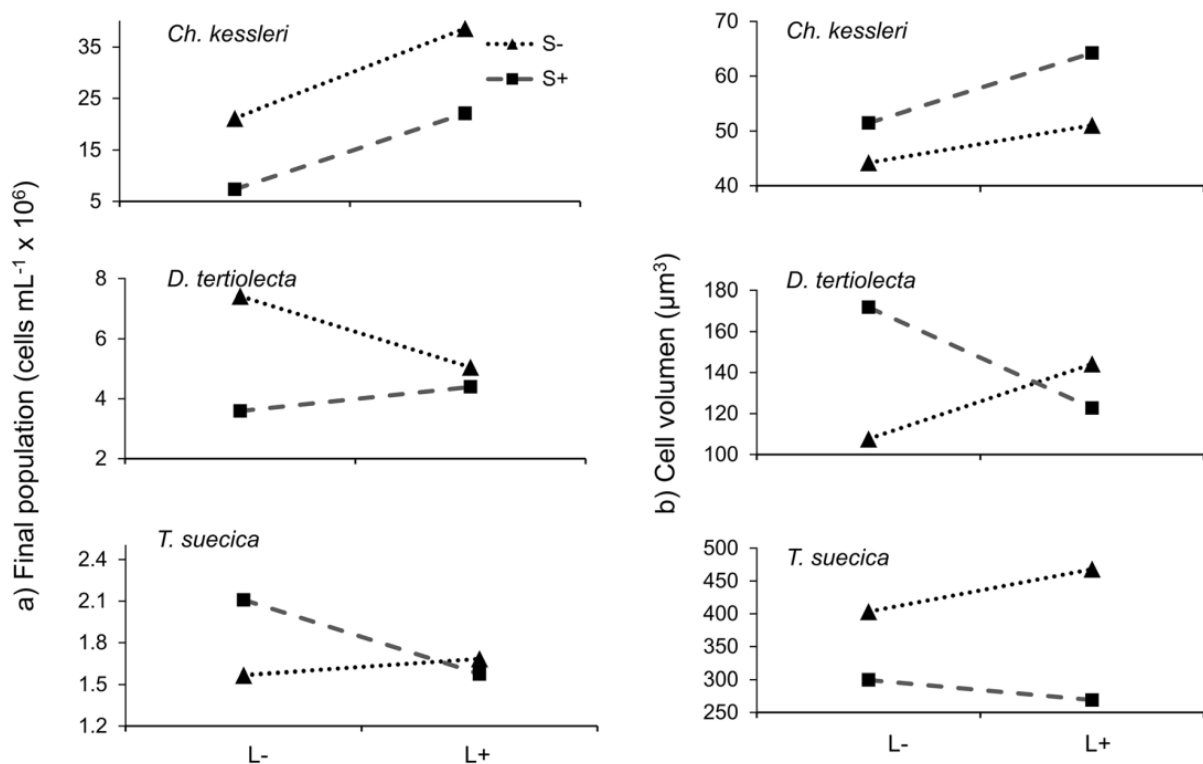


Рис. 3.1. Графіки взаємодії освітлення та солоності на: А — кінцеву популяцію та В — об'єм клітин на 18-й день культивування. Низька солоність позначена пунктирними лініями, висока — штриховими. Високий або низький рівень освітлення зазначено під кожною групою графіків.

Табл. 3.2

Рівні значущості (значення Р), отримані в результаті двофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) для оцінки впливу освітлення та солоності, а також їх взаємодії на: (а) кінцеву щільність популяції (n = 3) та (б) об'єм клітин (n = 30)

	(a) Кінцева популяція			(b) Об'єм клітин		
Штам	<i>C. kessleri</i>	<i>D. tertiolecta</i>	<i>T. suecica</i>	<i>C. kessleri</i>	<i>D. tertiolecta</i>	<i>T. suecica</i>
Освітленість	0.026	0.116	0.305	0.004	0.421	0.070
Солоність	0.034	0.001	0.287	0.144	< 0.001	< 0.001
Взаємодія	0.827	0.0073	0.125	0.277	< 0.001	< 0.001

Для *D. tertiolecta* найвища швидкість росту була зафіксована в період з 0 по 9 день; однак уповільнення росту спостерігалось в період від 9 до 18 днів, і у всіх варіантах досліду досягнуто стаціонарної фази (рис. 3.2). Вплив освітлення не був значущим як для кінцевої популяції, так і для клітинного об'єму *D. tertiolecta*; незважаючи на це, взаємодія освітлення із солоністю мали значний синергічний вплив на популяцію та клітинний об'єм (рис. 3.1).

Вміст фотосинтетичного пігменту варіювався між експериментами (рис 3.3), з найвищими значеннями хлорофілу в умовах L-S+, що могло бути пов'язано з адаптацією фотосинтетичного апарату до низького

освітлення та солоності, що відображено у варіаціях каротиноїдів.

Рис. 3.2. Криві зростання популяції. Пунктирні лінії — низький рівень освітлення, суцільна лінія — високий рівень освітлення, порожні трикутники —

низьке освітлення, зафарбовані трикутники — висока солоність. Дані представлені як середнє значення ($n = 3$), з відображенням стандартної похибки.

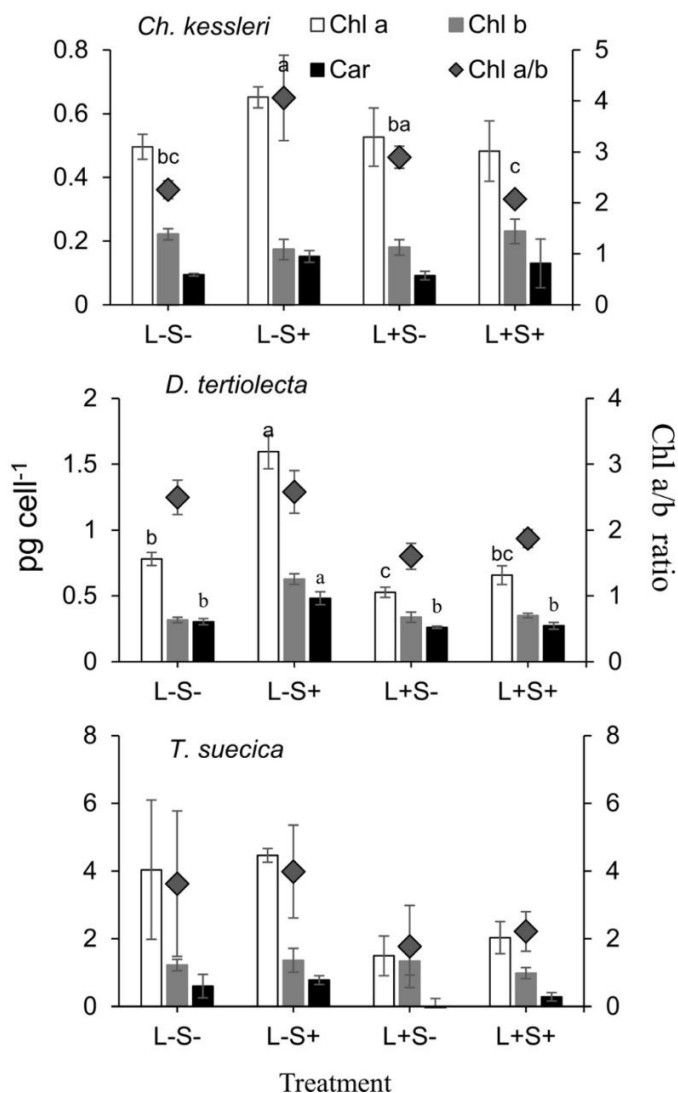
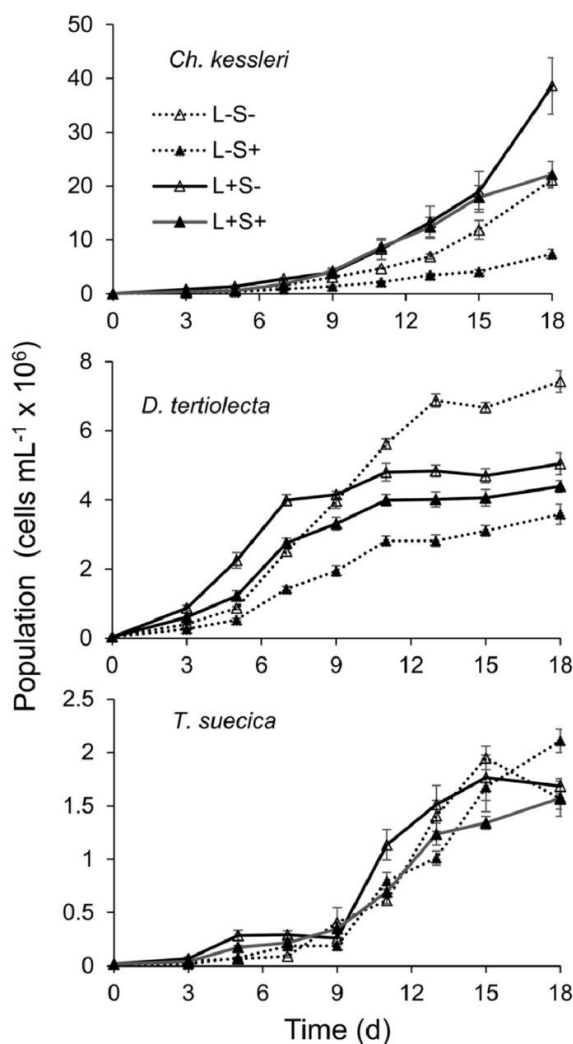


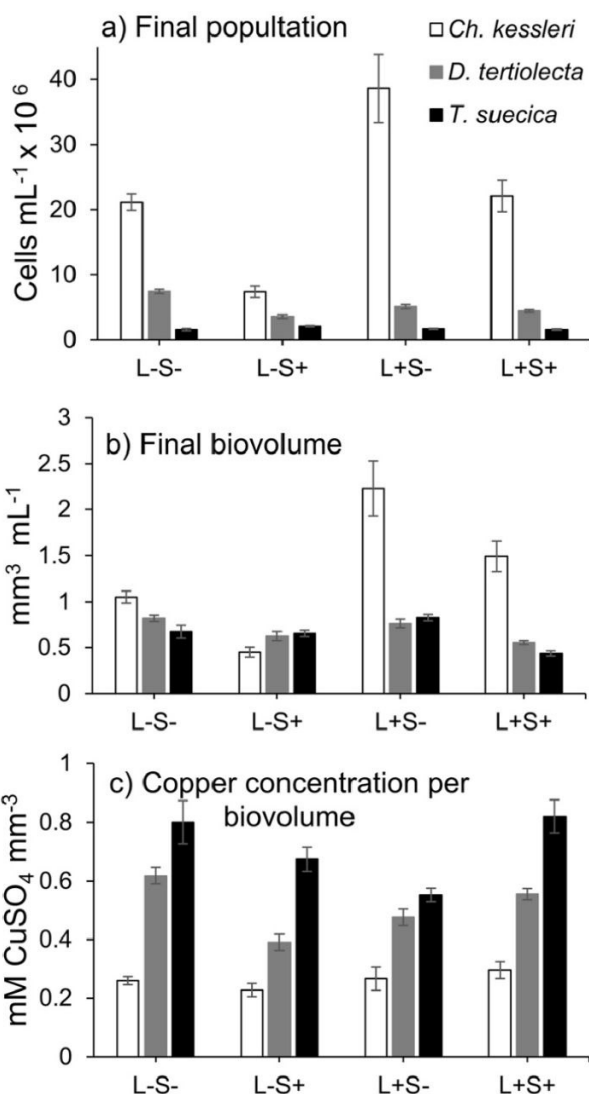
Рис. 3.3. Фотосинтетичні пігменти та співвідношення хлорофілу a/b, шкала по осі у вказана праворуч від кожного графіка. Середні значення ($n = 3$) з різними літерами

означають статистично значущі відмінності. Показані стандартні похибки. L — освітлення, S — солоність, (-) — низький рівень, (+) — високий рівень.

З іншого боку, для *T. suecica* не спостерігалось суттєвого впливу ні освітлення, ні солоності на кінцеву популяцію. Значущий вплив цих факторів виявлено лише на об'єм клітин цього штаму (рис. 3.1), причому найбільші клітини спостерігалися в обробках за умови низькою солоністю. Культури *Tetraselmis suecica* при обробках L+S- і L-S- досягли стаціонарної фази росту приблизно на 15-ий день культивування (рис. 3.2), у той час як в умовах L-S+ і L+S+ зростання популяції спостерігалось до 18-го дня. Порівнюючи максимальні популяції (рис. 3.4) та об'єм клітин трьох штамів, було встановлено, що *C. kessleri* має

найменші клітини (45–65 мкм³) та найбільша популяцію, меншою за нею є популяція *D. tertiolecta* з більшими клітинами (110–170 мкм³).

Рис. 3.4. Порівняння між різними варіантами обробки та трьома штамми за: А — кінцевою чисельністю популяції, В — кінцевим біооб'ємом, С — концентрацією CuSO₄ у мілімолях на мм³ біооб'єму на мілілітр. Білі стовпчики: *C. kessleri*, сірі: *D. tertiolecta*, чорні: *T. suecica*. L — освітлення, S —

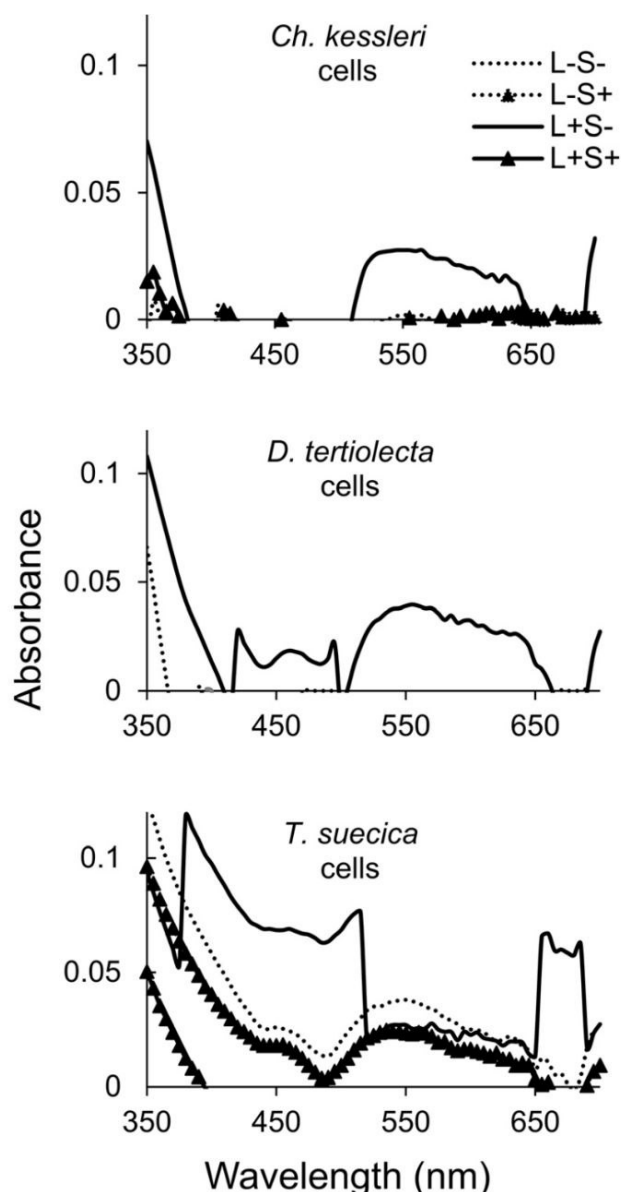


солоність, (-) — низький рівень, (+) — високий рівень. Дані представлені як середні значення (n = 3), вказані стандартні похибки.

Найменшою популяція була у *T. suecica*, при цьому клітини були найбільшими (270–470 мкм³). За даними про розмір клітин було розраховано біооб'єм у кожному варіанті, а також концентрацію CuSO₄ на кубічний міліметр біооб'єму (Рис. 3.4 b, c). Це відображає співвідношення між мідним сульфатом і можливими біологічними агентами (біохімічними чи метаболічними), що беруть участь у біосинтезі наночастинок.

У п'яти з 12 варіантів експерименту з клітинами було зафіксовано поглинання у видимій області за допомогою УФ-видимої спектроскопії,

що відповідає наявності наночастинок міді. Умовою культивування, яка сприяла утворенню НЧ у всіх трьох



штамів, була L+S-, а також для клітин *T. suecica* L-S- та L-S+ (рис. 3.5). Високе освітлення мало значний вплив на відновлення іонів міді, особливо у *C. kessleri* та *D. tertiolecta*.

Рис. 3.5. Поглинання, зафіксоване в діапазоні 350–700 нм у варіантах з клітинами через 72 години після впливу сульфатом міді.

Ознаки утворення НЧ були знайдені лише в експериментальних варіантах з клітинами, що свідчить про участь клітинних метаболітів у їхньому утворенні. Спостерігалось знебарвлення культури, що свідчило про токсичність міді для *D. tertiolecta* та *T. suecica* у експериментальних варіантах, де було виявлено утворення наночастинок міді. Це пов'язано зі

зниженням ефективності фотосинтезу та подальшого зменшення синтезу хлорофілу мікроводоростями внаслідок окислювального стресу [23]. З іншого боку, штам *C. kessleri* продемонстрував вищу толерантність до концентрації міді, що використовувалась у дослідженні; однак утворення наночастинок міді виявлялося лише за умов високого освітлення та низької солоності.

Поглинання, зафіксовані у УФ-області спектру (рис. 3.6), мали максимальні довжини хвиль у межах 200–280 нм з різною інтенсивністю та шириною піків. Утворення наночастинок оксиду міді було виявлено у *C. kessleri* в умовах з клітинами за L-S- та L-S+, тобто освітлення мало більший вплив, ніж солоність, на біосинтез НЧ у цього штаму. Натомість у клітинах *D. tertiolecta* наночастинок оксиду міді було виявлено як за L-S-, так і за L+S-, тобто висока солоність може бути негативним фактором біосинтезу НЧ для цього штаму.

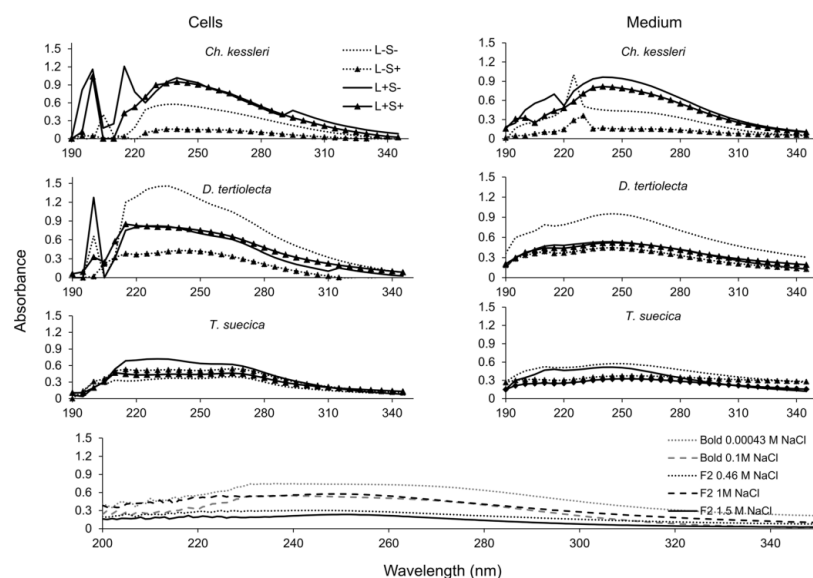


Рис. 3.6. Поглинання, зафіксовані в діапазоні 190–350 нм для виявлення наночастинок. Пунктирні лінії — низька освітленість, суцільні лінії — висока освітленість; лінії без позначок — низька солоність, лінії з трикутниками — висока солоність. Дані отримані через 72 години після обробки сульфатом міді в клітинах (графіки ліворуч) та в культуральному середовищі (графіки праворуч). Внизу по центру показано поглинання різних культуральних середовищ з 0,5 мМ CuSO_4 .

В експерименті за умов L+S- (високе освітлення та низька солоність) з клітинами *C. kessleri* спостерігалось утворення НЧ розміром 55–65 нм (рис. 3.7) — це був єдиний варіант з цим штамом, у якому були зафіксовані як наночастинки міді (λ 550 нм), так і наночастинки оксиду міді (λ 200 і 215 нм). В умовах L-S- (низьке освітлення та низька солоність) клітини *C. kessleri* сформували НЧ розміром 15–25 нм з піками поглинання, характерними для наночастинок оксиду міді (205 нм). У середовищі, де культивували *C. kessleri* за умов L-S-, утворилися НЧ розміром 35–45 нм з максимумом поглинання при 225 нм, тоді як у середовищі за умов L+S- пік було зафіксовано при 215 нм і піком між 235 і 255 нм, що свідчить про утворення наночастинок оксиду міді з варіативною морфологією (згідно з зображеннями SEM).

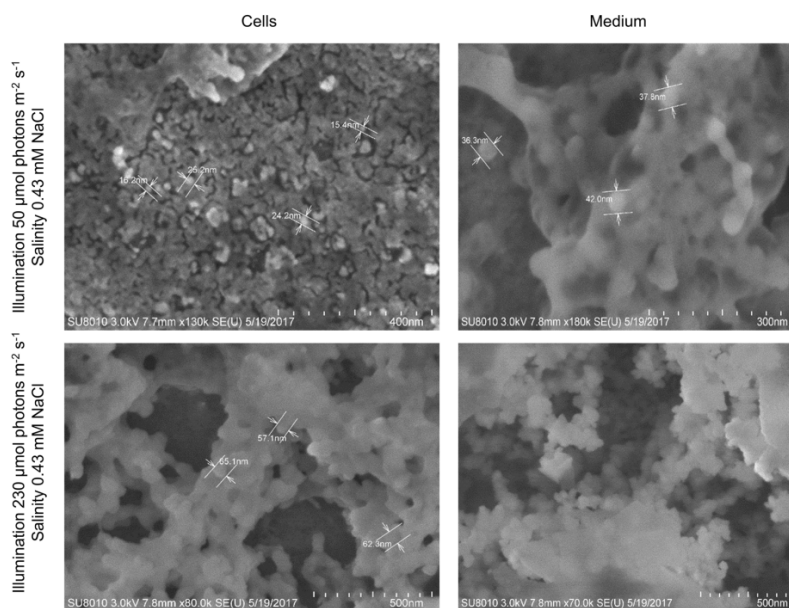


Рис. 3.7. Зображення синтезованих НЧ в експериментах з *C. kessleri*, отримані за допомогою сканувальної електронної мікроскопії (SEM).

У результаті дослідження було з'ясовано, що концентрація сульфату міді, солоність середовища та інтенсивність освітлення істотно впливають на життєздатність мікроводоростей та ефективність біосинтезу наночастинок міді. Більше того, різні штами мікроводоростей мають різну чутливість до іонів міді, тому концентрація міді в кожному експерименті повинна була бути скоригована відповідно до початкової популяції кожного штаму. Згідно з отриманими значеннями біоб'ємів (рис. 3.4 с), *T. suecica* виявила найвищу внутрішньоклітинну акумуляцію міді, коли загибель клітин спостерігалася лише після 96 годин. У свою чергу *D. tertiolecta* проявила здатність до виживання у високосолоних умовах (1,5 М NaCl) завдяки секреції захисних полімерних та/або фенольних сполук, що вказує на переважно позаклітинний характер детоксикації міді для цього штаму. Попри це, стрес, зумовлений високою солоністю, вимагав від усіх проаналізованих штамів клітин додаткових енергетичних витрат, що зменшувало їх ріст у поєднанні з низьким освітленням (особливо для *C. kessleri* та *D. tertiolecta* в умовах L-S+). Етап росту мікроводоростей так само мав значення: на стаціонарній фазі змінюється метаболізм, що впливає на синтетичну активність клітин. Таким чином, на 18-й день культивування *D. tertiolecta* і *T. suecica* (L-S- та L+S-) досягли максимальної популяції та перебували у стаціонарній фазі росту (рис. 3.2). У цій фазі спостерігалися зміни фізіологічного стану мікроводоростей, зокрема зменшення вмісту білка і збільшення триацилгліцеридів або крохмалю як енергетичних запасів.

Було визначено, що утворення НЧ фіксувалося в умовах високого освітлення та низької солоності (L+S-) для клітин

усіх трьох штамів, однак лише *T. suecica* утворювала НЧ і за інших експериментальних умовах. Світло сприяло біосинтезу завдяки участі фотосинтетичних пігментів і фотоактивації фенольних сполук. Однак, навіть за меншої концентрації пігментів у деяких умовах спостерігалось утворення НЧ, що вказує на залучення інших факторів, зокрема позаклітинних метаболітів. Під впливом кисню, який активно продукується при фотосинтезі, CuNPs окислювалися до CuONPs, що підтверджується зсувами в спектрах поглинання. CuONPs є термодинамічно більш стабільними за чисту мідь під час біосинтезу. Наночастинки оксиду міді були виявлені спектрофотометрично як у культуральних середовищах (позаклітинно синтезовані НЧ), так і в клітинах (внутрішньоклітинно синтезовані НЧ) *C. kessleri* з поглинанням в діапазоні від 200 до 235 нм. Наночастинки міді 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 наночастинок міді у L-S -, L-S+ та L+S-. Різницю розмірів НЧ вимірювали за допомогою скануючої електронної мікроскопії (СЕМ) при обробці клітин *C. kessleri*, розмір яких варіювався від 15 до 25 нм (L-S-) і від 55 до 65 нм (L+S-). У зразках культурального середовища розміри наночастинок коливалися в межах 35–45 нм (L-S-). У даній роботі було виявлено, що комбінований стрес спричиняє зміну фізіологічного стану мікроводоростей і може активувати або пригнічувати процеси біосинтезу НЧ. Отримані дані також вказують на те, що тип біосинтезу (внутрішній або зовнішній), стабільність наночастинок і розміри частинок залежать не лише від

біологічного виду, а й від умов середовища таких як солоність та освітлення [65].

3.2. Характеристика наночастинок оксиду міді синтезованих за допомогою екстракту мікроводоростей *Botryococcus braunii*

У цьому дослідженні мікроводорість *Botryococcus braunii* використовувалась для біосинтезу мідних наночастинок: водний екстракт цієї водорості додавали до водного розчину ацетату міді (рис. 3.8). Первинне підтвердження утворення НЧ проводилося візуально — за зміною кольору реакційної суміші з світло-блакитного на темно-коричневий, що вказує на відновлення іонів міді. Надалі для характеристикації НЧ використовували УФ-спектроскопію, а також синтезовані НЧ досліджували на антибактеріальну активність проти бактеріальних та грибкових штамів.

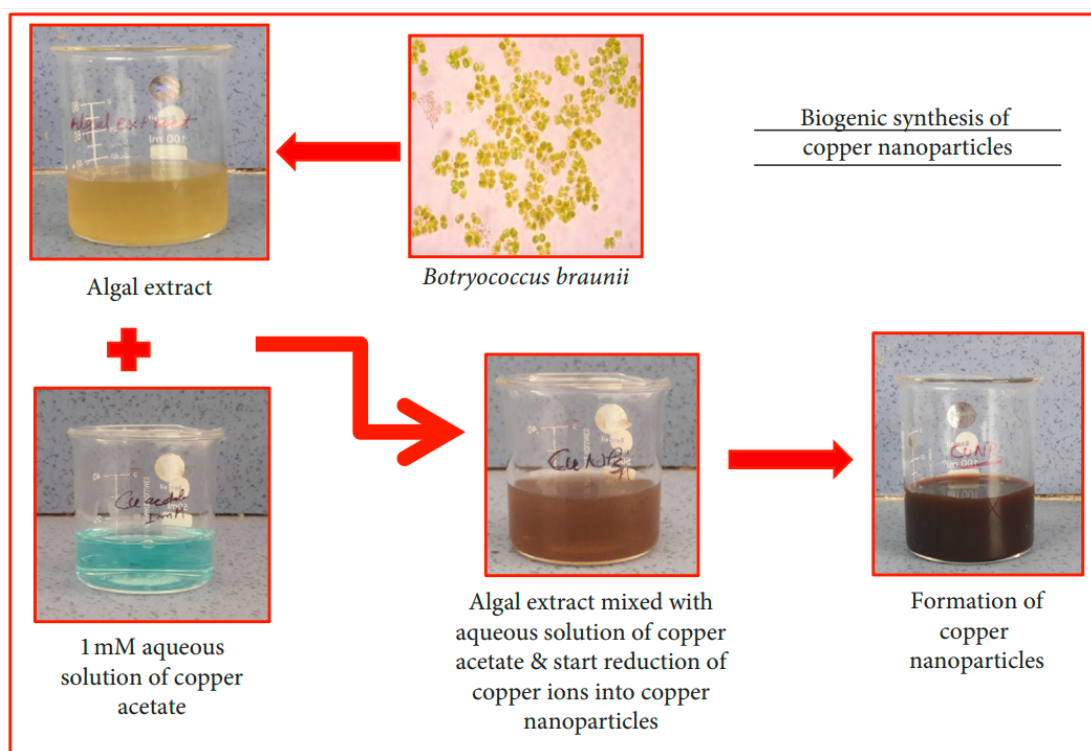


Рис. 3.8. Схема, яка демонструє етапи біосинтезу наночастинок міді.

УФ-видимий спектр мідних наночастинок, синтезованих за допомогою *Botryococcus braunii*, показав піки поглинання приблизно на 490 нм і 258 нм (рис. 3.9).

Перший пік — на 460 нм свідчить про утворення наночастинок міді, а другий — на 258 нм, що вказує на наявність оксидної оболонки навколо наночастинок (рис. 3.9). Синтезовані НЧ залишаються досить стабільними до 3 місяців, що підтверджується збереженням коричневого кольору розчину. Ці результати чітко свідчать про утворення суміші наночастинок CuO та Cu₂O.

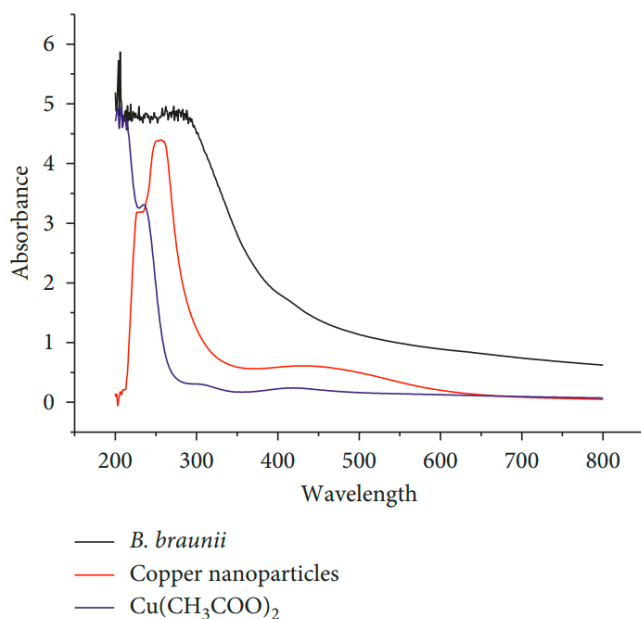


Рис. 3.9. УФ-видимі спектри

синтезованих наночастинок міді.

FTIR-спектри експериментальних зразків виявив два типи коливань — розтягування та згинання — у діапазоні довжин хвиль від 4000 до 450 см⁻¹. Вимірювання спектрів FTIR були проведені для визначення основних функціональних груп, присутніх у зеленої водорості *Botryococcus*

braunii, з метою вивчення їхньої можливої участі в синтезі НЧ. У спектрі FTIR водного екстракту цієї мікробіодорості були зафіксовані різні піки на позиціях, що відповідають декільком функціональним групам, таким як гідроксильні (O–H), амінні (N–H), карбоксильні (COO⁻), амідні, нітрильні (–CN), а також вуглеводні групи (–CH₂, –CH₃), що підтверджується даними отриманими з аналогічних досліджень цієї водорості стосовно синтезу наночастинок срібла [9]. Основні піки екстракту також присутні у спектрах синтезованих НЧ із незначними зсувами та зменшенням інтенсивності, що свідчить про участь білків,

полісахаридів, амідів і жирних кислот у біовідновленні обгортанні та стабілізації НЧ.

Форма та розмір синтезованих наночастинок були визначені за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEM) (рис. 3.10). Мікрофотографії мідних наночастинок показали кубічні і сферичні НЧ з витягнутою формою, а розмір становив 10–70 нм.

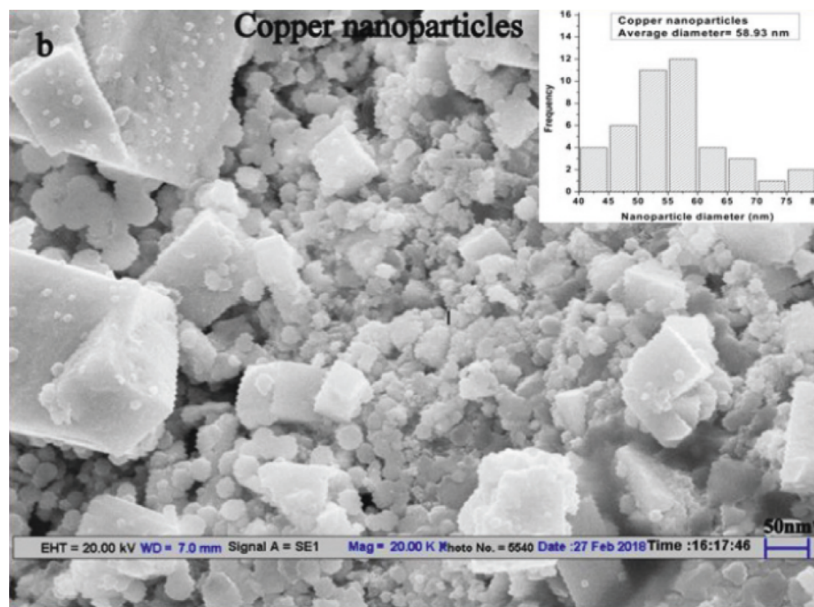


Рис. 3.10. Зображення скануючої електронної мікроскопії (SEM) синтезованих наночастинок міді.

Біосинтез мідних НЧ також було підтверджено методом рентгенівської дифракції (XRD) (рис. 3.11), що продемонстрував структуру мідних наночастинок.

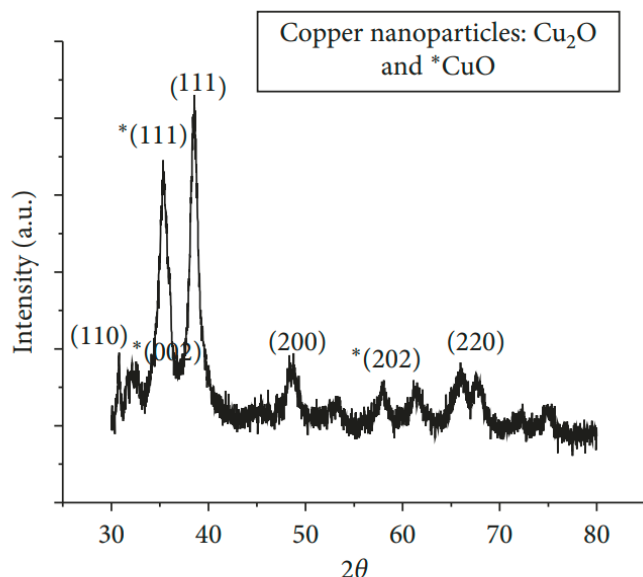


Рис. 3.11. Дифрактограми (XRD) біогенних мідних наночастинок.

Отримані НЧ мають основні XRD-піки при $2\theta = 30,8^\circ, 38,66^\circ, 48,66^\circ$ і $68,26^\circ$, що відповідає площинам (110), (111), (200) і (220) гранецентрованої кубічної структури. Крім того, додаткові піки при $2\theta = 32,3^\circ, 35,4^\circ$ та $58,1^\circ$ відповідають площинам (002), (111) і (202) і свідчать

про наявність оксидної оболонки навколо мідних НЧ (CuO). Середній розмір синтезованих мідних НЧ, що становить близько 58 нм, узгоджується з результатами SEM. Це значення було розраховано за формулою Дебая-Шерера:

$$D = k\lambda / \beta \cos \theta ,$$

де D — розмір кристалітів;

λ — довжина хвилі (1,5418 Å);

k — константа (0,9–1);

β — ширина піку на половині висоти;

θ — кут Брега [56].

Антибактеріальна активність синтезованих мідних наночастинок та екстракту мікроводоростей досліджували щодо бактерій (грампозитивних і грамнегативних) і грибів методом дифузії в агарі (рис. 3.12). Лунки з екстрактом

водоростей не проявила зони пригнічення, натомість НЧ, синтезовані з цього екстракту, виявили як антибактеріальну, так і протигрибкову активність. Найбільшу зону пригнічення спостерігали щодо *Staphylococcus aureus* (22 мм), далі — *Klebsiella pneumoniae* (19 мм), *Escherichia coli* (18 мм), *Pseudomonas aeruginosa* (17 мм), а найменшу — щодо гриба *Fusarium oxysporum* (12 мм). Таким чином, синтезовані НЧ виявилися особливо ефективними проти грампозитивних бактерій (табл. 3.3).



Рис. 3.12. Антибактеріальний тест, що демонструє зону пригнічення росту двох бактерій *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*.

Табл. 3.3

Антибактеріальна та антигрибкова активність синтезованих мідних наночастинок

Засіб інгібування	Діаметр зони інгібування (мм)				
	Грамнегативні бактеріальні штами		Грампозитивні бактеріальні штами		Штам гриба
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>F. oxysporum</i>
Мідь	17 ± 1.56	18 ± 0.1	19 ± 0.0	22 ± 0.88	12 ± 0.58

Мінімальна інгібуюча концентрація (мкг/мл)					
Мідь	100	250	100	250	250
Ампіцилін	—	100	100	250	—
Хлорамфенікол	50	50	50	50	—
Ністатин	—	—	—	—	100
Гризеофульвін	—	—	—	—	500

Крім того, було оцінено мінімальну інгібуючу концентрацію (MIC) наночастинок (рис. 3.13). Як контрольні препарати для грибів використовували ністатин і гризеофульвін.

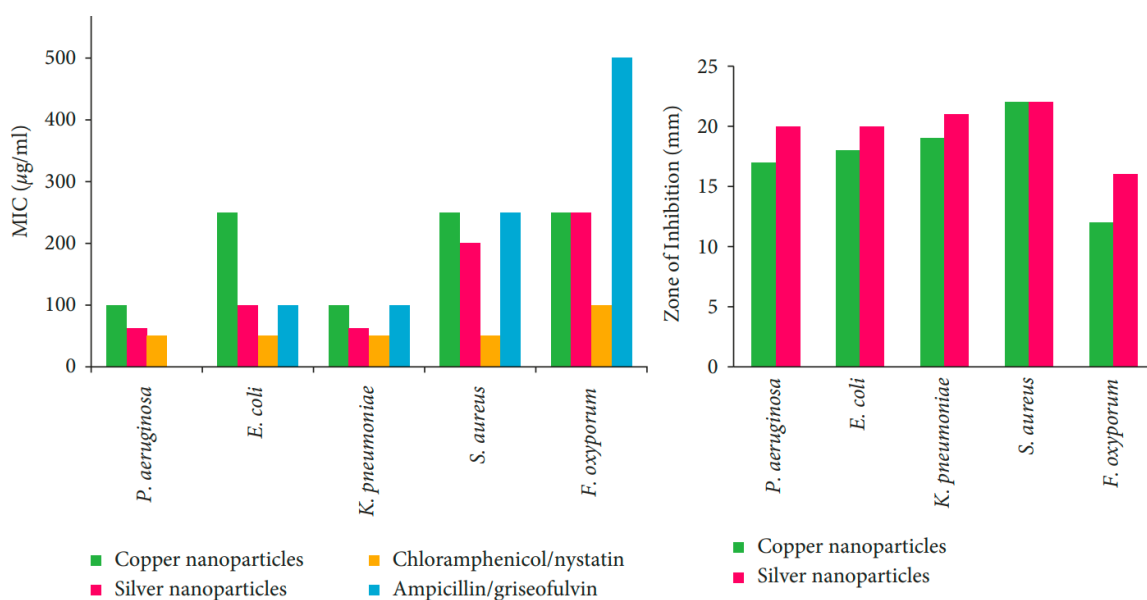


Рис. 3.13. Значення МІК (мінімальної інгібуючої концентрації) та зони інгібування щодо мікроорганізмів.

Отже, у цьому дослідженні було представлено, що екстракт мікроводорості *Botryococcus braunii* здатний відновлювати іони міді до наночастинок, а також

стабілізувати їх. Біосинтезовані НЧ були охарактеризовані за допомогою різних методів, зокрема УФ-видимої спектроскопії, інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR), скануючої електронної мікроскопії (SEM) та рентгенівської дифракції (XRD), а також виявили антибактеріальну та протигрибкову активність. УФ-видимий спектр мідних наночастинок, синтезованих за допомогою *Botryococcus braunii*, показав піки поглинання приблизно на 490 нм і 258 нм відповідно, що свідчить про утворення суміші наночастинок CuO та Cu₂O. Оксид купруму (CuO) є оксидом перехідного металу з моноклінною кристалічною структурою й вузькою шириною забороненої зони (1,3–1,7 eV), тоді як наночастинки Cu₂O мають пряму заборонену зону шириною 2,0–2,5 eV [28]. Дані FTIR вказали на наявність функціональних груп, гідроксильні (O–H), амінні (N–H), карбоксильні (COO⁻), амідні, нітрильні (-CN), а також вуглеводневі групи (-CH₂, -CH₃). Основні піки екстракту також присутні у спектрах синтезованих НЧ із незначними зсувами та зменшенням інтенсивності, що свідчить про участь білків, полісахаридів, амідів і жирних кислот у біоредукції, обгортанні та стабілізації НЧ. Різноманітність у складі та концентрації цих активних біомолекул в екстрактах водоростей вважається основним чинником, що впливає на розмаїття розмірів і форм утворених наночастинок [68].

Рентгенівські дифрактограми показали, що синтезовані НЧ мають кристалічну структуру з формою гранецентрованої кубічної ґратки. Розмір НЧ, синтезованих за участю мікрководоростей, становив 10–70 нм. Крім того, ці НЧ продемонстрували високу токсичність щодо двох грамнегативних бактеріальних штамів *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 441) та *Escherichia coli* (MTCC 442), двох грампозитивних штамів *Klebsiella pneumoniae* (MTCC 109) і *Staphylococcus aureus* (MTCC 96), а також щодо грибкового штаму *Fusarium oxysporum* (MTCC 2087). Синтезовані НЧ виявилися особливо ефективними проти грамнегативних бактерій [11].

3.3. Характеристика наночастинок оксиду міді синтезованих за допомогою екстракту мікроводоростей *Anabaena cylindrica*

В результаті дослідження було виявлено, що рН відіграє ключову роль у формуванні наночастинок оксиду міді: при значенні рН 8.2 утворюється CuO , але збільшення рН вище 8.2 призводить до утворення гідроксиду, що спостерігається у вигляді білого осаду. При рН нижче 8.2, в межах рН 6.0–7.0, утворюється мутний коричневий розчин, що може бути результатом утворення Cu_2O . Тому в цій роботі підтримували лужне значення рН 8.2. Стосовно впливу концентрації екстракту мікроводоростей на ефективність біосинтез НЧ, то при використанні дози екстракту 2,5 г/100 мл утворювалися недостатні кількості НЧ, і процес відбувався значно повільніше. З іншого боку, збільшення цієї дози призводило до більш швидкого утворення НЧ, що пов'язують з підвищенням концентрації відновлювальних агентів, що виділялися клітинами, та, внаслідок чого, збільшенням швидкості відновлення іонів. В рамках цієї роботи оптимальною дозою було вибрано 5 г/100 мл екстракту водоростей. Було також оцінено вплив швидкості перемішування на розмір синтезованих НЧ: зі збільшенням швидкості перемішування розмір зменшувався. Розмір наночастинок оксиду міді, отриманих при 500 об/хв, становив 42,54 нм, і зменшився до 34,1 нм при 700 об/хв. При більшій швидкості обертання, тобто 900 об/хв, експеримент показав мінімальний розмір частинок, що становив 3,6 нм. При ще більшій швидкості обертання, тобто 1000 об/хв, змін у розмірі НЧ не спостерігалось, що пов'язують з тим, що дрібні частинки схильні до агрегації при низьких швидкостях обертання, але розбиваються під впливом більшої швидкості. У цій роботі також вивчали вплив концентрації Cu^{2+} на утворення НЧ та їх розмір і виявили, що при низькій концентрації Cu^{2+} (0,5 мМ) утворення наночастинок було кількісно недостатнім. При концентрації 1 мМ утворені НЧ мали розмір 3,6 нм, однак у

подальшому із підвищенням концентрації Cu^{2+} , розмір НЧ збільшувався: при концентраціях Cu^{2+} 1,5 мМ, 2 мМ і 2,5 мМ розмір частинок становив 41,7 нм, 42,3 нм і 43 нм відповідно. Виходячи з цього, дослідниками було обрано концентрацію CuSO_4 1 мМ.

Таким чином, в даній роботі було охарактеризовано синтезовані НЧ за оптимальних умов: рН 8,2 з використанням 5 г/100 мл екстракту водоростей, швидкості перемішування 900 об/хв та концентрації 1 мМ Cu^{2+} . Було встановлено, що середній розмір НЧ був приблизно 3,6 нм (рис. 3.14), а площа поверхні 23,4 $\text{м}^2/\text{г}$.

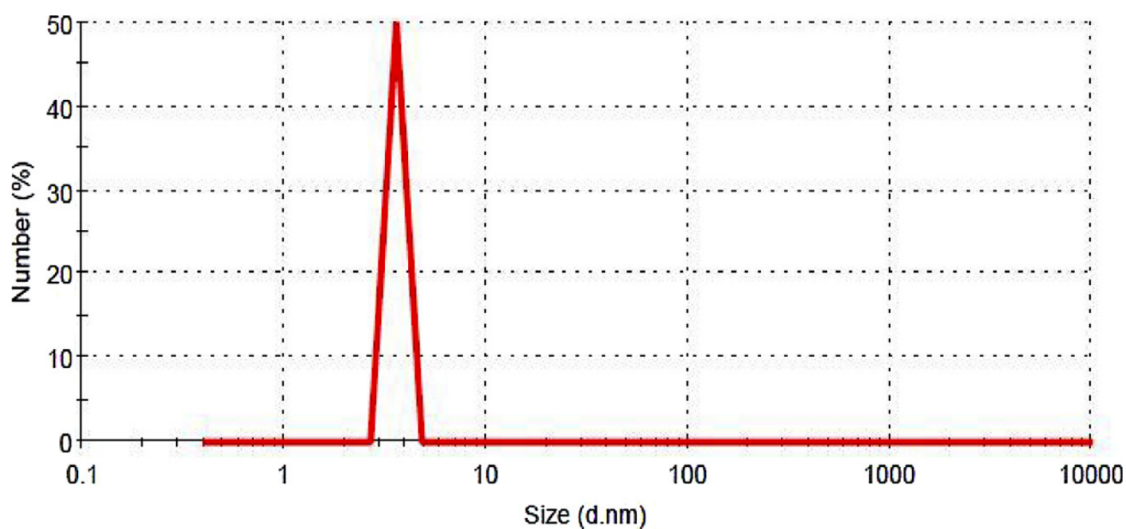


Рис. 3.14. Аналіз розміру частинок наночастинок оксиду міді синтезованих з використанням оптимізованих умов: 1 мМ Cu^{2+} , рН 8,2, концентрація екстракту водоростей — 5 г/100 мл, швидкість перемішування — 900 об/хв.

Рентгенівська дифракція (XRD) НЧ (рис. 3.15) демонструє піки при $32,3^\circ$, $35,7^\circ$, $38,6^\circ$ та $48,8^\circ$ що відповідають утворенню оксиду міді (CuO , JCPDS-80-1916), за швидкості перемішування 500, 700 та 900 об/хв. Пік при 28° відповідав кремнію (Si) від кварцового тримача зразка в приладі XRD. Пік при 29° (площина (110)) виключає можливість присутності Cu_2O . Пік при $19,2^\circ$ міг виникнути через домішки, або целюлозні волокна біомаси мікрроводоростей, чия кількість зменшувалася зі зростанням швидкості перемішування, що видно за менш

інтенсивним піком при 900 об/хв. Пік при 34° чітко вказував на целюлозні нановолокна, що спостерігалось і в інших дослідженнях в процесі біосинтезу наночастинок [59].

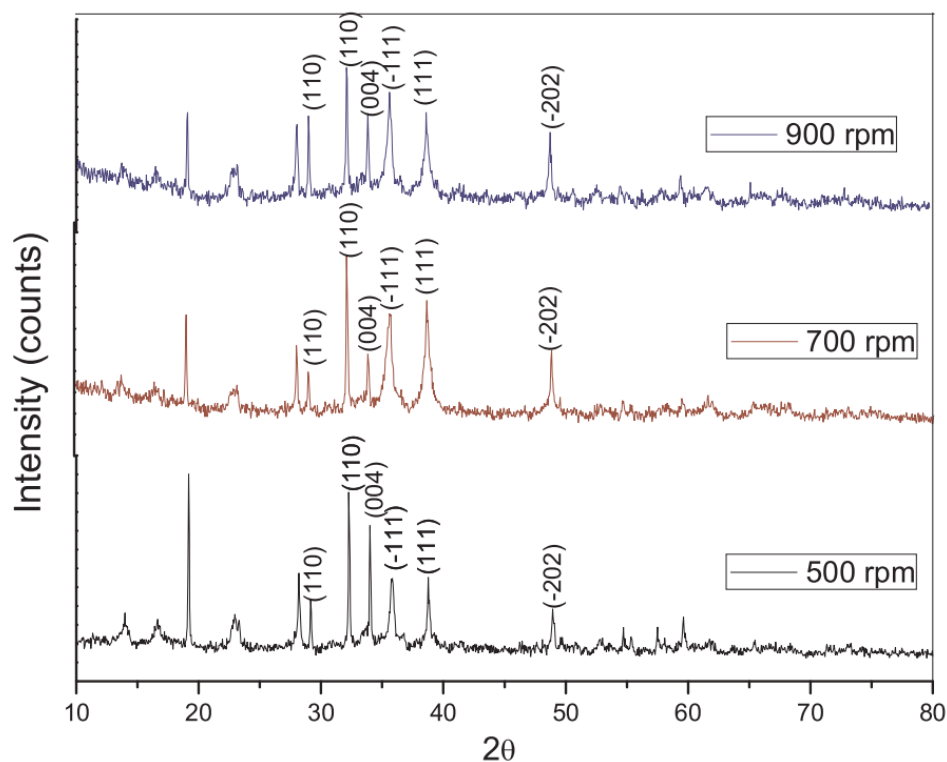


Рис. 3.15. Рентгенівська дифракція (XRD) наночастинок оксиду міді при різних швидкостях перемішування (1 mM Cu^{2+} , pH 8.2, концентрація екстракту мікробіодоростей — 5 г/100 мл).

Крім того, зі збільшенням швидкості перемішування орієнтація площини (110), а також розмір НЧ зменшувалися. Це пов'язували з тим, що висока швидкість порушує кристалізацію і обмежує ріст кристалів в певній площині. Розмір кристалітів розраховували за формулою Дебая-Шерера, як і в минулому дослідженні. Було визначено, що середній розмір кристалітів CuO при 500 об/хв становив приблизно 30 нм, при 700 об/хв — 25 нм, а при 900 об/хв — 6 нм. Варто зазначити, що медіанний розмір частинок (d_{50}) при 900 об/хв становив 3,6 нм. FTIR-спектр (рис. 3.16) підтверджує утворення наночастинок оксиду міді: характерні піки на 602 см^{-1} і 521 см^{-1} , які відповідають зв'язкам Cu–O. Інші піки вказують на функціональні групи, як-от –OH, C=O, C–O, які можуть діяти як

відновники та стабілізатори під час синтезу НЧ. Результати наведені у таблиці 3.4.

Табл. 3.4

Табличне представлення піків FTIR і відповідних зв'язків

№	Частота (см ⁻¹)	Відповідний зв'язок
1	3406	розтягування –ОН
2	2857, 2927, 3562	розтягування С–Н та О–Н
3	1087, 1116	С–О зв'язок
4	1634	зв'язки С=О та N–H
5	882, 937, 985	С–О зв'язки
6	425, 486, 521, 602, 736, 787	Cu–O
7	602	Cu–O зв'язок уздовж напрямку (1-01)
8	521	CuO зв'язок уздовж напрямку (101)

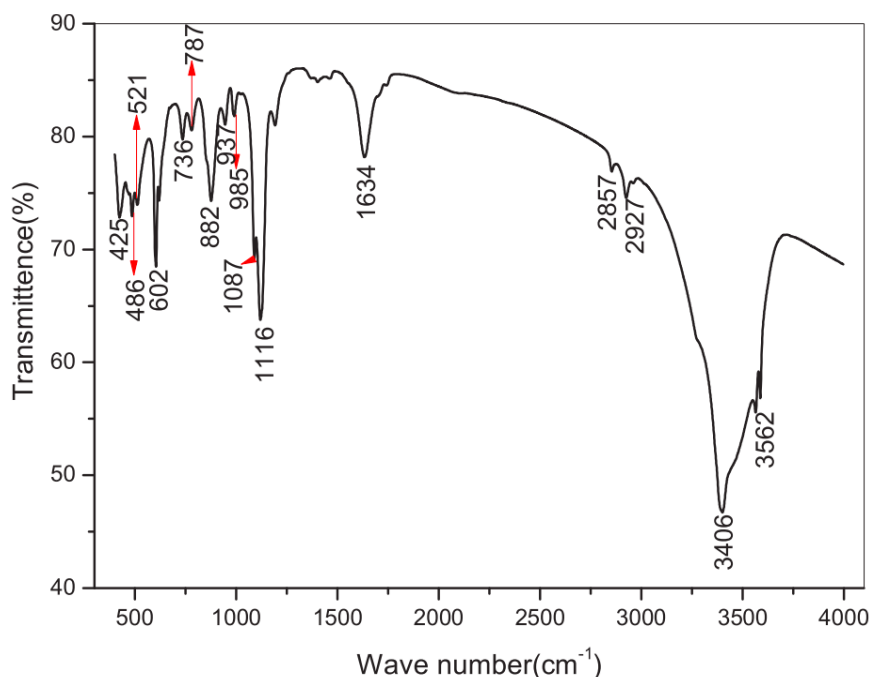


Рис. 3.16. FTIR-спектри наночастинок оксиду міді при різних швидкостях перемішування (1 мМ Cu^{2+} , рН 8.2, концентрація екстракту мікробіодоростей — 5 г/100 мл).

Згідно з аналізом FESEM (рис. 3.17), було виявлено, що в результаті дослідження була сформована паличкоподібна структура (rod-like) НЧ розміром 40–60 нм. Мікрофотографії також показали наявність більших частинок з більш-менш рівномірними розмірами, формою та морфологією. Чистоту фази було підтверджено через аналіз EDX, де були виявлені широкі піки міді (рис. 3.18). Наявність вуглецю в зображенні EDX була зумовлена використанням вуглецевого покриття при підготовці зразка для FESEM. Піки Al, Si та S вказують на біомасу мікробіодоростей, що містить різноманітні фітохімічні речовини.

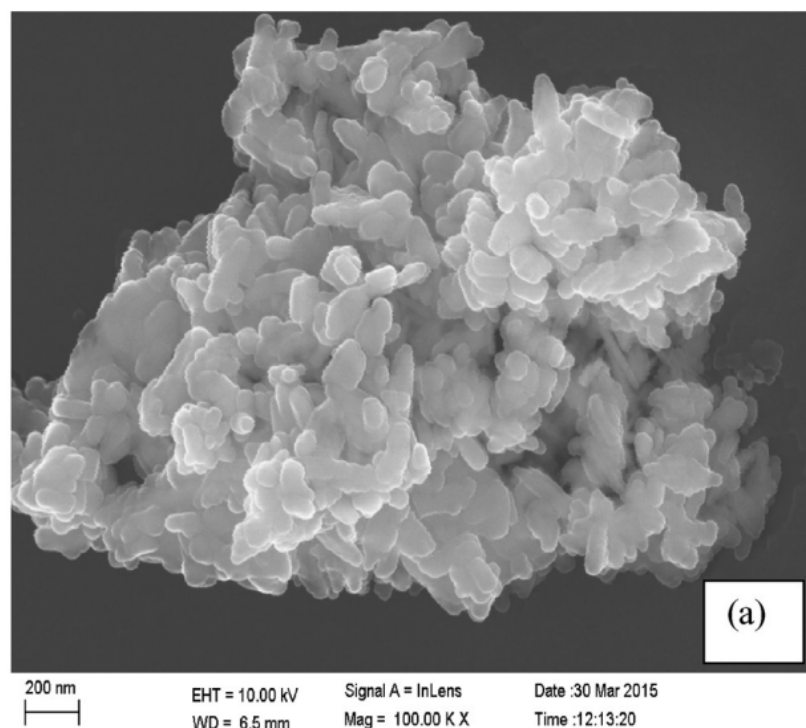


Рис. 3.17. FESEM наночастинок оксиду міді (синтезовані за оптимізованими умовами: 1 mM Cu^{2+} , pH-8.2, концентрація екстракту мікроводоростей — 5 г/100 мл і 900 об/хв).

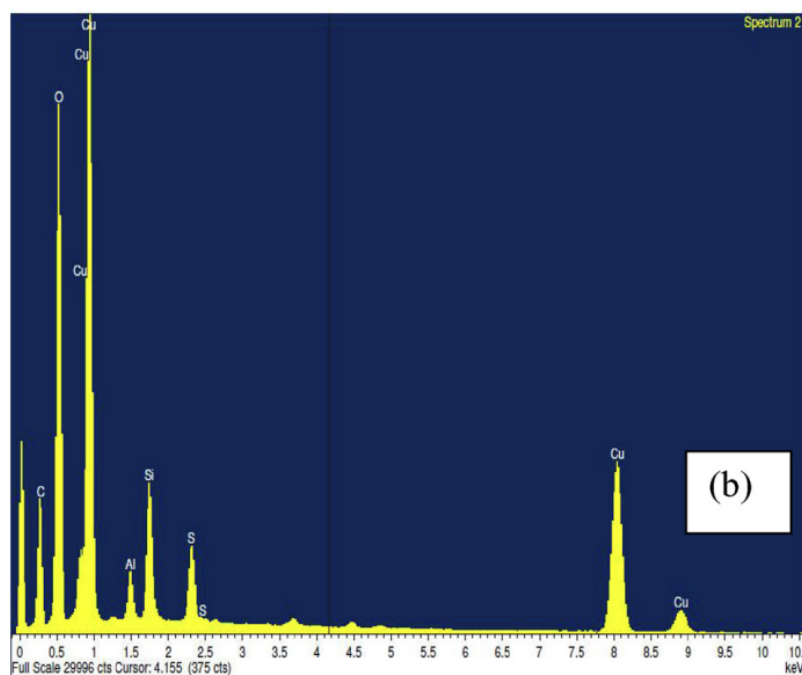


Рис. 3.18. EDX наночастинок оксиду міді (синтезовані за оптимізованими умовами: 1 мМ Cu^{2+} , рН 8.2, концентрація екстракту мікроводоростей — 5 г/100 мл і 900 об/хв).

ТЕМ аналіз підтвердив, що наночастинки оксиду міді мають паличкоподібну форму і частково злипаються між собою (агломеруються), але вони знаходяться в матриці з водоростей, що в свою чергу мінімізує цю агрегацію (рис. 3.19).

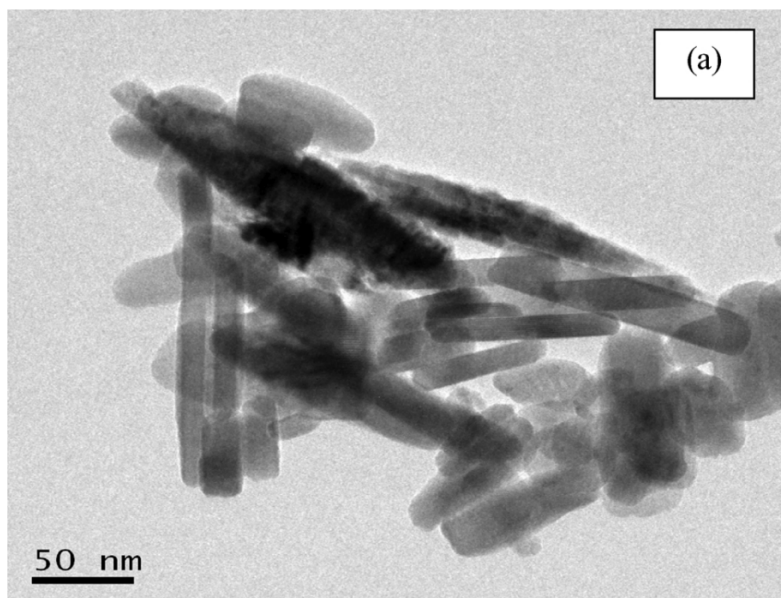


Рис. 3.19. ТЕМ зображення наночастинок оксиду міді (синтезовані за оптимізованими умовами: 1 мМ Cu^{2+} , рН-8.2, концентрація екстракту мікроводоростей — 5 г/100 мл і 900 об/хв).

Це вказує на те, що біомаса мікроводоростей відіграє роль стабілізатора. Зображення отримане в результаті застосованого методу SAED демонструє кристалічну структуру НЧ: дифракційні кільця оксиду міді (рис. 3.20). Виміряні міжплощинні відстані (d-spacing) збігаються з результатами рентгеноструктурного аналізу (XRD), де ідентифіковані площини (110), (202) та (111). Це ще раз підтверджує кристалічну структуру синтезованих НЧ.

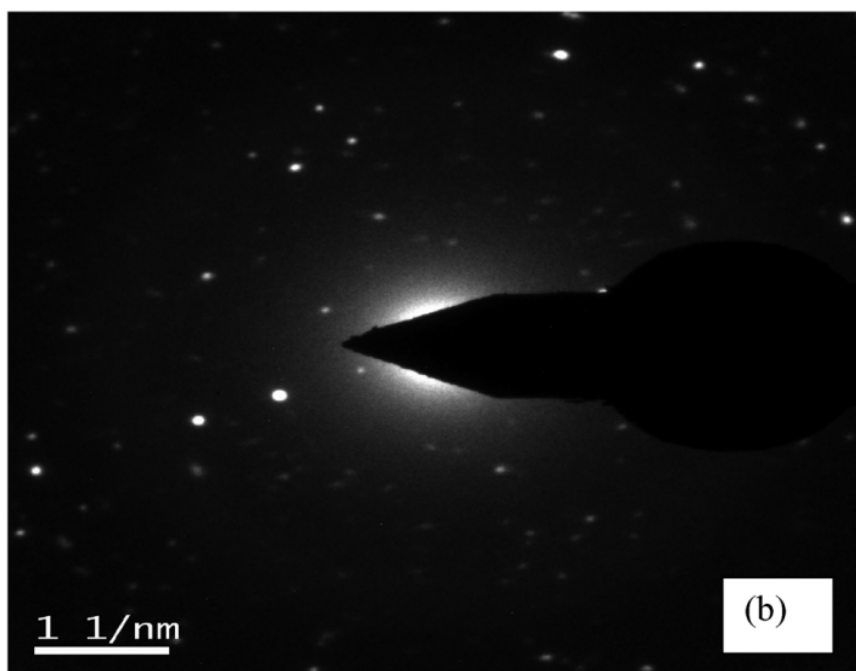


Рис. 3.20. SAED зображення наночастинок оксиду міді (синтезовані за оптимізованими умовами: 1 mM Cu^{2+} , pH-8.2, концентрація екстракту мікроводоростей — 5 г/100 мл і 900 об/хв).

Аналіз XPS (рис. 3.21, 3.22) підтвердив утворення чистих наночастинок оксиду міді (CuO). Піки зв'язувальних енергій $\text{Cu } 2p_{3/2}$ (931,76 eV) і $\text{Cu } 2p_{1/2}$ (951,72 eV) та їх розділення (19,96 eV) відповідають характеристикам CuO . Пік $\text{O } 1s$ при 529 eV свідчить про наявність іонів O^{2-} , характерних для оксиду міді, а додатковий пік $\text{Br } 3d$ пояснюється використанням KBr при підготовці зразка. Подібні результати були отримані в аналогічних дослідженнях.

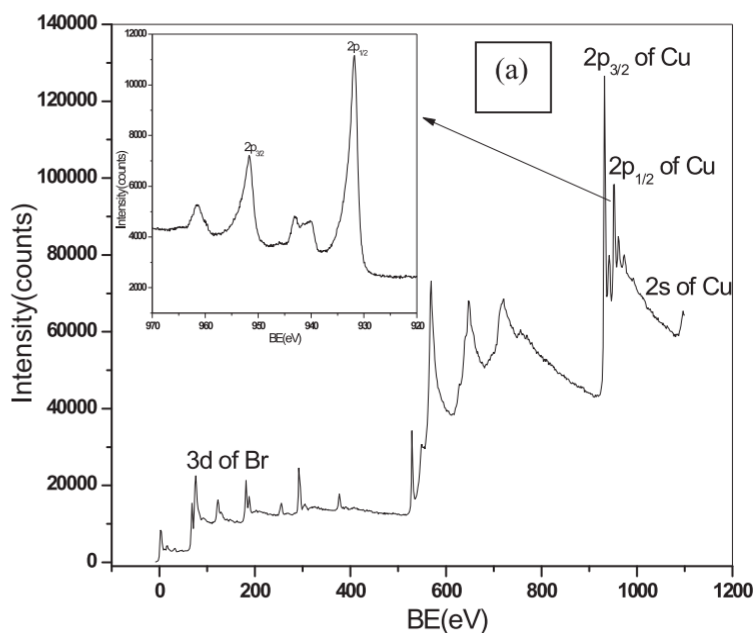


Рис. 3.21. XPS-аналіз наночастинок оксиду міді (синтезовані за оптимізованими умовами: 1 mM Cu^{2+} , pH-8.2, концентрація екстракту мікроводоростей — 5 г/100 мл і 900 об/хв).

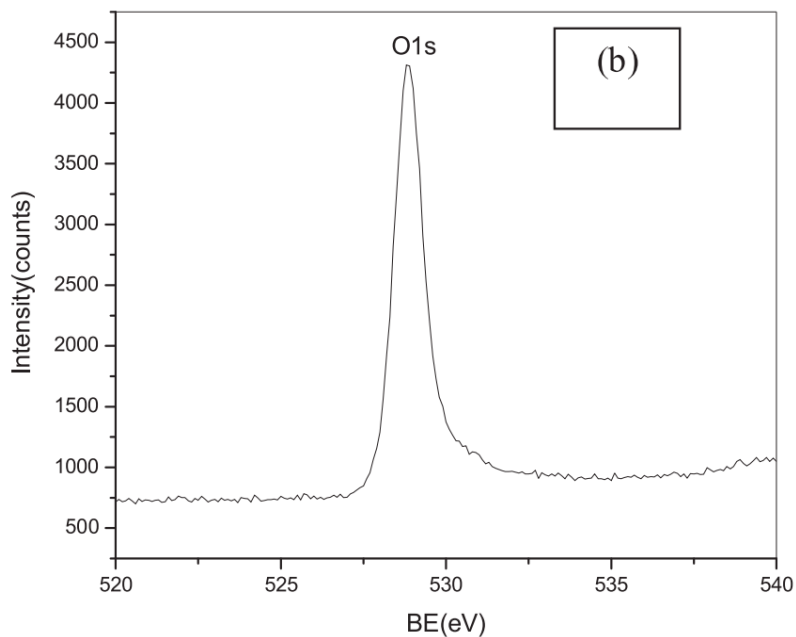


Рис. 3.22. Пік O1s оксиду міді у наночастинках (синтезовані за оптимізованими умовами: 1 mM Cu^{2+} , pH-8.2, концентрація екстракту мікроводоростей — 5 г/100 мл і 900 об/хв).

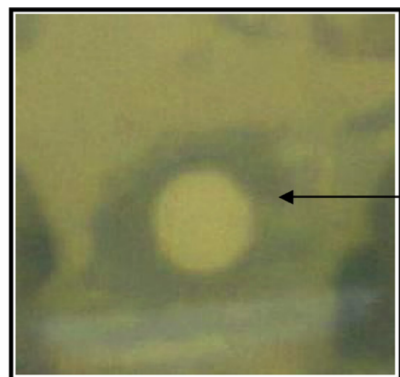
Антимікробна активність НЧ і їх застосування для очищення питної води була виявлена проти грамнегативної бактерії *Escherichia coli*. Результати показали, що наночастинки оксиду міді ефективно пригнічують *E. coli*, проявляючи антибактеріальну активність. Мінімальна інгібуюча концентрація (MIC) (табл. 3.5) для ампіциліну становила 40 мкг/мл, а мінімальна бактерицидна концентрація (MBC) — 60 мкг/мл. Для живильного середовища з наночастинками оксиду міді MIC становила 20 мкг/мл, а MBC — 40 мкг/мл. Обробка бактеріальної культури дозою 40 мкг/мл наночастинками оксиду міді спричинила виникнення зони інгібування (ZOI) приблизно $4,5 \pm 0,7$ мм (рис. 3.23).

Металеві НЧ можуть безпосередньо взаємодіяти з клітинною стінкою або внутрішньоклітинними компонентами бактерій. Клітинна стінка грає важливу роль у захисті цитоплазми та забезпеченні життєво важливих процесів, тому її руйнування є фатальним для бактерій. Через те, що поверхня клітинної стінки бактерій має негативний заряд, позитивно заряджені НЧ притягуються до неї за допомогою електростатичних сил. Адсорбуючись на поверхні, НЧ можуть пошкоджувати мембрану, змінювати її заряд і проникати всередину клітини. Це призводить до руйнування клітинної стінки, витоку внутрішніх компонентів і утворення ROS [32]. Таким чином, негативно заряджені пептидоглікани клітинної стінки роблять грамнегативні бактерії більш чутливими до позитивно заряджених CuONPs.

Табл. 3.5

Антибактеріальна активність біосинтезованих наночастинок оксиду міді та антибіотика ампіциліну (показники ZOI, MIC, MBC) проти *Escherichia coli*

Зразок	Зона інгібування (ZOI), мм	Мінімальна інгібуюча концентрація (MIC), мкг/мл	Мінімальна бактерицидна концентрація (MBC), мкг/мл
Ампіцилін (μg/mL)	4,2 ± 0,6	40 ± 2,2	60 ± 3,1
Біосинтезовані НЧ оксиду міді (μg/mL)	4,5 ± 0,7	20 ± 0,9	40 ± 1,5



Zone of inhibition

Рис. 3.23. Утворення зони інгібування під дією наночастинок оксиду міді проти *Escherichia coli* (синтезованих за оптимізованими умовами: 1 mM Cu²⁺, pH 8,2, концентрація екстракту мікроводоростей — 5 г/100 мл, швидкість перемішування — 900 об/хв).

Біосинтезовані наноматеріали мають широкий спектр властивостей для очищення води, забрудненої токсичними іонами металів, органічними та неорганічними розчиненими речовинами, а також патогенними мікроорганізмами [66]. Тому в цій роботі досліджували антибактеріальну активність синтезованих НЧ проти бактерій в зразках води отриманих з озера. Аналіз MPN (метод найбільш ймовірного числа) для зразків води (SW) показав наявність 16000 колоній на 100 мл. Після обробки оптимізованою дозою наночастинок оксиду міді — 40 мкг/мл — повне знищення патогенів було зафіксовано вже за 30 хвилин (рис. 3.24). Зменшення кількості колоній почалося

вже через 5 хвилин обробки наночастинками, і через 30 хвилин колонії більше не утворювалися. За результатами аналізу MPN було виявлено 50 колоній на 100 мл через 5 хвилин і жодної колонії після 30 хвилин.

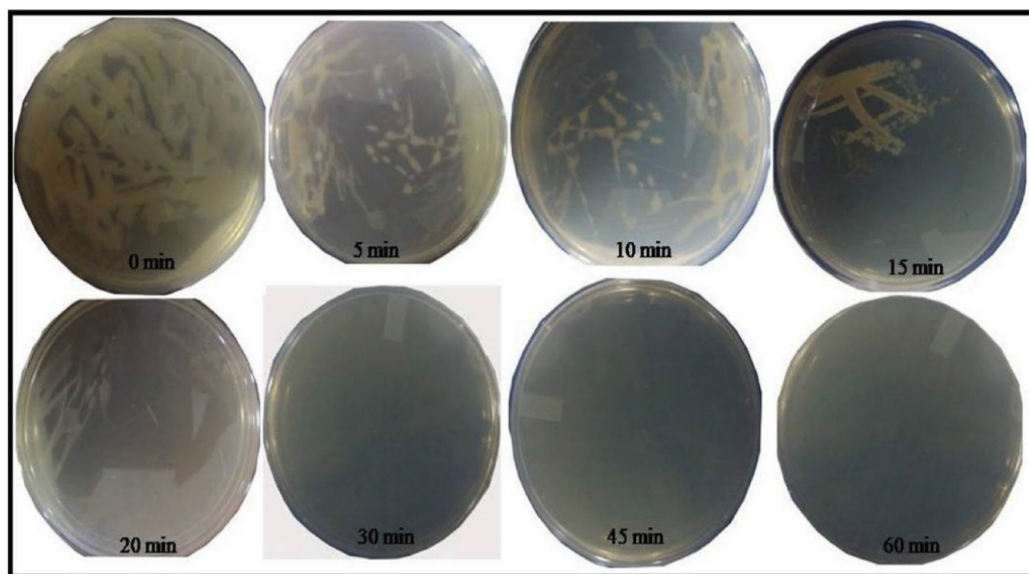


Рис. 3.24. Ріст *Escherichia coli* залежно від часу в присутності наночастинок оксиду міді (синтезованих за оптимізованими умовами: 1 мМ Cu^{2+} , рН 8,2, концентрація екстракту мікрободоростей — 5 г/100 мл, швидкість перемішування — 900 об/хв)

Вплив синтезованих НЧ не продемонстрував жодних аномалій для клітин *Channa punctatus* протягом 24–96 годин спостереження. Протягом перших 72 годин не було зафіксовано жодної летальності як у контрольній, так і в експериментальній групах, тоді як після 96 годин обробки летальність склала 11% у обох групах. На 14-й день експерименту спостерігалася смертність у 16% риб з експериментальної групи та 22% — з контрольної. Протягом усього періоду дослідження у водному середовищі експериментальних зразків фіксувалося незначне вимивання міді — близько 0,0002 мг/л. Тест на мікроядра в крові риб, проведений з 1 по 15 день, не показав утворення мікроядер у відповідь на наночастинки оксиду міді, тоді як токсичні ефекти наночастинок оксиду міді виявляються як раз у збільшенні кількості мікроядер в еритроцитах

досліджуваних риб [76], що свідчить про відсутність токсичності міді у розглянутому дослідженні для риб при концентрації 40 мкг/мл (рис. 3.25).

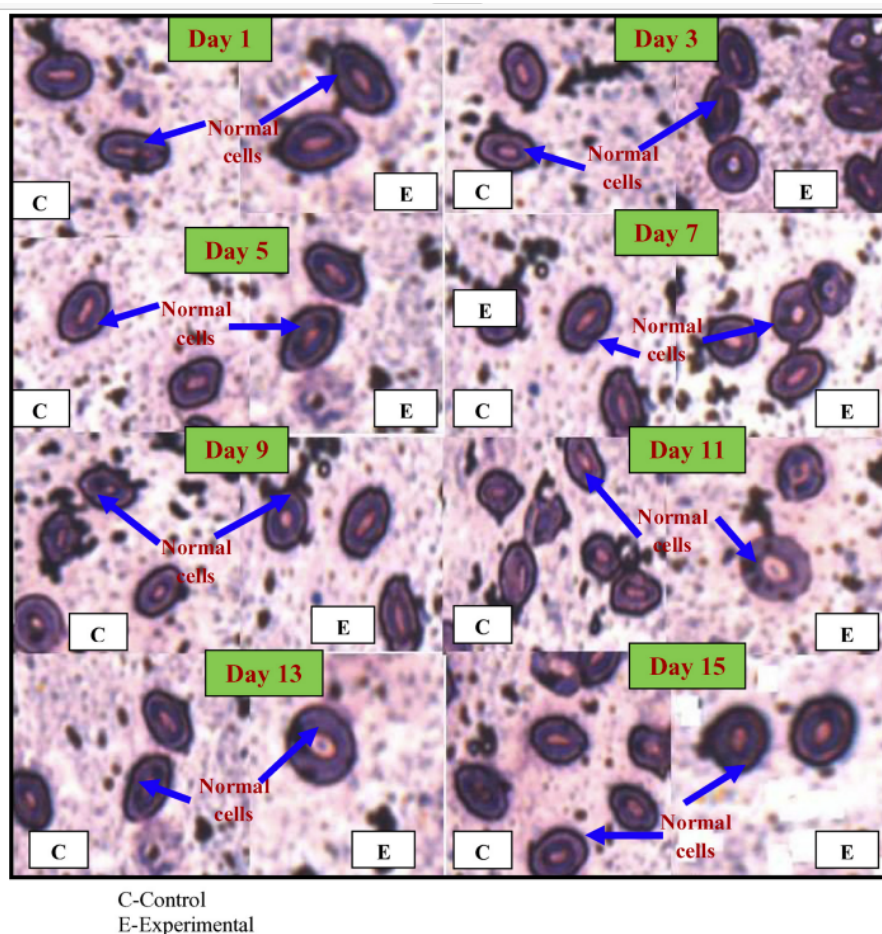
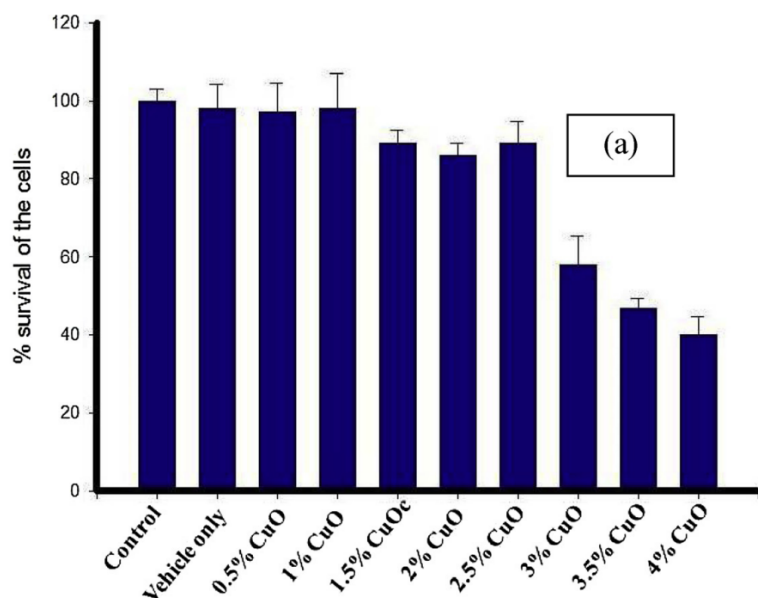


Рис. 3.25. Тест на мікроядра в крові риб у відповідь на наночастинки оксиду міді (синтезованих за оптимізованими умовами: 1 мМ Cu^{2+} , рН 8,2, концентрація екстракту мікроводоростей — 5 г/100 мл, швидкість перемішування — 900 об/хв)

Наночастинки оксиду міді були розчинені у 5% розчині глюкози, і цією сумішшю обробляли клітини AGS та CHO. Також клітини обробляли 5% розчином глюкози для оцінки, чи сам розчин має токсичний вплив на життєздатність клітин або їх морфологію. Виявлено, що глюкоза не викликала токсичності. Далі клітини інкубували з розчином НЧ протягом 24 і 48 годин у шести різних концентраціях: 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% і 3%. Згідно з МТТ-

аналізом, при концентрації до 2,5% рівень виживання клітин складав приблизно 86%, однак при концентрації 3% різко знижувався до 55% (рис. 3.26).

Рис. 3.26. Вплив різних концентрацій наночастинок оксиду міді на виживаність клітин AGS. Результати подані у вигляді показників поглинання на довжині хвилі 595 нм. Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка (S.E.) (НЧ синтезовані за оптимізованими умовами: 1 mM Cu^{2+} , pH 8,2, концентрація екстракту мікродоростей — 5 г/100 мл, швидкість перемішування — 900 об/хв).



Подібний ефект спостерігали і під час забарвлення DAPI та сумішшю АО/ЕВ. До концентрації 2,5% не спостерігалось значних змін у формі клітин на DAPI-забарвленні. Зі збільшенням концентрації понад 50% клітин стали жовтими, а приблизно 20% — помаранчевими після забарвлення АО/ЕВ, що

свідчить про перехід клітин у стан апоптозу та некрозу [47, 15]. Таким чином, можна зробити висновок, що до концентрації 2,5% розчину наночастинок оксиду міді (тобто 2500 мкг/л) він є безпечним для клітин людини. При перевищенні цієї концентрації частинки чинять шкідливий вплив як на морфологію, так і на життєздатність клітин (рис. 3.27, 3.28).

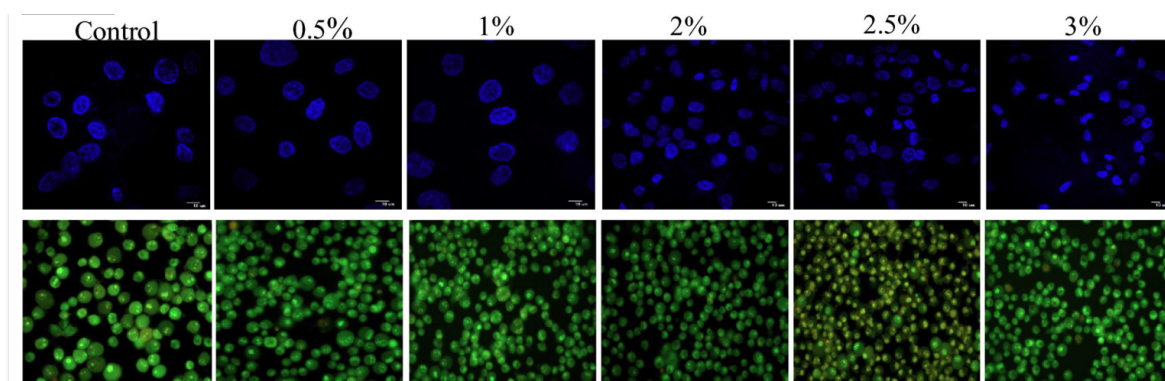


Рис. 3.27. Забарвлення клітин AGS за допомогою DAPI та суміші АО/ЕВ (НЧ синтезовані за оптимізованими умовами: 1 мМ Cu^{2+} , рН 8,2, концентрація екстракту мікроводоростей — 5 г/100 мл, швидкість перемішування — 900 об/хв).

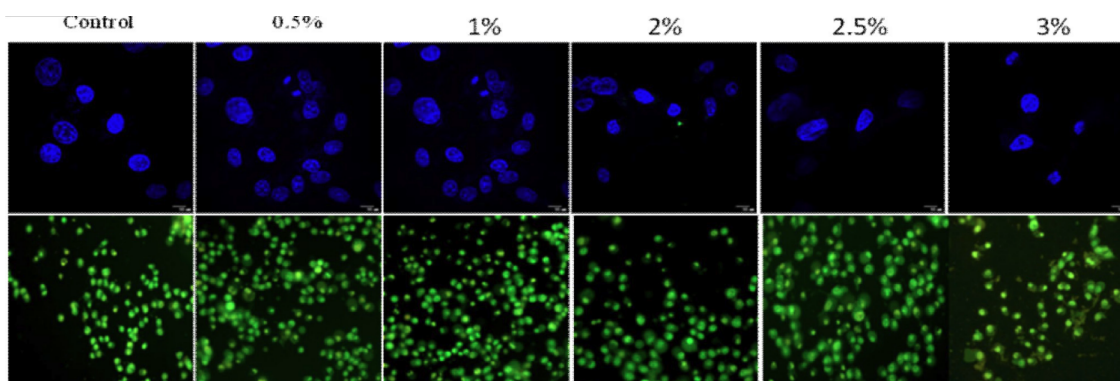


Рис. 3.28. Забарвлення клітин СНО (НЧ синтезовані за оптимізованими умовами: 1 мМ Cu^{2+} , рН 8,2, концентрація екстракту мікроводоростей — 5 г/100 мл, швидкість перемішування — 900 об/хв)

Таким чином, у цьому дослідженні було успішно синтезовано наночастинки оксиду міді за допомогою екстракту водоростей *Anabaena sp.* із середнім розміром частинок 3,6 нм. Оптимальні умови синтезу включали використання 1 мМ Cu^{2+} , швидкість перемішування 900 об/хв, концентрацію екстракту мікроводоростей 5 г/100 мл та рН 8,2. Рентгенівський дифракційний аналіз (XRD) виявив, що зі збільшенням швидкості перемішування зменшується розмір кристалітів, а результати XRD та SAED підтвердили кристалічну природу НЧ. Отримані НЧ продемонстрували значну антибактеріальну активність проти

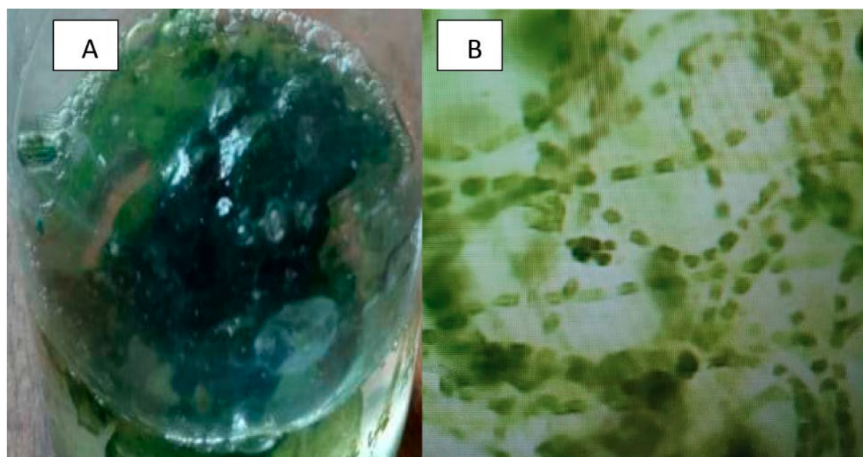
грамнегативної бактерії *E. coli*. Встановлено, що повне знезараження води, забрудненої *E. coli* (близько 16 000 MPN/100 мл), досягається протягом 30 хвилин контакту з НЧ у дозі 40 мкг/мл. В поживному бульйоні МІС становить 20 мкг/мл, а мінімальна бактерицидна концентрація (МВС) — 40 мкг/мл. При дозі 40 мкг/мл зона інгібування (ZOI) склала в середньому $4,5 \pm 0,7$ мм. Для НЧ розміром 5–10 нм МІС і МВС становили відповідно 20 мкг/мл і 50 мкг/мл. Хоча на досліджуваній моделі *S. punctatus* спостерігався токсичний ефект, тести на клітинних лініях людини і тварин виявили відсутність токсичності НЧ до концентрації 2,5% (25 000 мкг/мл), коли перевищення цієї дози призводило до некрозу клітин [16].

3.4. Характеристика наночастинок оксиду міді синтезованих за допомогою мікроводоростей *Zygnema sp.*

Як відомо, синтез НЧ за допомогою біологічних об'єктів залежить від відновлювальних і стабілізуювальних агентів, які в них містяться. Тому в цьому дослідженні було приділено особливу увагу складовим екстракту *Zygnema sp.*

(рис. 3.29), який було проаналізовано методом ВЕРХ (високоєфективної рідинної хроматографії) (табл. 3.6, рис. 3.30).

Рис. 3.29. А – Ріст *Zygnema sp.* на середовищі Chu-10 В – мікроскопічний аналіз.



Отримані дані (табл. 3.6) свідчать про наявність 12 сполук, пов'язаних із фенолами та флавоноїдами, з різними концентраціями, часом утримання та

площею піків у складі екстракту. Найвищі концентрації мають галова кислота (101,77 мкг/мл), хлорогенова кислота (88,28 мкг/мл), метилгалат (40,92 мкг/мл), нарингенін (19,33 мкг/мл) і кавова кислота (18,24 мкг/мл).

Табл. 3.6

Складові фенольні і флавоноїдні сполуки екстракту *Zygnema sp.*

Назва сполуки	Час утримування (хв)	Площа піку (mAU·s)	Площа (%)	Концентрація (мкг/мл)
Галова кислота	3.56	23.63	28.20	101.77
Хлорогенова кислота	4.29	12.73	15.19	88.28
Катехін	4.48	0.00	0.00	0.00
Метилгалат	5.45	15.03	17.93	40.92
Кавова кислота	5.84	4.22	5.03	18.24
Сирингова кислота	6.33	3.19	3.81	11.48
Рутин	6.91	0.92	1.10	7.58
Еллагова кислота	7.21	0.00	0.00	0.00
Кумарова кислота	8.49	3.84	4.58	6.96

Ванілін	9.02	4.69	5.60	9.32
Ферулова кислота	9.71	0.00	0.00	0.00
Нарингенін	10.20	4.02	4.80	19.33
Розмаринов а кислота	12.07	2.78	3.32	14.89
Дайдзеїн	15.97	0.00	0.00	0.00
Кверцетин	17.53	3.27	3.90	10.24
Корична кислота	19.17	5.48	6.54	5.13
Кемпферол	20.60	0.00	0.00	0.00
Гесперетин	21.19	0.00	0.00	0.00

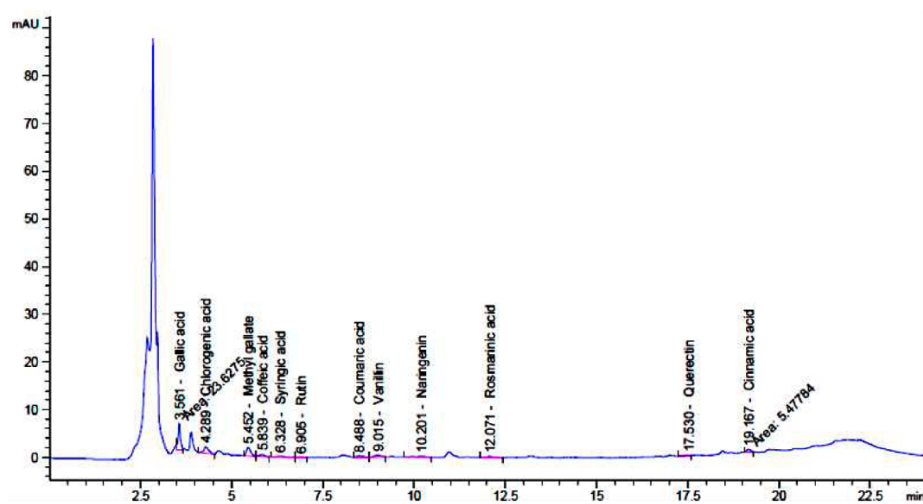


Рис. 3.30. Хроматограми фенолів і флавоноїдів в екстракті *Zygnema sp.*, отримані методом ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія)

УФ-видимий спектр показав пікове поглинання на 252 нм, що вказує на формування наночастинок оксиду міді. Пік поглинання синтезованих НЧ порівнювали з піком поглинання екстракту мікроводоростей (рис. 3.31).

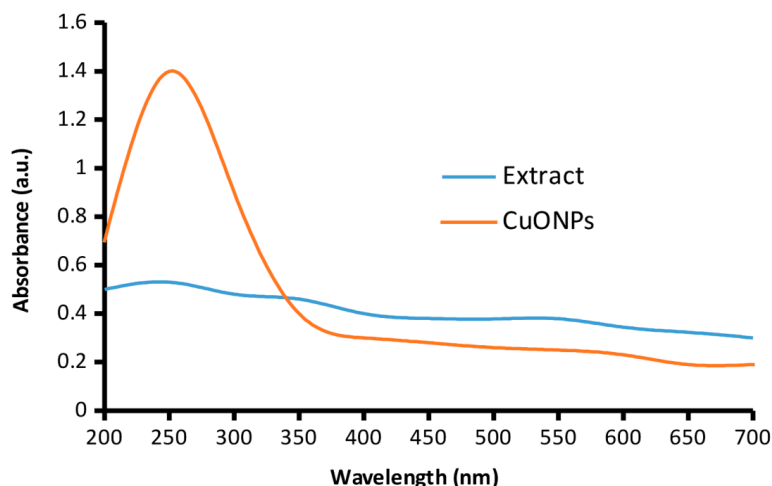
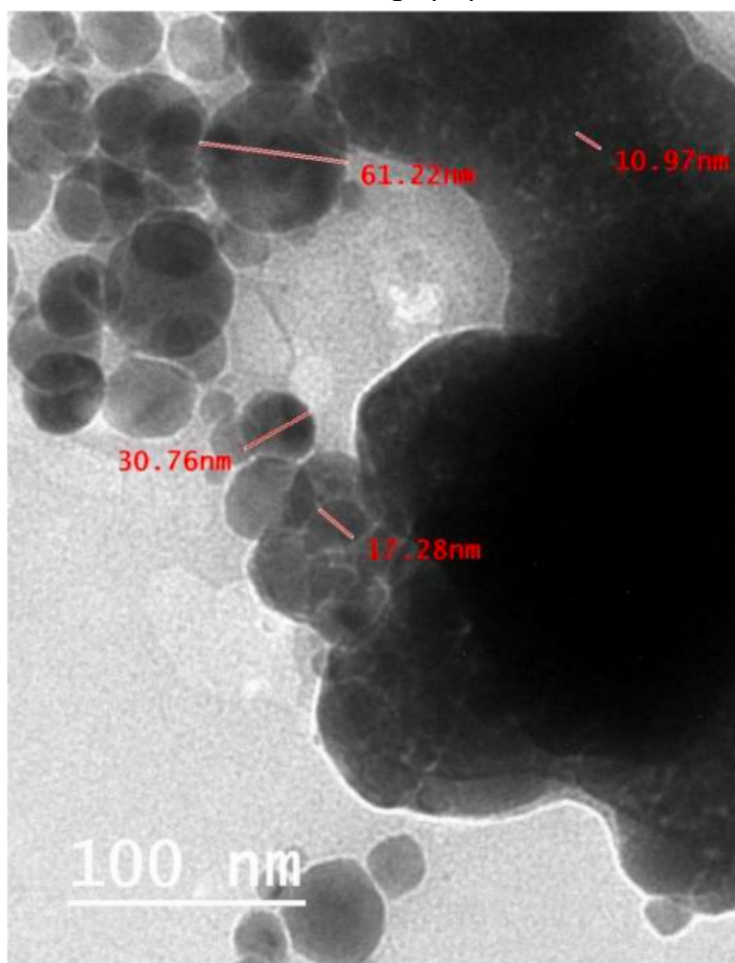


Рис. 3.31. Піки поглинання синтезованих наночастинок оксиду міді за допомогою екстракту визначені за допомогою УФ-видимого спектрофотометра.

Також були оцінені форма та розмір синтезованих наночастинок оксиду міді (рис. 3.32).



Частинки мали сферичну форму із середнім діаметром 30,06 нм. Діаметр НЧ, синтезованих *B. braunii*, коливався від 10 до 70 нм.

Рис. 3.32. Зображення наночастинок оксиду міді, синтезованих за допомогою екстракту *Zygnema sp.*, отримане за допомогою TEM.

FTIR-спектроскопія була використана для підтвердження наявності функціональних груп на поверхні

НЧ (рис. 3.33). Піки поглинання синтезованих НЧ знаходяться в діапазоні 3385, 2358, 1637 та 491 cm^{-1} . Піки при 3385 і 2358 cm^{-1} відповідають розтягуванню ОН- та -COO-груп, відповідно, а пік при 491 cm^{-1} визначає наявність Cu–O.

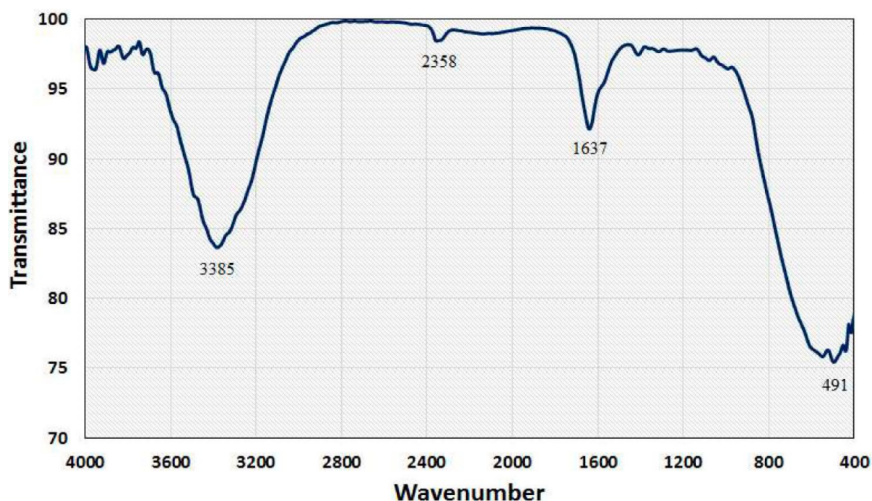


Рис. 3.33. FTIR-спектри наночастинок оксиду міді синтезованих за допомогою екстракту *Zygnema sp.*.

Кристалічна структура сформованих НЧ була досліджена за допомогою рентгенівського дифракційного аналізу (XRD) (рис. 3.34).

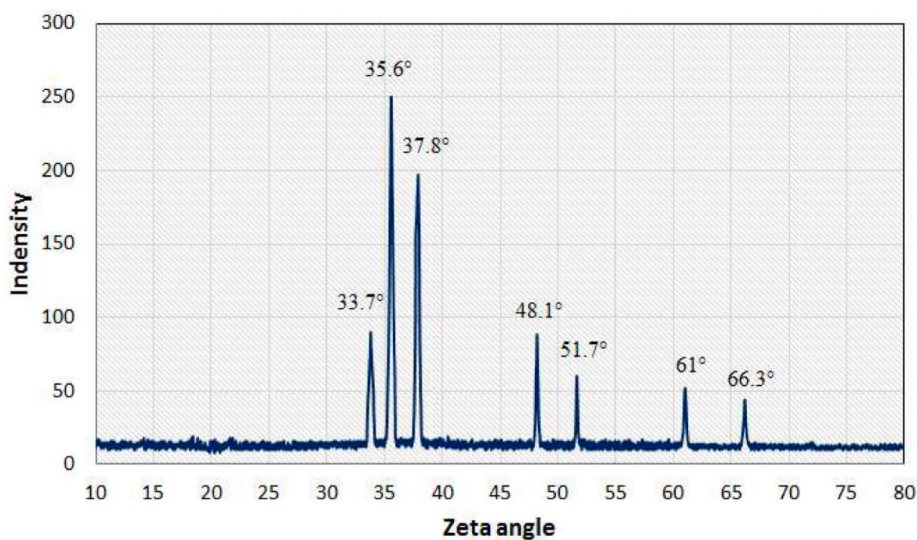


Рис. 3.34. Рентгенівська дифрактограма наночастинок оксиду міді синтезованих за допомогою екстракту *Zygnema sp.*.

XRD-знімки підтверджують кристалічну структуру НЧ. Дифракційні піки було отримано при 2θ : $33,7^\circ$, $35,6^\circ$, $37,8^\circ$, $48,1^\circ$, $51,7^\circ$, 61° та $66,3^\circ$, які відповідають відбиттям Брагга за площинами 110, 111, -111, -202, 020, -113 та 022 відповідно, що підтвердило отримання наночастинок оксиду міді. Дифрактограма НЧ також не виявляє присутності жодних інших домішок, що свідчить про отримання чистих НЧ.

У роботі було оцінено інгібуючий потенціал синтезованих НЧ щодо різних бактерій, а також одноклітинних дріжджів (*C. albicans*), порівнюючи з впливом стандартного препарату (антибіотика/протигрибкового препарату) та ацетату міді (табл. 3.7, рис. 3.35). Ріст бактерій був пригнічений НЧ, з утворенням зон інгібування діаметром $32\pm 0,1$; $36\pm 0,1$; $27\pm 0,2$ та $37\pm 0,1$ мм, у той час як ацетат міді спричинив зони інгібування $28\pm 0,2$; $30\pm 0,2$; $23\pm 0,1$ та $33\pm 0,1$ мм проти *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi* та *E. faecalis* відповідно. Було зроблено висновок про більшу ефективність НЧ проти *C. albicans* у порівнянні з ацетатом міді.

Табл. 3.7

Активність наночастинок оксиду міді, ацетату міді та антибіотика/протигрибкового препарату проти різних мікроорганізмів із зазначенням МІК та МБК/МФК

Досліджуваний мікроорганізм	Зона інгібування (мм)			МІК (мкг/мл)		МБК/МФК (мкг/мл)	
	НЧ	Ацетат міді	Позитивний контроль	НЧ	Ацетат міді	НЧ	Ацетат міді

<i>S. aureus</i>	32 ± 0,1	28 ± 0,2	29 ± 0,1	7,8	15,62	15,62	31,25
<i>E. coli</i>	36 ± 0,1	30 ± 0,2	33 ± 0,2	7,8	15,62	7,8	31,25
<i>S. typhi</i>	27 ± 0,2	23 ± 0,1	25 ± 0,1	15,62	31,25	31,25	31,25
<i>E. faecalis</i>	37 ± 0,1	33 ± 0,1	35 ± 0,1	7,8	7,8	7,8	15,62
<i>C. albicans</i>	34 ± 0,3	29 ± 0,2	30 ± 0,2	31,25	31,25	31,25	62,5

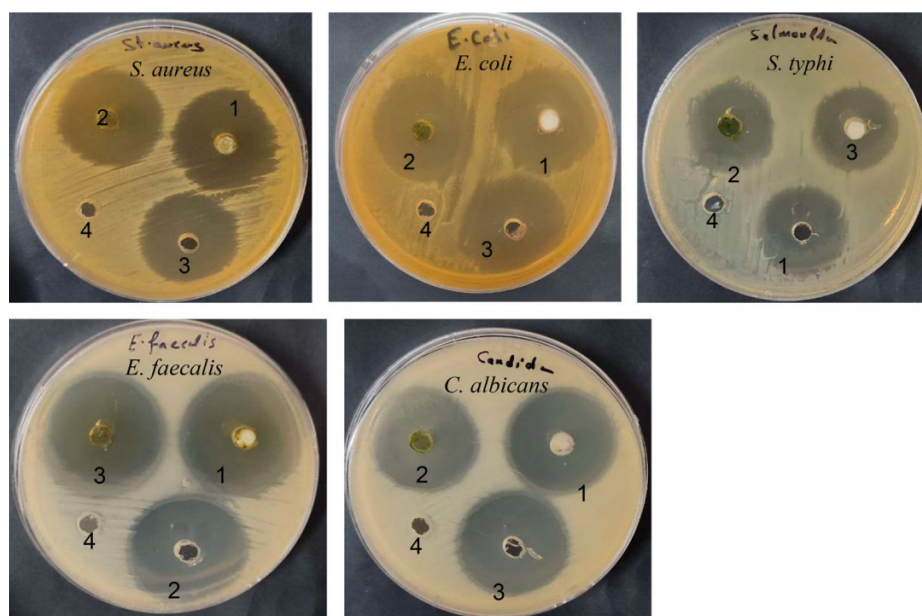


Рис. 3.35. Вплив 1 – синтезованих наночастинок оксиду міді, 2 – ацетату міді, 3 – антибіотика/протигрибкового препарату та 4 – негативного контролю на тестовані бактерії та *C. albicans*, що спостерігався за розміром зони інгібування (мм).

Було встановлено, що розмір створених НЧ відіграє важливу роль у пригніченні росту мікроорганізмів, а ефективність стандартного антибіотика/протигрибкового засобу була нижчою за вплив НЧ, але вищою за ацетат міді. Мінімальна інгібуюча концентрація (MIC) НЧ була нижчою за ацетат міді для *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi*, і такою самою як МІК ацетату міді у випадку *E. faecalis* (7,8 мкг/мл) та *C. albicans* (31,25 мкг/мл). Крім того, значення MBC/MFC (мінімальна бактерицидна/фунгіцидна концентрація) для НЧ були нижчими за ацетат міді для всіх тестованих мікроорганізмів, крім *S. typhi*. Кілька видів бактерій, включаючи *Edwardsiella tarda*, *Proteus mirabilis*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* і *S. aureus*, були пригнічені НЧ. Проникнення НЧ у бактеріальні клітини через клітинну мембрану залежить від розміру частинок, а деякі хімічні групи, асоційовані з клітинною мембраною (наприклад, амінні та карбоксильні), сприяють притягуванню іонів міді. Також було показано вплив НЧ у різних концентраціях порівняно з ацетатом міді та комерційним фунгіцидом на ріст *C. lunata*, *F. oxysporum*, *A. flavus* та *Mucor circinelloid* (рис. 3.36).

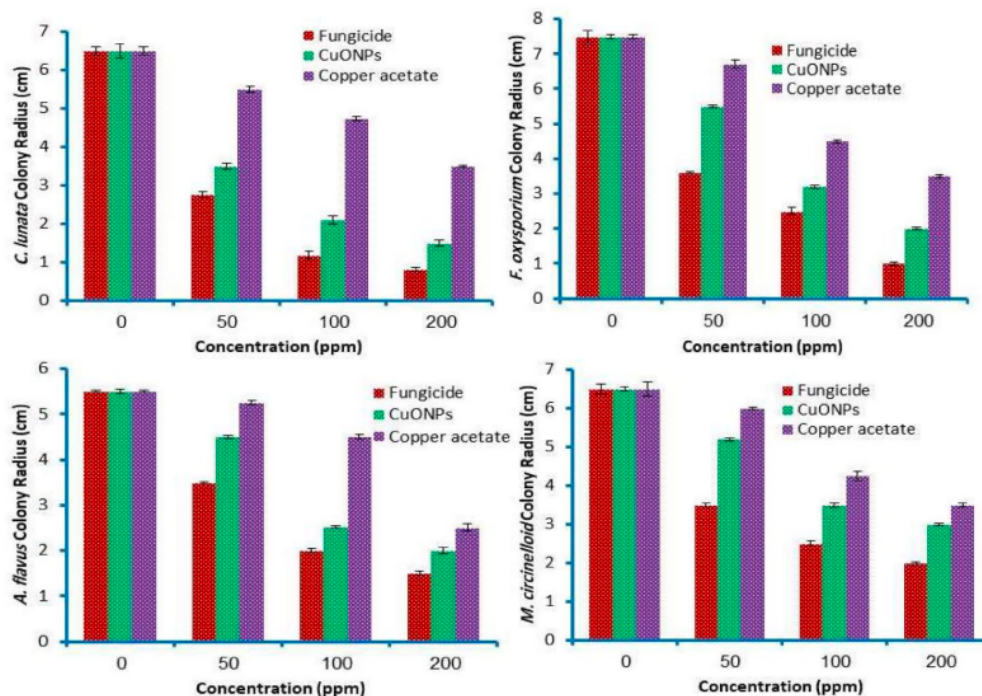


Рис. 3.36. Вплив різних концентрацій НЧ, ацетату міді та хімічного фунгіциду на радіус колоній досліджуваних грибів.

Усі три досліджувані сполуки виявляли фунгіцидну активність, але у різному ступені, залежно від виду гриба та типу сполуки. Зменшення радіуса колонії відбувалося зі збільшенням дози досліджуваних речовин. Радіус колоній *C. lunata*, *F. oxysporum*, *A. flavus* та *M. circinelloid* зменшився відповідно з 6,5 до 1,50 см; з 7,5 до 2,0 см; з 5,5 до 2,0 см; та з 6,5 до 3 см, при цьому відсоток інгібування становив 76,92%, 73,33%, 63,63% та 53,84% відповідно при концентрації НЧ 200 ppm. НЧ демонстрували сильнішу фунгіцидну дію, ніж ацетат міді, але слабшу, ніж хімічний фунгіцид. *M. circinelloid* виявився найбільш стійким до НЧ, ацетату міді та хімічного фунгіциду у всіх досліджуваних дозах, що може бути пов'язано зі складом клітинної стінки або здатністю гриба накопичувати мідь у клітині. У дослідженні [11], в якому було синтезовано НЧ за допомогою *Botryococcus braunii*, також було досліджено та підтверджено ефективність НЧ для пригнічення *Fusarium oxysporum*.

Наночастинки оксиду міді були протестовані для оцінки їхньої здатності до розкладання двох барвників: RR195 і RB впродовж різного часу (від 15 до 105 хвилин) і за температури від 10 до 50 °C. Відсоток знебарвлення RR195 і RB зростав з часом, досягаючи максимального розкладання 84,66% і 90,82% відповідно на 75-й хвилині (рис.3.37). Через тривалу дію реакційного середовища спостерігалось також поступове зниження знебарвлення внаслідок повторного вивільнення барвника. У порівнянні з низькими температурами (10 та 20 °C), високі температури (40 °C та 50 °C) були більш сприятливими для розкладання барвників. При 40 °C оптимальне знебарвлення становило 84,66% для RR195 та 90,82% для RB, тоді як при 10 °C — лише 31,55% і 42,33% відповідно. Швидкість розкладання знижувалася при 50 °C, ймовірно, через ослаблення адсорбції та зниження зв'язку між адсорбентом і адсорбованою

речовиною. Було виявлено, що найкращі результати отримувалися в результаті використання 50 мкг/мл НЧ. Для оцінки впливу НЧ на розкладання барвників також були проведені контрольні досліди в темряві — з наночастинками та без. У відсутності НЧ спостерігалось незначне розкладання, так само як і в темряві НЧ практично не впливали на швидкість розкладання барвників.

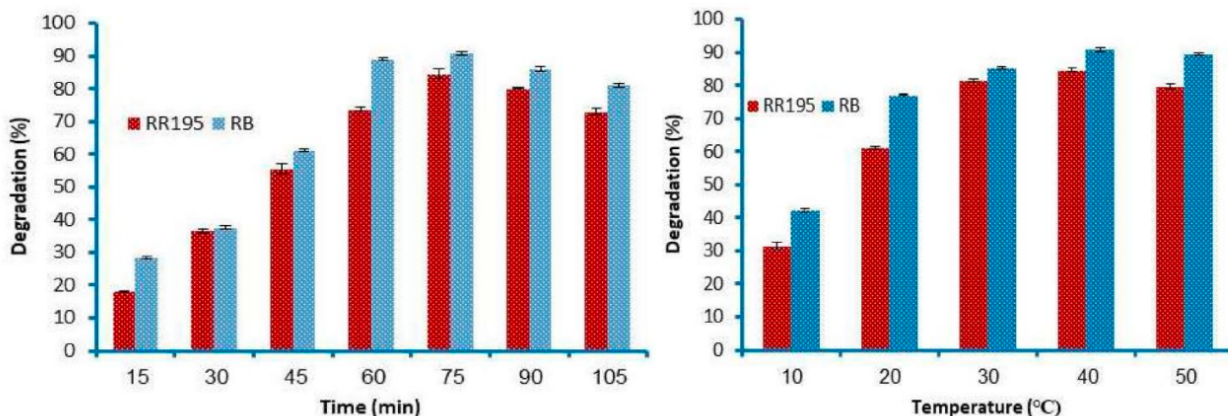


Рис. 3.37. Фотокаталітична активність наночастинок оксиду міді у деградації барвників в залежності від часу та температури.

Отже, у даному дослідженні було продемонстровано синтез наночастинок оксиду міді за допомогою мікробродорості *Zygnema sp.*. За допомогою ВЕРХ (високоєфективної рідинної хроматографії) було встановлено, що екстракт *Zygnema sp.* містить значну кількість фенолів і флавоноїдів, які беруть участь у відновленні іонів міді в процесі синтезу наночастинок оксиду міді. Синтезовані НЧ були охарактеризовані методом УФ-видимої спектроскопії, у результаті якої було виявлено пік поглинання при 252 нм; FTIR (інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є), яка підтвердила наявність функціональних груп, які сприяли утворенню НЧ; ТЕМ (трансмисійної електронної мікроскопії), що показала утворення сферичних частинок діаметром у середньому 30,06 нм; та рентгенівської дифракції (XRD), що підтвердила кристалічну структуру синтезованих НЧ. Отримані НЧ проявили активність проти росту різноманітних

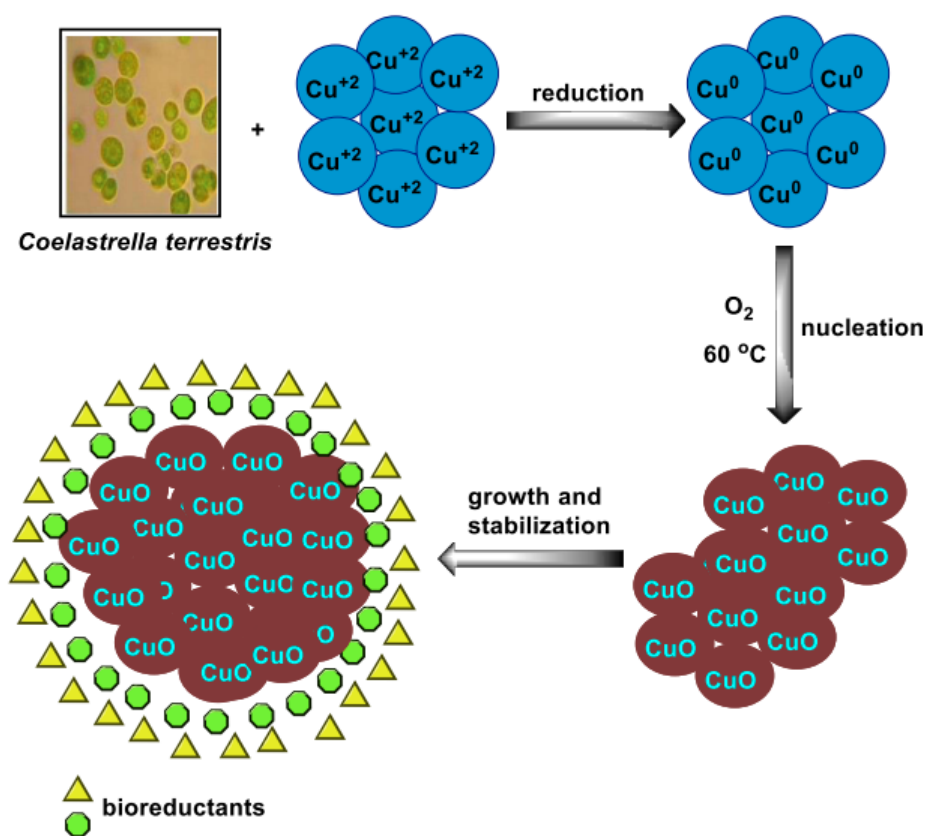
бактерій, грибів, а також одноклітинних дріжджів (*Candida albicans*). Антибактеріальний потенціал НЧ порівнювали з мідним ацетатом і стандартними антибіотиками/протигрибковими препаратами. В результаті НЧ виявили більші зони інгібування для *Staphylococcus aureus* ($32 \pm 0,1$ мм), *Escherichia coli* ($36 \pm 0,1$ мм), *Salmonella typhi* ($27 \pm 0,2$ мм), *Enterococcus faecalis* ($37 \pm 0,1$ мм), *Candida albicans* ($34 \pm 0,3$ мм) порівняно з мідним ацетатом і контрольними препаратами. Було також зафіксовано перспективні мінімальні інгібуючі концентрації (MIC) для *S. aureus*, *E. coli* та *S. typhi*. При концентрації 200 ppm, НЧ пригнічували ріст грибів *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus* та *Mucor circinelloides* із відповідними рівнями пригнічення 76,92%, 73,33%, 63,63% та 53,84% (у порівнянні з контролем, де ріст становив 100%). Крім того, було оцінено потенційну екологічну ефективність синтезованих НЧ в процесі деградації барвників RR195 і RB. Отримані максимальні значення деградації становили 84,66% та 90,82% відповідно за 75 хвилин при температурі 40 °C [4].

3.5. Характеристика наночастинок оксиду міді синтезованих за допомогою міководоростей *Coelastrella terrestris*

У цьому дослідженні було оцінено вплив рН реакції на синтез наночастинок оксиду міді з використанням екстракту водоростей. Синтез НЧ відбувався при лужному рН (у лужному середовищі здатність *C. terrestris* до відновлення і стабілізації була вищою), у той час як при кислотному та нейтральному рН суміші екстракту водоростей і розчину сульфату міді синтез НЧ не спостерігався. Тому протягом цього експерименту для утворення наночастинок оксиду міді підтримували значення рН 11. Також авторами було визначено, що при кімнатній температурі (27 °C) спостерігався синтез наночастинок гідроксиду міді ($\text{Cu}(\text{OH})_2\text{NPs}$). Коли температура реакції підвищувалася з 27 °C до 60 °C, колір реакційної суміші змінювався з блакитного

на коричневий. Це підтверджувало, що відбувся синтез наночастинок оксиду міді (CuONPs). Таким чином, саме подальше нагрівання спричиняє термічне розкладання $\text{Cu}(\text{OH})_2$ до оксиду міді CuO [18]. Крім того, було встановлено, що об'єм екстракту водоростей відіграє важливу роль у формуванні форми та розміру НЧ. Зі збільшенням об'єму екстракту розмір синтезованих наночастинок також збільшувався. Рентгеноструктурний аналіз за площиною з найвищою інтенсивністю (111) показав, що при використанні 15 мл екстракту мікроводоростей утворювалися НЧ розміром 7,62 нм, тоді як при 20 мл та 25 мл екстракту розмір збільшувався до 8,49 нм та 8,61 нм відповідно.

Автори також відзначили роль біомолекул, таких як білки, ферменти, вуглеводи, ліпіди, полісахариди та вторинні метаболіти — терпеноїди, алкалоїди й поліфеноли, що містяться в екстракті мікроводоростей, у каталізі синтезу НЧ



(рис. 3.38).

Рис. 3.38.

Ймовірний механізм біосинтезу наночастинок оксиду міді за допомогою мікроводоростей водоростей.

Спочатку біомолекули, присутні у водному екстракті водоростей, відновлюють $\text{Cu}(\text{II})$ до $\text{Cu}(0)$, які об'єднуються утворюючи наночастинок. Після цього відбувається зростання кристалів до досягнення наночастинок стабільної форми й розміру.

Було проведено та отримано спектри за допомогою XRD аналізу (рентгенодифракційний аналіз) для наночастинок оксиду міді синтезованих біологічно та хімічно (рис. 3.39). В результаті для НЧ було визначено кристалічну структуру моноклінного типу з центрованою решіткою, що підтверджується піками при значеннях 2θ : $32,48^\circ$, $35,49^\circ$, $38,69^\circ$, $48,66^\circ$, $53,41^\circ$, $58,25^\circ$, $61,46^\circ$, $66,14^\circ$ та $68,01^\circ$, які відповідають кристалографічним площинам (110), (-111), (111), (202), (020), (202), (113), (-311) та (220) відповідно. У жодному з чотирьох зразків не було виявлено додаткових піків, що свідчить про чистоту синтезованих наночастинок.

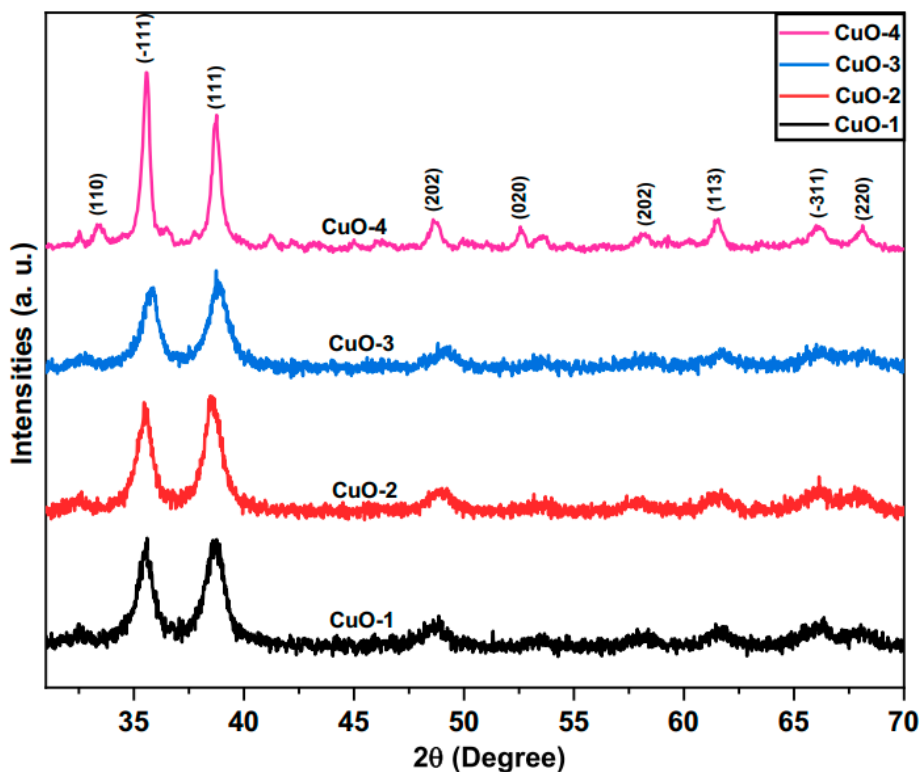


Рис. 3.39. Рентгенодифракційні (XRD) спектри біосинтезованих наночастинок оксиду міді (CuO-1, CuO-2 та CuO-3) та хімічно синтезованих

наночастинок

(CuO-4).

Параметр орієнтації (γ_{hkl}) позначає ступінь вирівнювання кристалів уздовж певної кристалографічної площини. Для оцінки цього параметра синтезованих НЧ для конкретної площини з індексами Міллера (hkl) використовували наступне рівняння:

$$\gamma_{hkl} = \frac{I_{hkl}}{I_{110}+I_{\bar{1}11}+I_{1\bar{1}1}+I_{202}+I_{020}+I_{202}+I_{113}+I_{\bar{3}11}+I_{220}},$$

де I_{hkl} — позначає інтенсивність, пов'язану з площинами з відповідними індексами Міллера (hkl).

З обчислених значень параметра орієнтації (табл. 3.8) можна помітити, що значення γ_{hkl} зменшуються вздовж площини (110) при переході від CuO-1 до CuO-4 і зростають вздовж площини (111), за винятком CuO-4. Що означає, що збільшення об'єму екстракту мікроводоростей знижує ріст кристалів наночастинок вздовж площини (110) і підвищує вздовж (111). Вздовж інших площин значення γ_{hkl} мають випадковий і нерегулярний характер.

Табл. 3.8

Значення параметра орієнтації вздовж окремих кристалографічних площин

№	Параметр орієнтації γ_{hkl}									
	Назва зразка	(110)	($\bar{1}11$)	(111)	(202)	(020)	(202)	(113)	($\bar{3}11$)	(220)
1	CuO-1	0.08 57	0.2013	0.19 94	0.096 4	0.072 7	0.078 8	0.086 0	0.0947	0.084 8

2	CuO-2	0.08 06	0.2015	0.21 07	0.085 7	0.077 5	0.072 5	0.083 7	0.1005	0.087 2
3	CuO-3	0.07 99	0.1888	0.21 66	0.095 5	0.075 1	0.078 9	0.085 3	0.0933	0.086 4
4	CuO-4	0.07 46	0.2678	0.21 32	0.082 4	0.072 2	0.062 0	0.082 4	0.0717	0.073 5

За допомогою рівняння Шерера було розраховано розмір кристалітів зразків за піком рентгенівської дифракції (XRD).

Табл. 3.9

**Напруга та розмір кристалітів синтезованих наночастинок,
розраховані за рівнянням Шерера для різних площин та графіка
Вільямсона-Голла (W-H)**

№	Назва зразка	Розмір кристалітів (t_s)								t_{WH}	Мікро- напруга (ϵ) (111)
		(110)	(-111)	(111)	(202)	(020)	(113)	(-311)	(220)		
1	CuO-1	7.59	9.50	7.62	6.90	13.54	11.98	5.81	8.04	8.83	0.0010
2	CuO-2	7.14	9.11	8.49	5.24	11.46	4.37	11.35	4.26	16.71	0.0151
3	CuO-3	6.12	8.59	8.61	6.38	28.51	25.58	7.66	9.16	6.00	- 0.0089

4	CuO- 4	17.17	20.38	17.62	14.46	19.07	11.0 3	12.43	12.43	86.68	0.0095
---	-----------	-------	-------	-------	-------	-------	-----------	-------	-------	-------	--------

Згідно з отриманими даними, розмір кристалітів НЧ, синтезованих із використанням мікроводоростей, знаходиться в межах від 4,26 нм до 28,51 нм. У таблиці 3.9 можна помітити поступове зменшення розміру кристалітів у напрямку площини (110) та збільшення в напрямку площини (111). Аналіз за методом Вільямсона-Голла відіграє важливу роль у визначенні розміру кристалітів і мікронапруги. Лінійна апроксимація кривої залежності $\beta \cos \theta$ від $\sin \theta$ була порівняна за наступним рівнянням:

$$\beta \cos \theta = (C\lambda / t_{WH}) + 2\varepsilon \sin \theta ,$$

де β — це повна ширина на половині висоти (FWHM), що відповідає піку за Бреггом;

C — коефіцієнт 0,9;

λ — довжина хвилі;

t_{WH} — розмір кристалу;

ε — мікронапруга [69].

На графіку Вільямсона-Голла (рис. 3.40) показано рівняння лінії тренду разом із коефіцієнтом регресії (R^2). Графік демонструє, що точки отриманих значень значно відхиляються від лінії тренду, що свідчить про наявність невизначеностей, які позначено стандартними похибками. Розраховані значення мікронапруги (ε) і розміру кристалітів (t_{WH}) наведено в таблиці 3.9, які дозволяють кількісно оцінити вплив напруги на розмір кристалітів. Було виявлено, що зі збільшенням об'єму екстракту мікроводоростей зростає мікронапруга в наночастинках оксиду міді, що впливає на формування структури

НЧ. У даному випадку присутні два типи мікронапруг: стискаюча (позначається знаком «мінус») і розтягуюча (позначається знаком «плюс»).

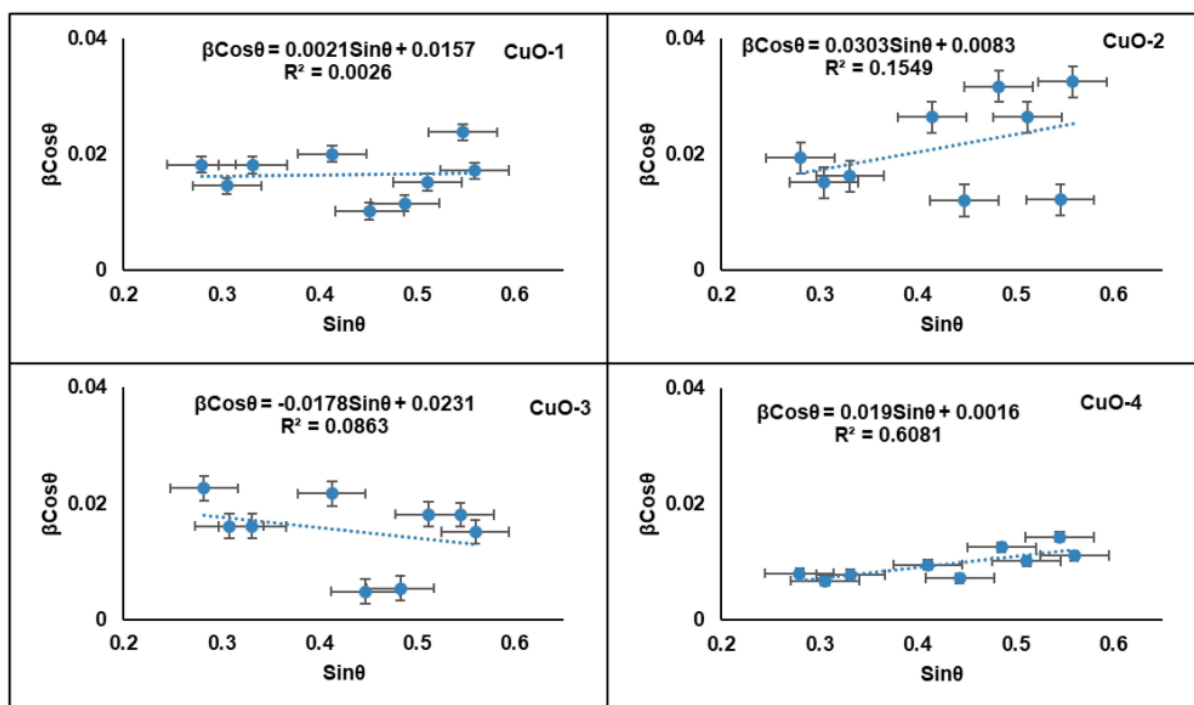


Рис. 3.40. Графік Вільямсона-Голла (W-H) для біосинтезованих наночастинок оксиду міді (CuO-1, CuO-2 і CuO-3) та хімічно синтезованих (CuO-4). Стандартні смуги похибки демонструють невизначеності.

Було встановлено, що щільність дислокацій (табл. 3.10) зростає вздовж площини (110) і зменшується вздовж площини (111) для наночастинок оксиду міді, отриманих за допомогою міководоростей. Для всіх інших кристалографічних площин спостерігалось випадкове коливання значень $\delta_{(hkl)}$. Щільність дислокацій $\delta_{(hkl)}$ для всіх зразків по кожній площині була визначена за допомогою наступного рівняння:

$$\delta_{(hkl)} = \frac{l}{(t_s)^2}$$

Табл. 3.10

Щільність дислокацій ($\delta_{(hkl)}$) вздовж різних кристалографічних площин ($\times 10^{15} \text{ м}^{-2}$)

№	$\delta_{(hkl)} \times 10^{15} \text{ м}^{-2}$									
	Назва зразка	(110)	($\bar{1}11$)	(111)	(202)	(020)	(202)	(113)	($\bar{3}11$)	(220)
1	CuO-1	0.0173	0.0111	0.0172	0.0210	0.0054	0.0070	0.0121	0.0296	0.0155
2	CuO-2	0.0196	0.0120	0.0139	0.0364	0.0076	0.0524	0.0364	0.0077	0.0551
3	CuO-3	0.0267	0.0135	0.0135	0.0246	0.0012	0.0015	0.0172	0.0170	0.0119
4	CuO-4	0.0034	0.0024	0.0032	0.0048	0.0027	0.0082	0.0054	0.0107	0.0065

DLS було використано для аналізу гідродинамічного розміру наночастинок оксиду міді. Було показано розподіл біосинтезованих та хімічно синтезованих наночастинок (рис. 3.41). Середні розміри частинок CuO-1, CuO-2, CuO-3 та CuO-4 становили відповідно 383,2; 457,9; 499,8 та 1092 нм.

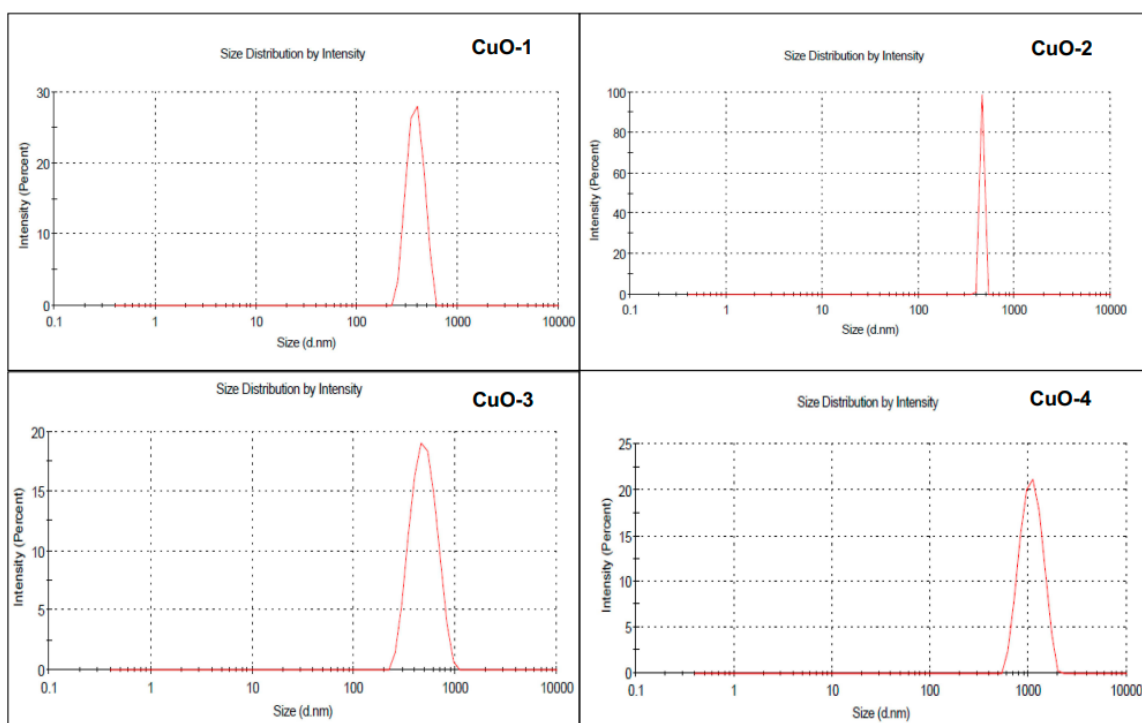


Рис. 3.41. Аналіз розміру за допомогою DLS для біосинтезованих (CuO-1, CuO-2 та CuO-3) і хімічно синтезованих наночастинок оксиду міді (CuO-4).

Аналізовані розміри частинок були більшими за ті, що оцінені методом рентгеноструктурного аналізу (XRD), оскільки отриманий розмір охоплює не лише ядро наночастинок, але й біоматеріал, адсорбований на поверхні біосинтезованих наночастинок, а також електричний шар, який їх оточує. Гідродинамічний розмір усіх біосинтезованих наночастинок оксиду міді свідчив про їх агломерацію. Агломерація частинок також впливала на фотокаталітичну активність біосинтезованих наночастинок. Зі збільшенням агломерації фотокаталітична активність зменшувалася через зниження глибини проникнення видимого світла всередину агломератів наночастинок.

Дослідження FTIR було проведено з метою ідентифікації біомолекул, присутніх у водорості *Coelastrella terrestris*, а також у біосинтезованих наночастинок (CuO-1, CuO-2 і CuO-3). FTIR-спектри мікрowodорості *Coelastrella terrestris*, біосинтезованих і хімічно синтезованих наночастинок

показані на рис. 3.42, а хвильові числа та відповідні функціональні групи наведено в табл. 3.11. Спектри обох зразків демонструють значну подібність з незначними зсувами положень піків, визначених за хвильовим числом. Це підтверджує роль екстракту мікроводорості *Coelastrella terrestris* як відновника і стабілізатора у процесі біосинтезу наночастинок.

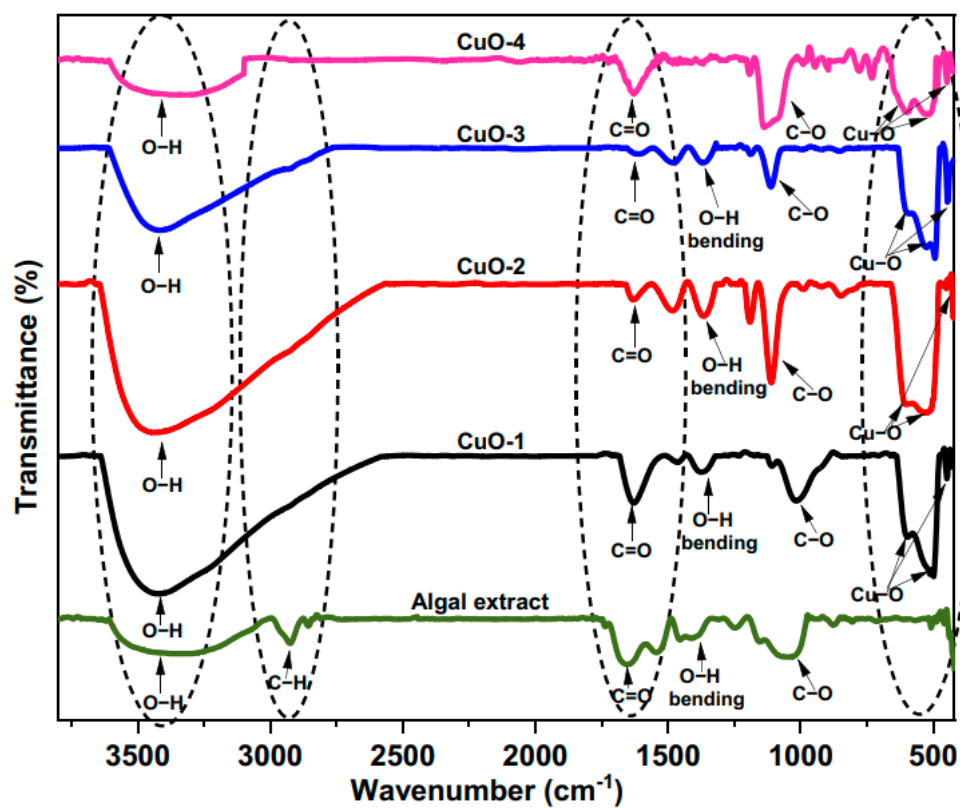


Рис. 3.42. FTIR-спектри екстракту мікроводорості, біосинтезованих (CuO-1, CuO-2 і CuO-3) та хімічно синтезованих наночастинок оксиду міді (CuO-4).

Табл. 3.11

Аналіз функціональних груп *Coelastrella terrestris*, біосинтезованих (CuO-1, CuO-2, CuO-3) та хімічно синтезованих наночастинок оксиду міді (CuO-4) за допомогою FTIR

Діапазон хвильових чисел (см ⁻¹)	CuO -1	CuO -2	CuO -3	CuO -4	Призначення функціональної групи
3430	3439	3451	3440	3359	$\nu(\text{O-H})$ валентне коливання вологи, спиртів і фенолів; $\nu(\text{N-H})$ валентне коливання амінів
2921	—	—	—	—	$\nu(\text{C-H})$ валентне коливання ліпідів і вуглеводів
1654	1627	1629	1611	1629	$\nu(\text{C=O})$ валентне коливання амідів та поглинутого CO_2
1537	1467	1494	1482	—	$\nu(\text{N-H})$ деформаційне та $\nu(\text{C-N})$ валентне коливання амідних груп
1395	1365	1365	1365	—	$\nu(\text{O-H})$ деформаційне коливання карбонових кислот і спиртів
1048	1014	1113	1116	1119	$\nu(\text{C-O})$ коливання вуглеводів
—	608	608	605	600	$\nu(\text{Cu-O})$ коливання зв'язку Cu– O у наночастинках
—	500	528	494	515	$\nu(\text{Cu-O})$ коливання зв'язку Cu– O у наночастинках
—	448	423	445	430	$\nu(\text{Cu-O})$ коливання зв'язку Cu– O у наночастинках

Піки FTIR-спектрів свідчать, що метаболіти, присутні у мікрowodоростях, такі як терпеноїди, глікозиди, полісахариди, вуглеводи, ліпіди, білки, флавоноїди, феноли й таніни, що містять функціональні групи кетонів, альдегідів, карбонових кислот і амідів, покривали поверхню наночастинок оксиду міді. Загалом у всіх синтезованих наночастинок був виявлений характерний пік зв'язку Cu–O, який спостерігався приблизно на 608 cm^{-1} , 500 cm^{-1} і 440 cm^{-1} .

Як показано на рис. 3.43, значення ширини забороненої зони (band gap) синтезованих наночастинок було визначено за допомогою графіка Таука. Його побудовано за наступною формулою:

$$(\alpha h\nu)^{1/n} = A(h\nu - E_g),$$

де α — коефіцієнт поглинання;

A — константа пропорційності;

$h\nu$ — частота падаючого світла;

E_g — ширина забороненої зони.

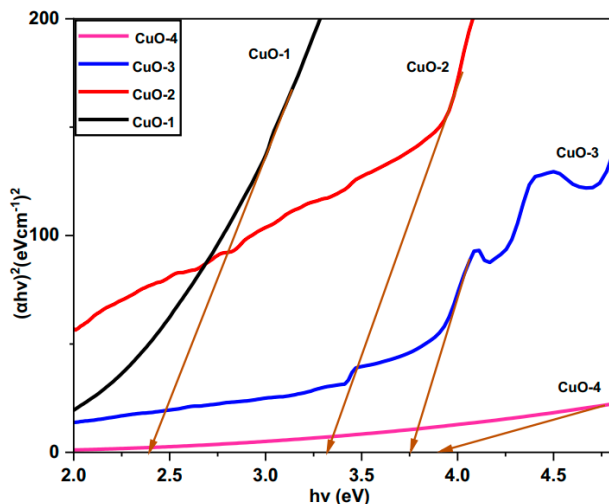


Рис. 3.43. Графік Тауца для біосинтезованих (CuO-1, CuO-2 та CuO-3) і хімічно синтезованих наночастинок оксиду міді (CuO-4).

Тип переходу електронів у напівпровідниках визначається показником степеня “ n ” у рівнянні Тауца: при $n = \frac{1}{2}$ спостерігається прямий

перехід, а при $n = 2$ — непрямий [61]. Для наночастинок оксиду міді було

виявлено прямий перехід, який визначали за допомогою побудови графіка — шляхом екстраполяції лінійної ділянки кривої до осі енергії ($h\nu$). Отримані значення ширини забороненої зони (band gap) склали 2,40 eV для CuO-1, 3,31 eV для CuO-2, 3,74 eV для CuO-3 та 3,90 eV для CuO-4, що значно більше, ніж у CuO синтезованого хімічно (1,2 eV). Серед усіх синтезованих наночастинок найменшу ширину забороненої зони мав зразок CuO-1, що свідчить про його найкращу фотокаталітичну активність при розкладанні барвника AB10B.

За допомогою скануючої електронної мікроскопії з польовою емісією (FESEM) було отримано зображення (рис. 3.44). У зразку CuO-1, для якого використовували найменшу кількість екстракту мікроводоростей, спостерігались структури, схожі на рисові зерна. Збільшення кількості екстракту під час процесу нуклеації сприяло «злипання», тобто агломерації, цих структур у форми, подібні до пелюсток (рис. 3.45). У літературі згадується, що при використанні 10 mM прекурсору наночастинок оксиду міді агломерували вже протягом перших 20 хвилин реакції [74]. Цей процес активується органічними сполуками, що утворюються під час біосинтезу наночастинок. Згідно з дослідженням [26], мідні частинки агломерують на стадії утворення ядер, щоб зменшити загальну поверхневу енергію. Така агломерація може бути спричинена силами Ван дер Ваальса між утвореними кристалами. Отже, форма, орієнтація та самоорганізація наноструктур значною мірою залежать від складу екстракту, що підтверджується дослідженням [8], в якому було проаналізовано синтезовані наночастинок з екстрактів різних рослинних організмів. У зразку CuO-4 (хімічно синтезованому) спостерігається форма у вигляді пластин, подібна до тієї, що характерна для CuO-1, із поодинокими утвореннями стрижнеподібних структур. Хімічний склад НЧ був досліджений методом енергетично-дисперсійної спектроскопії (EDS) (рис. 3.46). У спектрах EDS чітко видно інтенсивні піки міді (Cu) та кисню (O). Слабкі

піки вуглецю (C) і сірки (S), що пояснюється наявністю фітохімічних речовин у розчині екстракту мікроводоростей.

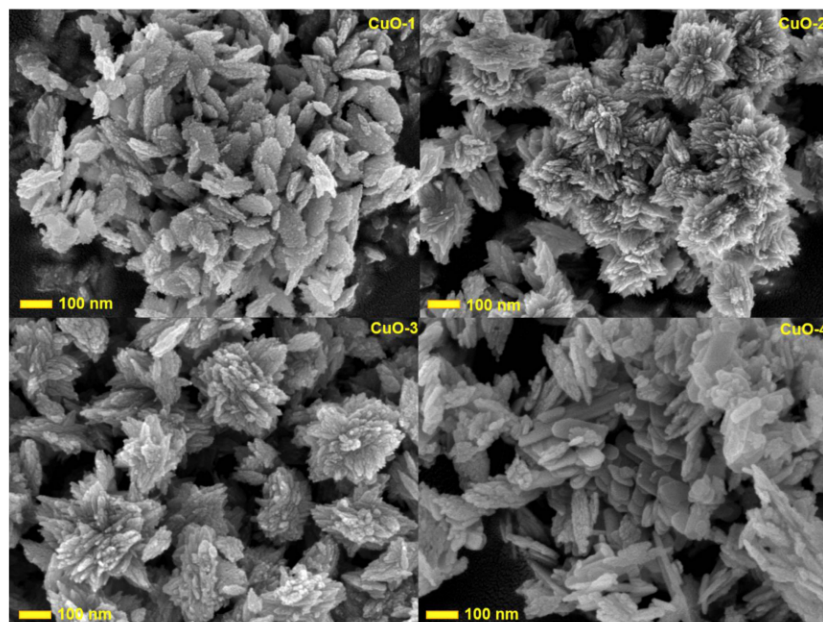


Рис. 3.44. Зображення біосинтезованих (CuO-1, CuO-2 і CuO-3) та хімічно синтезованих наночастинок оксиду міді (CuO-4), отримані методом FESEM.

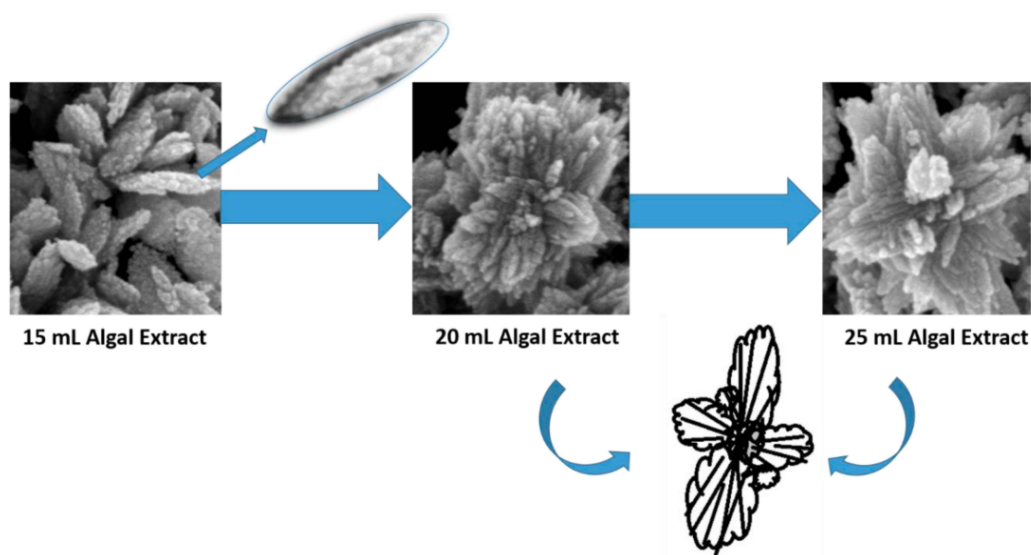


Рис. 3.45. Формування наноструктури CuO у вигляді пелюсток.

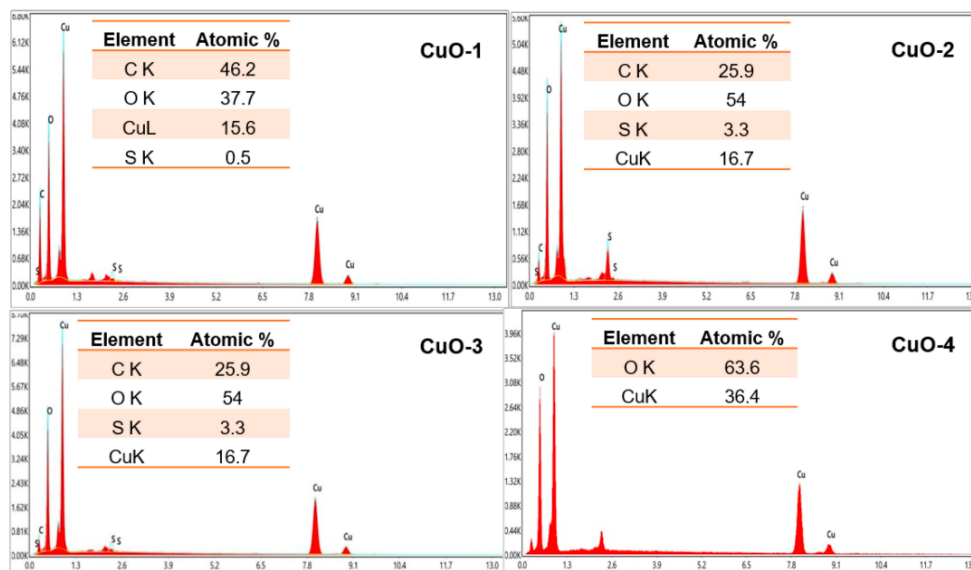
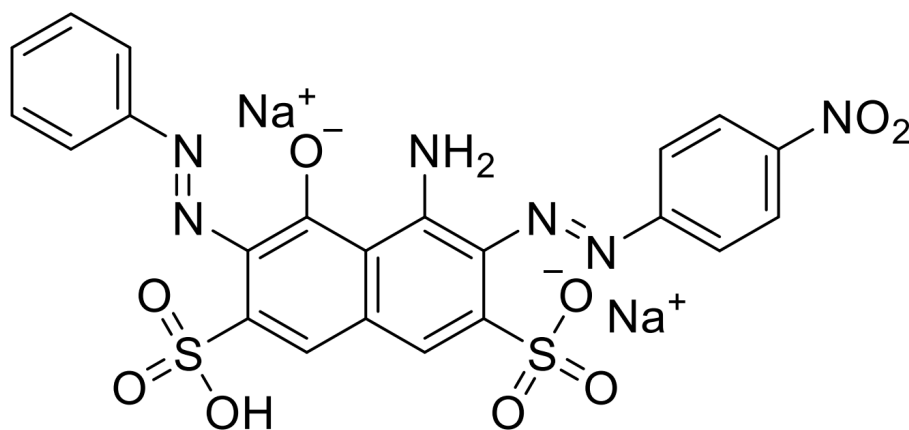


Рис. 3.46. Спектри EDS біосинтезованих (CuO-1, CuO-2 та CuO-3) і хімічно синтезованих наночастинок оксиду міді (CuO-4).

Фотокаталітичне розкладання барвника за допомогою НЧ пов'язане з процесами адсорбції та фотокаталізу. Обраний барвник АВ10В має кольоровий індекс (C.I.) 20470, його структура показана на рис. 3.47. Була проведена серія експериментів для визначення оптимальних умов для деградації барвника АВ10В



за допомогою НЧ під видимим світлом.

Рис. 3.47.
Структура барвника АВ10В.

Фотодеградацію барвника АВ10В

вимірювалася за допомогою УФ-видимих спектрів при максимальній довжині хвилі поглинання (λ_{max}) 618 нм. Цей пік був виявлений через наявність групи – N=N–. Для визначення, чи відбувається деградація через адсорбцію, фотоліз чи фотокаталіз, були проведені три набори реакцій: з каталізатором у темряві, без

каталізатора на світлі, з каталізатором на світлі. Було визначено, що деградація барвника була незначною без каталізатора на світлі та з каталізатором у темряві, і найбільш активно деградація відбувалася на світлі за присутності каталізатора. Це спостереження підтверджується раніше отриманими даними про ефективність деградації барвників наночастинками під дією видимого світла [44]. Порівняльне дослідження CuO-1, CuO-2, CuO-3 та CuO-4 показало, що максимальна деградація барвника (84%) була досягнута за допомогою каталізатора CuO-1 за тих самих експериментальних умов (рис. 3.48). Тому для подальшого дослідження був обраний нанокаталізатор CuO-1. Для оптимізації параметрів реакції були використані різні параметри, такі як рН розчину, концентрація барвника та дозування нанокаталізатора CuO-1.

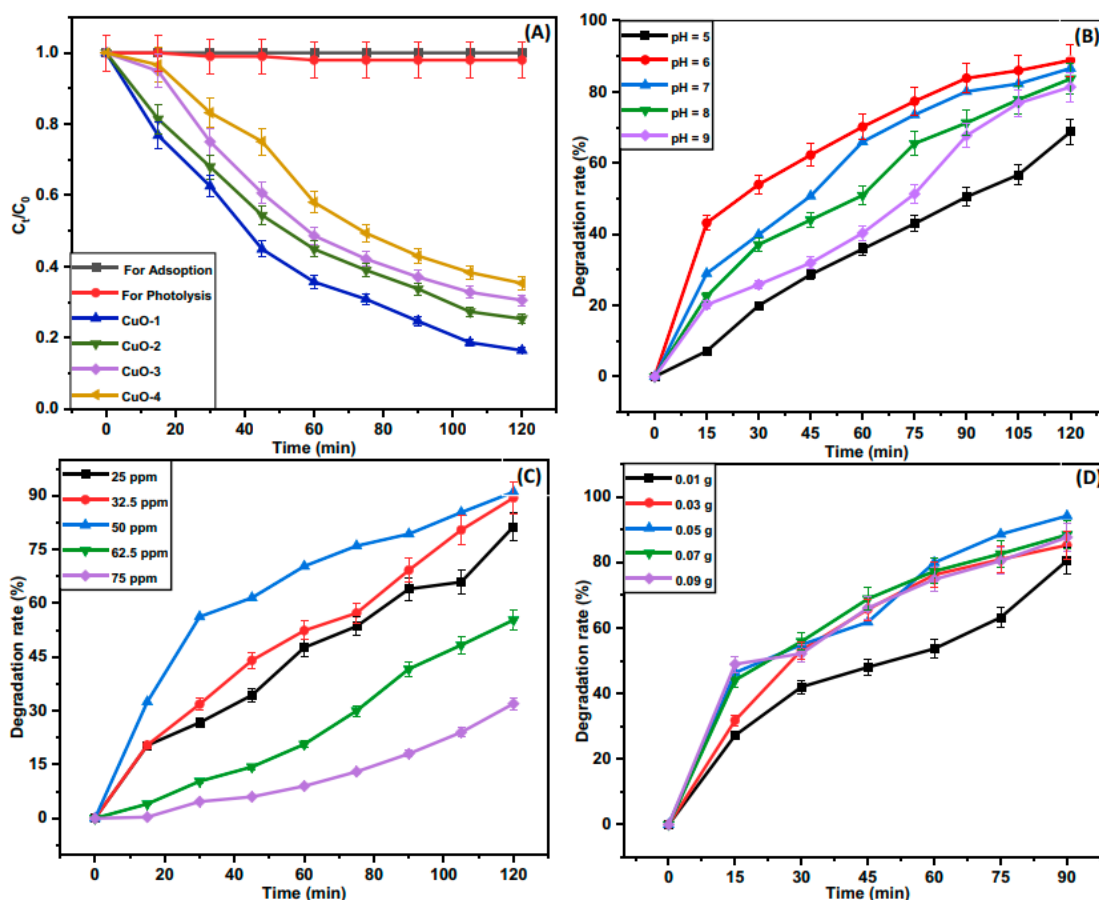


Рис. 3.48. А — порівняльний аналіз швидкості розкладу барвника АВ10В з використанням каталізатора в темряві, без каталізатора на світлі, CuO-1 (на

світлі), CuO-2 (на світлі), CuO-3 (на світлі) та CuO-4 (на світлі); Експериментальне дослідження впливу В — рН, С — концентрації барвника, D — дози каталізатора на деградацію барвника АВ10В за допомогою CuO-1.

Щоб визначити вплив концентрації барвника АВ10В на фотокаталітичну активність, її змінювали від 25 ppm до 75 ppm, залишаючи інші параметри незмінними. Отримані результати наведено на рис. 3.47 С. При збільшенні концентрації барвника з 25 ppm до 50 ppm відсоток деградації зростав з 81,39% до 91,03%, але при подальшому збільшенні до 75 ppm ефективність деградації значно зменшилася — до 33%. Отже, оптимальною концентрацією барвника було визначено 50 ppm.

Вплив кількості каталізатора на деградацію барвника АВ10В вивчали, змінюючи дозу каталізатора від 0,01 г до 0,09 г при оптимальному рН 6 і концентрації барвника 50 ppm (рис. 3.48 D). Зі збільшенням кількості каталізатора з 0,01 г до 0,05 г ефективність деградації зросла з 80,56% до 94,19%. Однак подальше збільшення дози каталізатора призвело до зниження відсотка деградації до 87,64%. Отже, 0,05 г каталізатора CuO-1 є оптимальною кількістю для максимального розкладу барвника. Ідеальні умови для деградації барвника АВ10В за допомогою фотокаталізатора CuO-1 при видимому світлі наведені в табл. 3.12.

Табл. 3.12

Оптимальні умови реакції для деградації барвника АВ10В за допомогою каталізатора CuO-1

№	Оптимізований параметр	Оптимальне значення
1	рН	6

2	Концентрація барвника	50 ppm
3	Доза каталізатора	0,05 г

З метою повторного використання каталізатора розчин барвника з каталізатором центрифугували, промивали тричі дистильованою водою та висушували. У цьому дослідженні каталізатор успішно використовували повторно до 5 разів із мінімальною втратою активності (рис. 3.49).

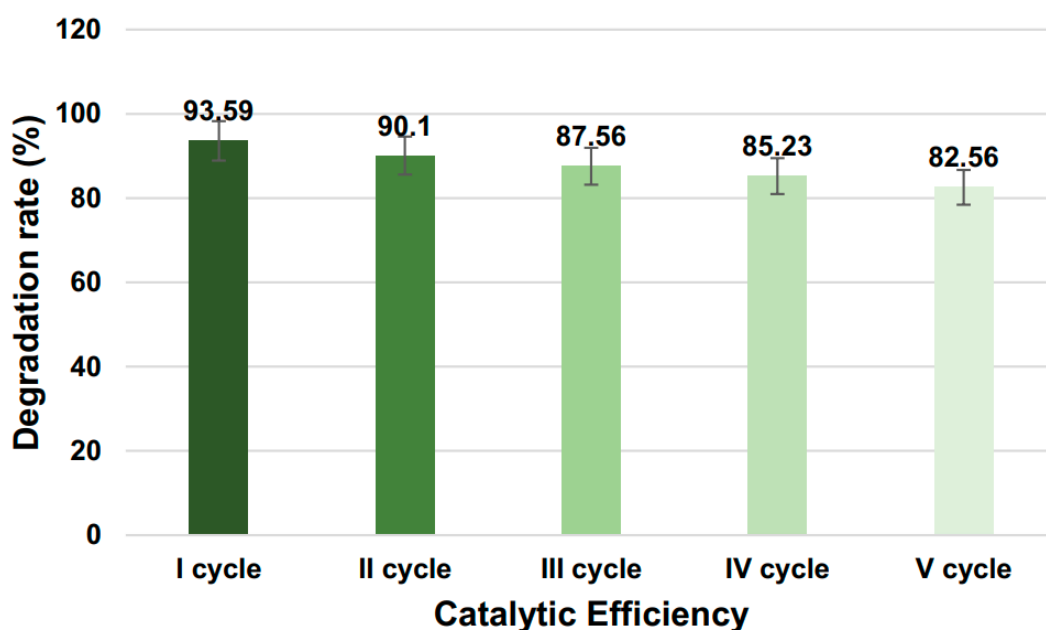


Рис. 3.49. Графічне зображення повторного використання CuO-1.

На рис. 3.50 показано, що фотокаталітична деградація барвника AB10B відповідає кінетичній моделі Ленгмюра–Хіншельвуда, що є типовим для досліджень кінетики швидкості фотокаталітичного знебарвлення барвників [37]. Побудова графіка залежності $\ln(C_0/C_t)$ від часу опромінення (t) дала пряму лінію з коефіцієнтом лінійної регресії $R^2 = 0,9604$. Псевдоконстанта швидкості (k), обчислена зі значення нахилу графіка залежності, становила $0,0296 \text{ хв}^{-1}$.

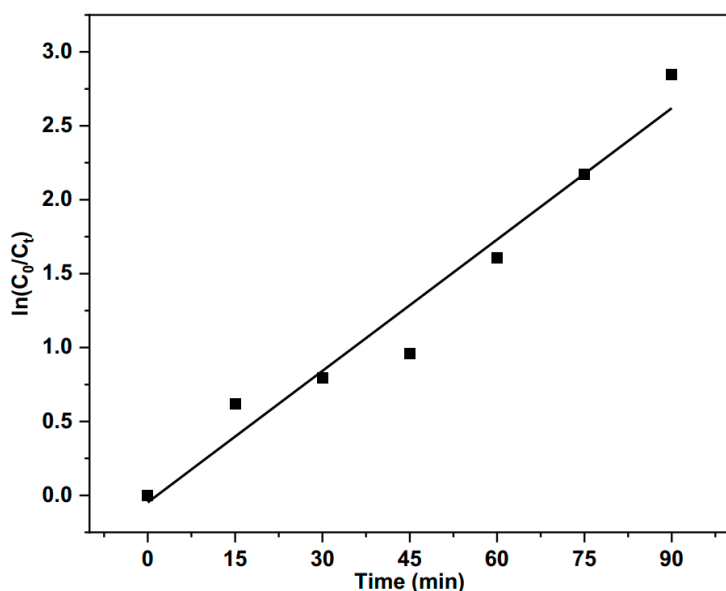
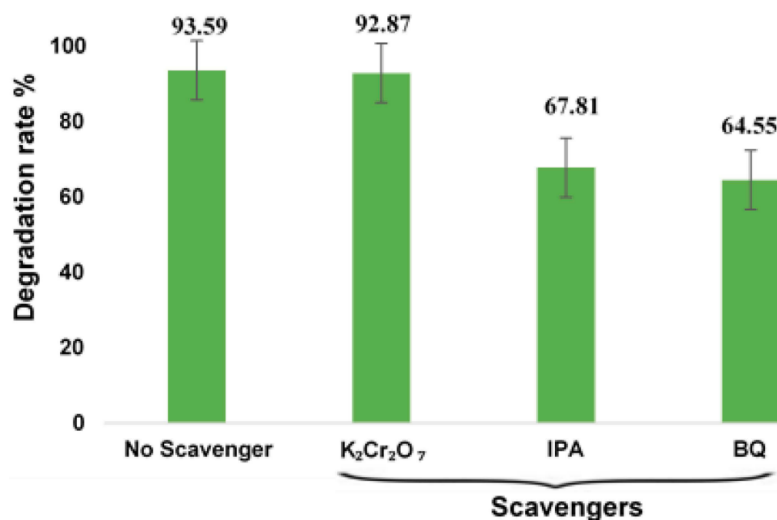


Рис. 3.50. Кінетичне

дослідження фотокаталітичного розкладу барвника АВ10В після оптимізації всіх параметрів при рН = 6, концентрації барвника = 50 ppm та дозі каталізатора = 0.05 г.

Для визначення який із основних реактивних видів — електрони (e^-), радикали $\cdot\text{OH}$ або супероксидні радикали ($\text{O}_2^{\cdot-}$) — є

головними у процесі фотодеградації, провели серію експериментів. Для нейтралізації використовували $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (для електронів), ізопропіловий спирт (ІРА, для радикалів $\cdot\text{OH}$) і бензохінон (ВQ, для супероксидних радикалів) (рис. 3.51). Результати показали, що електрони не беруть участь у деградації барвника АВ10В. Крім того, в присутності ІРА та ВQ ефективність деградації знижувалася,



що вказує на те, що радикали $\cdot\text{OH}$ і $\text{O}_2^{\cdot-}$ є основними активними видами при фотодеградації під видимим світлом.

Рис. 3.51. Дослідження впливу різних факторів на деградацію АВ10В за допомогою CuO-1 .

Механізм фотокаталітичної деградації полягає в тому, що під дією світла електрони в CuO-1 переходять із валентної зони в зону провідності, залишаючи “дірки”. Коли енергія поглинутого

світла дорівнює або перевищує ширину забороненої зони наночастинок, відбувається збудження електронів. Ці заряджені частинки або рекомбінують з утворенням інтенсивного флуоресцентного випромінювання, або взаємодіють з водою та киснем, утворюючи активні форми кисню (ROS), які й розкладають барвник [10]. Загалом, на ширину забороненої зони біосинтезованих наночастинок Cu_2O і CuO можуть впливати кілька чинників: ступінь кристалічності, розмір кристалітів, розмір та форма наночастинок [28]. CuO -1 має найменшу ширину забороненої зони (2,40 eV), тому проявляє найкращу активність.

Біосинтезовані наночастинок оксиду міді є екологічно безпечними, що підтверджується аналізом зразків води до і після фотокаталітичного розкладу барвника. Для оцінки ефективності очищення стічних вод, що містять барвник АВ10В, були використані різні показники якості води: рН, електропровідність, загальна кількість розчинених речовин (TDS), хімічне споживання кисню (COD) та розчинений кисень (DO). У таблиці 3.13 наведено результати цих показників до та після фотокаталітичної обробки. Дослідження показало, що біосинтезовані НЧ ефективно знижують рівень COD з 240 мг/л до 42 мг/л, що відповідає 82,5% видалення, і що свідчить про здатність НЧ ефективно руйнувати барвник АВ10В. Барвники після розкладу перетворилися на мінералізовані іони, що й призвело до незначного підвищення TDS та провідності, а також до зміни рН розчину на нейтральний. Таким чином, кореляція факторів зниження значення хімічного споживання кисню та підвищення кількості розчинених речовин свідчать про ефективність розкладання тестованого барвника за допомогою наночастинок [42].

Табл. 3.13

**Параметри аналізу води до та після фотокаталітичного розкладу
барвника АВ10В за допомогою наночастинок оксиду міді**

№	Параметр	До фотокаталітичної обробки	Після обробки НЧ
1	pH	7.6	7.1
2	Провідність (μS)	44.77	119.40
3	TDS (ppm)	30	90
4	ХСК (COD, мг/л)	240	42
5	Розчинений кисень (DO, ppm)	0.2	6.0

З метою оцінки антибактеріальної активності синтезованих наночастинок оксиду міді визначали мінімальну інгібуючу концентрацію (MIC) біологічно та хімічно синтезованих НЧ проти двох тестових патогенів — *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) та *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Для цього було проведено антибактеріальний тест методом агарових лунок. Біосинтезовані за допомогою мікроводоростей НЧ були позначені як CuO-1, CuO-2 та CuO-3, а хімічно синтезовані — як CuO-4. Значення MIC для обох патогенів при різних концентраціях НЧ наведені у таблицях 3.14 і 3.15 відповідно. Для кращого розуміння також побудовано стовпчикову діаграму (рис. 3.52), яка показує значення MIC (мкг/мл) для різних концентрацій наночастинок оксиду міді та антибіотика (офлоксацину) проти *S. aureus* і *P. aeruginosa*.

Табл. 3.14

MIC біосинтезованих і хімічно синтезованих наночастинок оксиду міді проти *S. aureus*

Зони інгібування росту (мм)

№	Назва зразка	Концентрація наночастинок (µL)					Позитивний контроль (µL)	Негативний контроль (µL)
		50	75	100	150	200		
1	CuO-1	—	18	19	20	22	14	—
2	CuO-2	—	15	15	16	17	15	—
3	CuO-3	—	17	17	18	19	14	—
4	CuO-4	—	9	10	12	12	16	—

Табл. 3.15

МІС біосинтезованих і хімічно синтезованих наночастинок оксиду міді проти *P. aeruginosa*

Зони інгібування росту (мм)								
№	Назва зразка	Концентрація наночастинок (µL)					Позитивний контроль (µL)	Негативний контроль (µL)
		50	75	100	150	200		
1	CuO-1	—	13	14	15	15	25	—
2	CuO-2	—	—	10	12	15	24	—
3	CuO-3	—	—	6	10	12	26	—
4	CuO-4	—	—	—	11	13	25	—

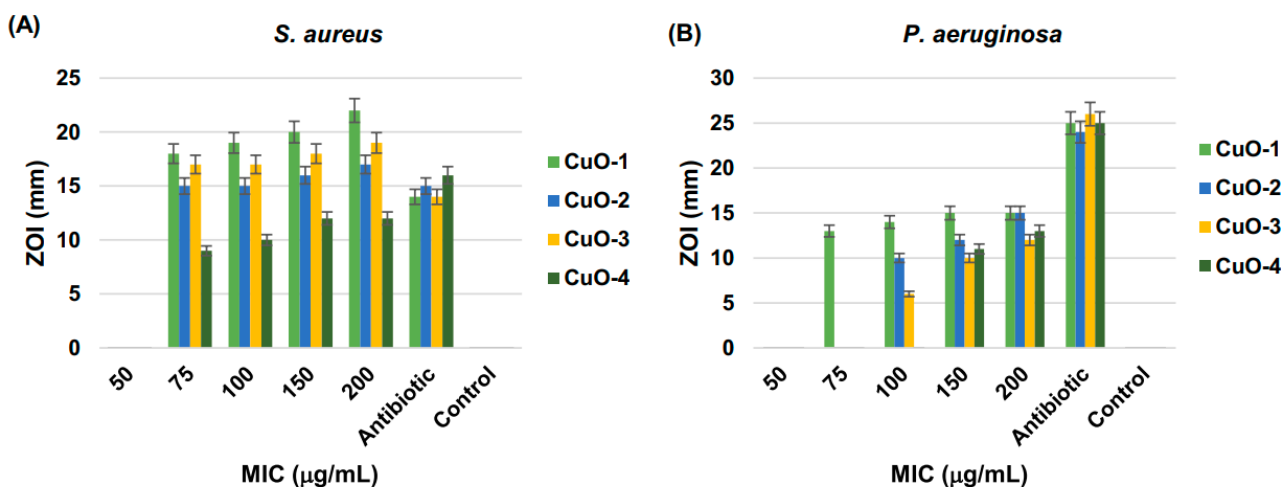


Рис. 3.52. Стовпчаста діаграма, що показує значення МІК ($\mu\text{g/mL}$) для різних концентрацій наночастинок, антибіотика (позитивного контролю) та негативного контролю проти бактеріальних штамів: А — *S. aureus* і В — *P. aeruginosa*.

Найнижча інгібуюча концентрація серед усіх НЧ становила 75 мкл для *S. aureus* і 150 мкл для *P. aeruginosa*. Розмір зони інгібування росту (ZOI) поступово збільшувався зі зростанням концентрації НЧ (75, 100, 150 та 200 мкл), нанесених у лунки, і значно відрізнявся залежно від методу синтезу (біологічного — CuO-1, CuO-2, CuO-3 та хімічного — CuO-4). Хімічно синтезовані НЧ (CuO-4) продемонстрували найменший розмір зони інгібування при всіх концентраціях для *S. aureus* (табл. 3.14). МІС для CuO-4 проти *P. aeruginosa* була найвищою і становила 150 мкл. У протипагу цьому, CuO-1 (біосинтезовані за допомогою мікроводоростей) мали найнижче МІС — 75 мкл. Значення МІС, отримані в цьому дослідженні, були дещо кращими за результати, отримані в дослідженнях раніше, оскільки в цій роботі використовувалися НЧ у концентрації меншою — 0,5 мг/мл, тоді як у згаданих раніше аналогічних роботах — 5 мг/мл.

Для дослідження антибактеріальної активності наночастинок оксиду міді (CuONPs) щодо тестових мікроорганізмів було використано тест Кірбі-Бауера.

Як позитивний контроль у цьому тесті використовували офлоксацин, а як негативний — дистильовану воду. Усі чотири синтезовані CuONPs продемонстрували вищу зону інгібування (ZOI, мм) проти *S. aureus*, а саме: CuO-1 — 22 мм, CuO-2 — 19 мм, CuO-3 — 19 мм, CuO-4 — 14 мм, тоді як у позитивного контролю (антибіотика) — 14 мм. Варто зазначити, що CuO-1 показав вищу антибактеріальну активність (ZOI = 22 мм), ніж сам антибіотик (ZOI = 14 мм) проти *S. aureus*. Проти *P. aeruginosa* значення ZOI становили: CuO-1 — 17 мм, CuO-2 — 16 мм, CuO-3 — 14 мм, CuO-4 — 13 мм, а позитивний контроль — 25 мм. У порівнянні з хімічно синтезованими наночастинками CuO (CuO-4), біосинтезовані з використанням біомаси (CuO-1, CuO-2, CuO-3) продемонстрували вищі значення зони інгібування, що відображено на рис. 3.53, а відповідні дані наведені в табл. 3.16.

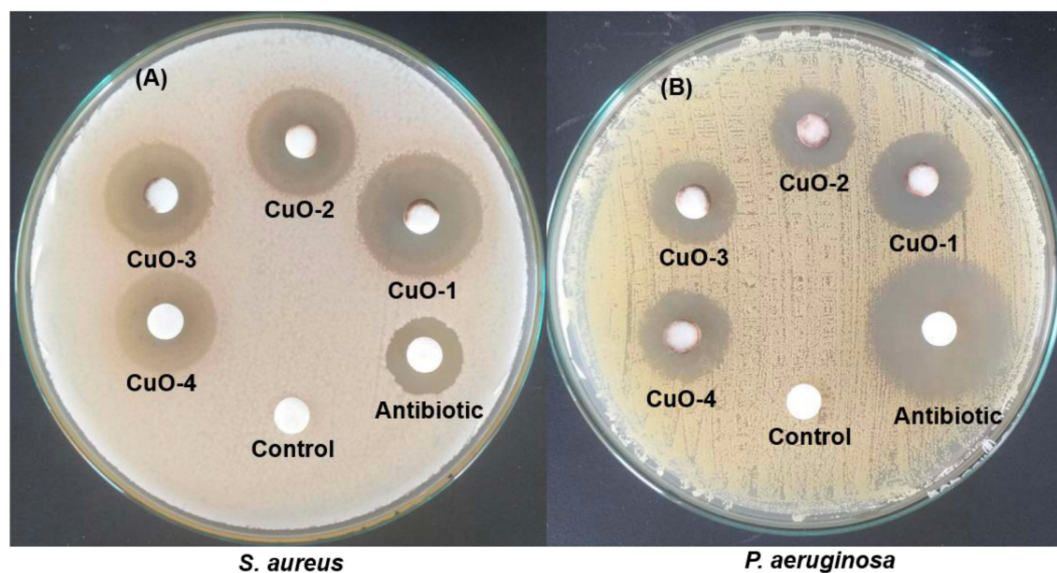


Рис. 3.53. Антибактеріальна активність біосинтезованих (CuO-1, CuO-2, CuO-3), хімічно синтезованих наночастинок оксиду міді (CuO-4), антибіотика/позитивного контролю та негативного контролю проти тестових патогенів: А — *S. aureus* та В — *P. aeruginosa* за допомогою методу дифузії в лунках.

Антибактеріальний тест, що показує зону інгібування (ЗІ, мм) для синтезованих наночастинок оксиду міді проти *S. aureus* та *P. aeruginosa*

№	Цільова бактерія	CuO-1 (μL)	CuO-2 (μL)	CuO-3 (μL)	CuO-4 (μL)	Позитивний контроль (μL)	Негативний контроль (μL)
1	<i>S. aureus</i>	22 мм	19 мм	19 мм	14 мм	14 мм	—
2	<i>P. aeruginosa</i>	17 мм	16 мм	15 мм	13 мм	25 мм	—

Оцінювали також вплив розміру та форми на антибактеріальну активність наночастинок. Серед усіх біосинтезованих НЧ найвищу активність проти обох тестованих патогенів показали НЧ, синтезовані з 15 мл водоростевого екстракту (CuO-1), завдяки їх найменшому розміру — 7,62 нм — вздовж площини (111). Для *S. aureus* зона інгібування CuO-1 (22 мм) була навіть більшою, ніж у позитивного контролю (офлоксацин — 14 мм), як показано на рис. 3.52. Для *P. aeruginosa* CuO-1 також продемонстрував найкращу антибактеріальну активність серед усіх синтезованих наночастинок завдяки малому розміру. Найнижчу ж антибактеріальну активність продемонстрували хімічно синтезовані наночастинок (CuO-4) проти обох патогенів — зона інгібування становила 14 мм для *S. aureus* і 13 мм для *P. aeruginosa*. Причиною такої низької активності є їх великий розмір кристалів — 20,38 нм вздовж площини (–111), як зазначено в таблиці 3.9. Результати показали, що наночастинок CuO-1 із формою зерен рису мають вищу антибактеріальну активність, ніж CuO-3 із формою пелюсток квітів. Також на підставі отриманих

даних можна зробити висновок, що НЧ, синтезовані за допомогою мікроводоростей *Coelastrella terrestris*, були ефективнішими проти *S. aureus* (грампозитивної бактерії), ніж проти *P. aeruginosa* (грамнегативної бактерії). Токсичність наночастинок пояснюється утворенням активних форм кисню (ROS), таких як супероксидні радикали ($O_2^{\cdot-}$) і гідроксильні радикали ($\cdot OH$). Наночастинки можуть потрапляти в бактерії та клітини людини, локалізуючись у мітохондріях і ядрі, де ROS взаємодіють з ДНК, білками та ліпідами, спричиняючи окислювальний стрес, руйнуючи клітинну мембрану, що, зрештою, призводить до загибелі клітини [7]. На рис. 3.54 наведено схематичне зображення ймовірного антибактеріального механізму дії наночастинок оксиду міді.

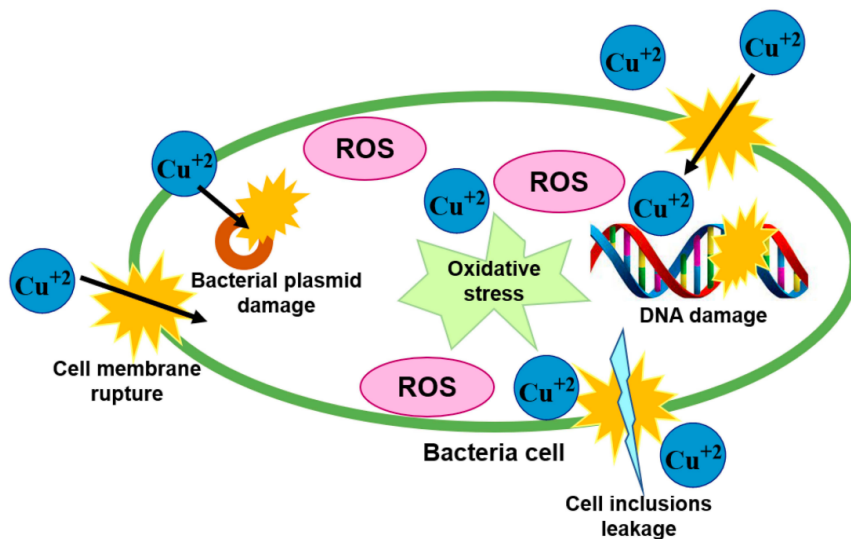


Рис. 3.54. Ймовірний антибактеріальний механізм дії синтезованих наночастинок оксиду міді.

Таким чином, дане дослідження демонструє підхід до синтезу наночастинок оксиду міді за допомогою екстракту мікроводорості *Coelastrella terrestris*. Дослідження методом XRD показало, що розмір частинок зменшується вздовж площини (110) і збільшується вздовж площини (111) зі збільшенням

об'єму екстракту мікроводорості. Отримані НЧ є нанокристалічними, з високою фазовою чистотою і розмірами в межах від 4,26 нм до 28,51 нм. FTIR-аналіз виявив, що фітохімічні молекули екстракту водорості відігравали роль у відновленні, стабілізації та капсуляції під час синтезу НЧ, а також наявність вторинних метаболітів на поверхні НЧ, із характерними вібраціями зв'язків Cu–O приблизно на 600 см^{-1} , 496 см^{-1} і 440 см^{-1} . Зображення FESEM показали, що збагачення екстрактом мікроводорості під час процесу нуклеації призвело до перетворення структур, схожих на рисові зерна, у структури, подібні до пелюсток квітів. Синтезовані наночастинки CuO-1 з найменшим значенням ширини забороненої зони (2,40 еВ) виявилися ефективними у деградації барвника Amido Black 10B (AB10B), при цьому була досягнута ефективність деградації 94,19% при рН 6, концентрації барвника 50 ppm, дозуванні наночастинок 0,05 г і часі реакції 90 хвилин. Результати оцінки антибактеріальної активності показали, що НЧ, синтезовані за участі водорості *Coelastrella terrestris*, були більш ефективними проти *S. aureus* (грампозитивна бактерія) із зоною інгібування росту (ZOI) 22 мм порівняно з *P. aeruginosa* (грамнегативна бактерія), у якої ZOI становила 17 мм [45].

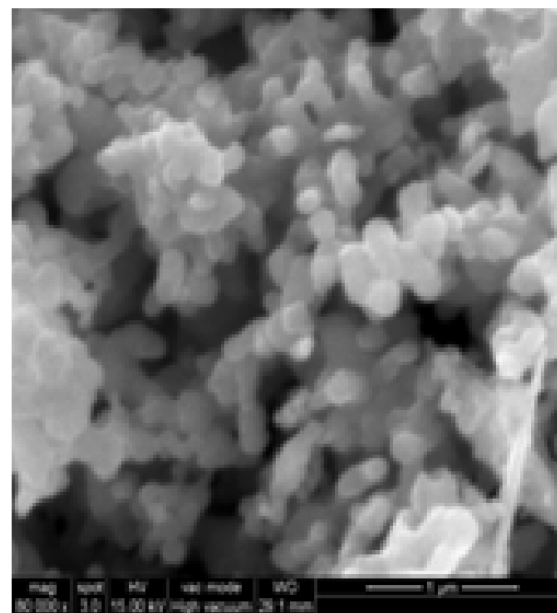
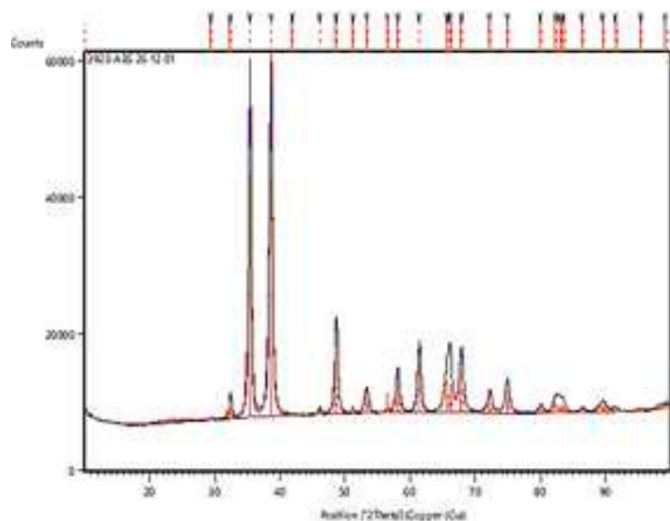
3.6. Характеристика наночастинок оксиду міді синтезованих за допомогою екстракту мікроводоростей *Chlorella vulgaris*

У цьому дослідженні *Chlorella vulgaris* використовувалась для біосинтезу наночастинок оксиду міді, які були досліджені на антибактеріальну активність проти бактерій та грибів. Перше підтвердження біосинтезу НЧ відбулося шляхом спостереження характерної зміни кольору. Спочатку розчин мав синій колір, через 8 годин синій колір зник, а після інкубації до 24 годин з'явився світло-коричневий відтінок, що свідчило про утворення наночастинок оксиду міді.

Ацетат міді в цьому дослідженні використовувався як прекурсорна сполука для синтезу наночастинок оксиду міді. Під час подальшого дослідження характеристик наночастинок, УФ-видимий спектр показав пікове поглинання приблизно на рівні 540 нм, що підтверджує наявність наночастинок оксиду міді. Дослідження рентгенівської дифракції (XRD) було проведено для виявлення кристалічної природи наночастинок. Використовуючи формулу Шерера, було обчислено розмір синтезованих НЧ, і середній розмір склав 19,98 нм. Дифрактограма синтезованих наночастинок оксиду міді наведена на рис. 3.55.

Рис. 3.55. Рентгенівський дифракційний аналіз (XRD) наночастинок оксиду міді

У цьому дослідженні дифракційні піки спостерігалися при $2\theta = 32, 35, 38, 49, 53, 58$ і 62 , що відповідає моноклінній кристалічній структурі оксиду міді.



Морфологія наночастинок була визначена за допомогою СЕМ. Зображення СЕМ синтезованих наночастинок показало однорідну округлу форму (рис. 3.56). Середній розмір частинок було розраховано за допомогою програми imageJ і встановлено на рівні $40,0 \pm 0$ нм.

Рис. 3.56. Аналіз наночастинок оксиду міді за допомогою СЕМ (скануючої електронної мікроскопії)

Аналіз EDAX було проведено для визначення елементного складу синтезованих НЧ. Підтверджено, що наночастинки складаються переважно з міді та кисню, як і передбачалося, із домішками вуглецю у вигляді незначної забруднюючої речовини (найпоширеніший контамінант) (рис. 3.57, табл. 3.17).

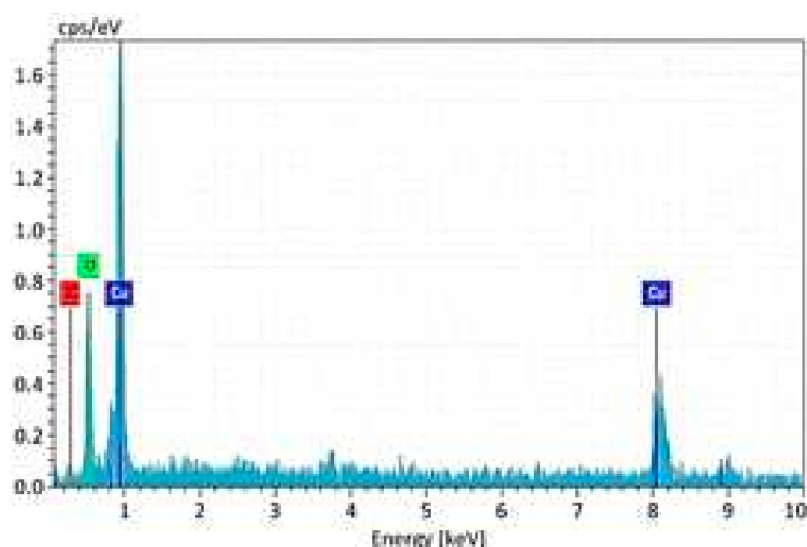


Рис. 3.57. Хімічний склад речовин у наночастинках

Табл. 3.17

Аналіз наночастинок оксиду міді за допомогою EDAX

Елемент	№	Маса [%]	Нормальна маса [%]	Кількість атомів [%]	Абсолютна похибка [%] (1 σ)	Відносна похибка [%] (1 σ)
Cu	29	48.29	75.97	42.99	2.77	5.74
O	8	12.72	20.02	44.99	3.42	26.88
C	6	2.55	4.02	12.02	1.94	76.14

		63.57	100.00	100.00		
--	--	-------	--------	--------	--	--

Було проведено також аналіз антибактеріальних досліджень наночастинок оксиду міді. У цій роботі мінімальна інгібуюча концентрація (МІС) наночастинок оксиду міді для грамнегативних та грампозитивних бактерій становила 250 мкг/мл, а для грибів — понад 500 мкг/мл. Значення МІС для наночастинок оксиду міді наведено в таблиці 3.17. У дослідженні були обрані грамнегативні бактерії (*E. coli* та *K. pneumoniae*), грампозитивні бактерії (*S. aureus*), та *C. albicans*, для вивчення антибактеріальної активності наночастинок оксиду міді.

Табл. 3.18

Значення МІС наночастинок оксиду міді проти грамнегативних, грампозитивних бактерій і грибів

№	Цільова бактерія	Концентрація наночастинок оксиду міді (µg)					
		15.625	31.25	62.5	125	250	500
1	<i>E. coli</i>	++	++	+	+	—	—
2	<i>K. pneumoniae</i>	++	++	++	++	—	—
3	<i>S. aureus</i>	+++	+++	+++	+++	—	—
4	<i>B. subtilis</i>	++	++	+	+	—	—
5	<i>C. albicans</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6	<i>A. niger</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Таким чином, у цьому дослідженні наночастинок оксиду міді з моноклінною кристалічною структурою були синтезовані з використанням

Chlorella vulgaris, а утворення НЧ було підтверджено за допомогою УФ-видимої спектроскопії (на довжині хвилі 540 нм). Аналіз XRD підтвердив кристалічну природу наночастинок і визначив їх середній розмір як 19,98 нм. Морфологія поверхні синтезованих наночастинок була однорідно округлою згідно з SEM-аналізом. EDAX-аналіз виявив елементний склад наночастинок і наявність вуглецю як домішки (найпоширенішого забруднювача). цій роботі мінімальна інгібуюча концентрація (MIC) наночастинок оксиду міді для грамнегативних та грампозитивних бактерій становила 250 мкг/мл, а для грибів — понад 500 мкг/мл, що засвідчить про антибактеріальну активність наночастинок у боротьбі з бактеріями та грибами [60].

3.7. Характеристика наночастинок оксиду міді синтезованих за допомогою екстракту мікроводоростей *Arthrospira maxima*

Процес біосинтезу наночастинок оксиду міді підтверджувався в першу чергу візуально зміною кольору реакційної суміші: від початкового синього до бурого, а згодом до червоно-цегляного. Для подальшого підтвердження синтезу наночастинок використовувалась УФ-видима спектроскопія. У спектрах було зафіксовано характерні піки поглинання: у зразках, отриманих з рідкого біоматеріалу, спостерігались максимуми при 750 нм та 290 нм, а у зразках з сухого — при 720 нм та 275 нм. Різниця між піками рідкого та сухого зразків була незначною. Згідно з даними літератури, утворення наночастинок оксиду міді зазвичай супроводжується піками в діапазоні 245–290 нм, що підтверджувалося і в цьому дослідженні.

Морфологічні характеристики отриманих НЧ досліджувались методом сканувальної електронної мікроскопії (SEM) (рис. 3.58). Аналіз за допомогою мікроскопа TESCAN – VEGA 3 в області візуалізації (5.93 мкм) при роздільній

здатності 1 мкм показав, що наночастинки, отримані з рідкого екстракту, мали діаметр у межах від 82 до 106 нм. У випадку сухого екстракту розмір НЧ був більшим — від 115 до 125 нм. SEM-зображення демонстрували чітку кристалічну структуру поверхні частинок.

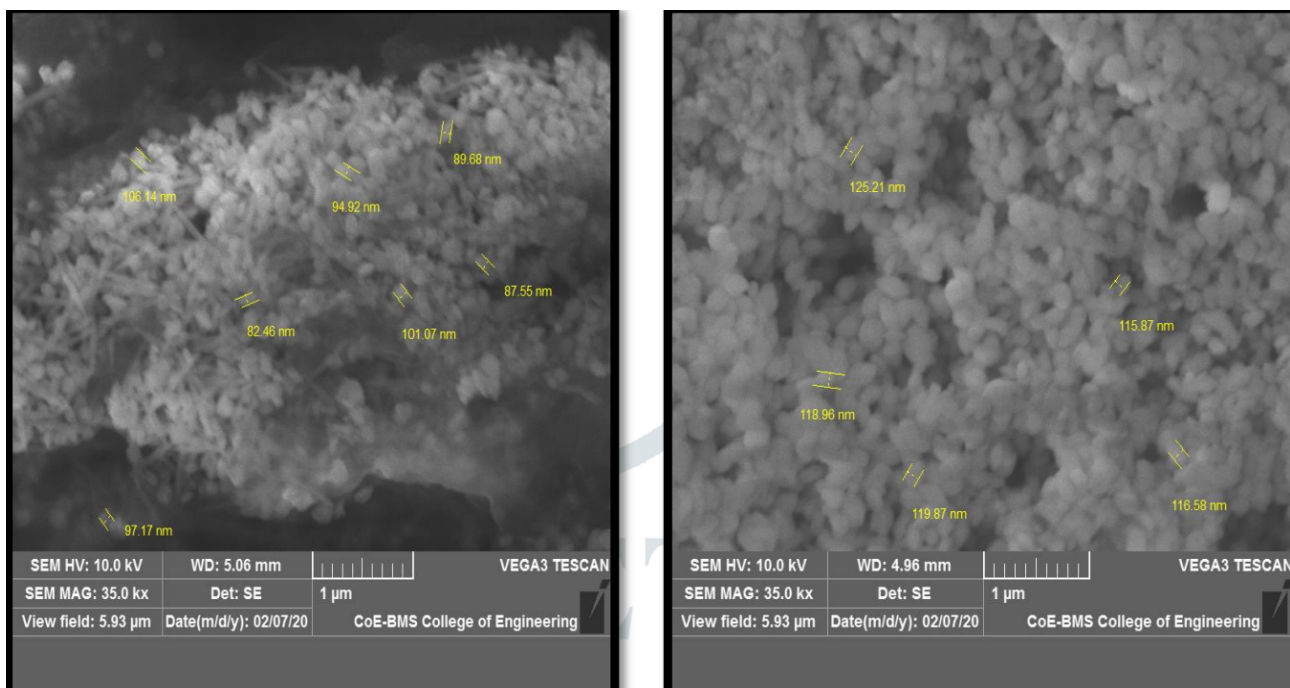


Рис. 3.58. Зображення SEM рідких і сухих зразків, що демонструють розміри наночастинок оксиду міді

Для оцінки складу наночастинок застосовували енергодисперсійний рентгенівський аналіз (EDAX) (рис. 3.59). Дослідження підтвердило наявність оксиду міді в усіх трьох типах екстрактів. У зразках були виявлені також наступні елементи: С, N, O, Si, P, S, K, Cu. У рідкому екстракті вміст Cu становив близько 6,07%, а кисню — 40,53%, сухий екстракт мав найвищу концентрацію міді — 27,25%, при 47,57% кисню. У комерційному екстракті значення Cu становить 6,23% та 29,92% O. Таким чином, серед усіх зразків саме сухий екстракт демонструє найвищу ефективність у синтезі НЧ.

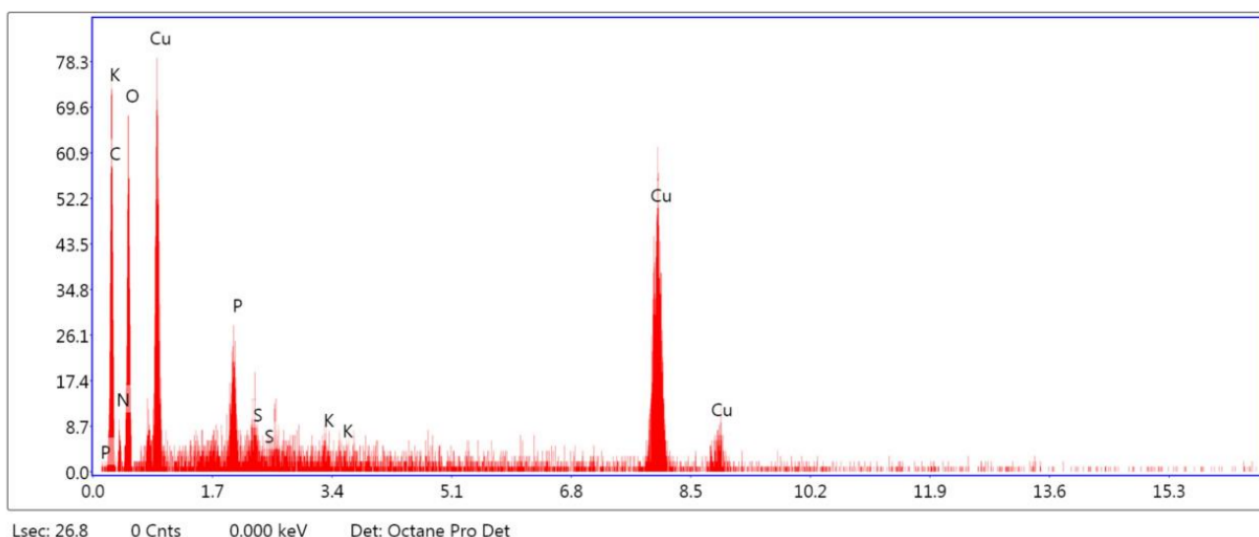


Рис. 3.59. Хімічний склад речовин у наночастинках

Отже, у даній роботі представлено біологічний метод синтезу наночастинок міді за допомогою мікроводорості *Arthrospira maxima*. По-перше, синтез НЧ підтверджувався візуальною зміною кольору реакційної суміші від синього до бурого, а згодом — до червоно-цегляного. УФ-видима спектроскопія зафіксувала характерні піки поглинання, які вказують на утворення наночастинок. Для зразків, отриманих з рідкого екстракту, спостерігалися максимуми поглинання при 750 нм і 290 нм, тоді як для сухого — при 720 нм і 275 нм. Піки в обох випадках також підтверджують наявність наночастинок оксиду міді. Сканувальна електронна мікроскопія (SEM) виявила, що наночастинки, синтезовані з рідкого екстракту, мають діаметр у межах від 82 до 106 нм, тоді як з сухого — від 115 до 125 нм. Усі зразки мали кристалічну поверхневу структуру, причому сухий екстракт давав більші частинки. За результатами енергодисперсійного рентгенівського аналізу (EDAX), було підтверджено наявність міді та кисню в усіх зразках, а також таких елементів, як С, N, O, Si, P, S, K. Вміст Cu та O був найбільшим для сухого екстракту і складав 27,25% та 47,57% відповідно [55].

ВИСНОВКИ

1. Біосинтез наночастинок міді здійснюється за допомогою водного екстракту з мікроводоростей, який містить біоактивні сполуки з відновними властивостями.

2. Для характеристики синтезованих наночастинок оксиду міді застосовують комплекс фізико-хімічних методів аналізу, зокрема УФ-видиму спектроскопію, скануючу та трансмісійну електронну мікроскопію, метод динамічного розсіювання світла, рентгенівський дифракційний аналіз, енергодисперсійну рентгенівську спектроскопію та Фур'є-інфрачервону спектроскопію.

3. Було ідентифіковано функціональні групи (гідроксильні, амінні, карбоксильні, нітрильні та вуглеводневі групи), що характерні для біоактивних молекул виділених з екстракту мікроводоростей, які беруть участь у відновленні, формуванні морфології, розмірів та стабільності наночастинок міді, пригнічуючи їх агрегацію.

4. Біосинтезовані наночастинки оксиду міді продемонстрували широкоспектрову біологічну активність, а саме виражену антибактеріальну дію, часткову протигрибкову ефективність, високу ефективність у знезараженні зразків води, низьку токсичність для досліджуваних риб і клітин ссавців, проявили значну фотокаталітичну активність (деградації барвників).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Abdel-Latif HMR, Dawood MAO, Mahmoud SF, Shukry M, Noreldin AE, Ghetas HA, Khallaf MA. Copper Oxide Nanoparticles Alter Serum Biochemical Indices, Induce Histopathological Alterations, and Modulate Transcription of Cytokines, HSP70, and Oxidative Stress Genes in *Oreochromis niloticus*. *Animals (Basel)*. 2021 Mar 1;11(3):652. doi: 10.3390/ani11030652. PMID: 33804566; PMCID: PMC8001779.
2. Abo Ras F, Özhan G, Abudayyak MF. Cyto- and genotoxicity of copper (II) oxide (CuO) nanoparticles in HeLa cells. *Istanbul J Pharm*. 2023;53(2):126-132. doi: 10.26650/IstanbulJPharm.2023.1255310.
3. Ahamed M., Alhadlaq H., Khan M., Karuppiyah P., Al-Dhabi N. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Copper Oxide Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*. 2014. Vol. 2014. Article ID 637858. DOI: 10.1155/2014/637858.
4. Alsalamah SA, Alghonaim MI, Bakri MM, et al. *Zygnema sp.* as creator of copper oxide nanoparticles and their application in controlling of microbial growth and photo-catalytic degradation of dyes. *Appl Biol Chem*. 2024;67:47. doi: 10.1186/s13765-024-00891-w.
5. Álvarez-Chimal R., Arenas-Alatorre J. Green Synthesis of Nanoparticles: A Biological Approach. In: *IntechOpen*. 2023. DOI: 10.5772/intechopen.1002203.
6. Amjad R, Mubeen B, Ali S, Imam S, Alshehri S, Ghoneim M, Alzarea S, Rasool R, Ullah I, Nadeem M, Kazmi I. Green Synthesis and Characterization of Copper Nanoparticles Using *Fortunella margarita* Leaves. *Polymers*. 2021 Dec 21;13(24):4364. doi: 10.3390/polym13244364.
7. Angelé-Martínez C, Nguyen KV, Ameer FS, Anker JN, Brumaghim JL. Reactive oxygen species generation by copper(II) oxide nanoparticles determined by DNA damage assays and EPR spectroscopy. *Nanotoxicology*. 2017 Mar;11(2):278-288. doi: 10.1080/17435390.2017.1293750. PMID: 28248593; PMCID: PMC5494152.

8. Antonio-Pérez A, Durán-Armenta LF, Pérez-Loredo MG, Torres-Huerta AL. Biosynthesis of Copper Nanoparticles with Medicinal Plants Extracts: From Extraction Methods to Applications. *Micromachines*. 2023 May 10;14(10):1882. doi: 10.3390/mi14101882.
9. Arévalo-Gallegos A, Garcia-Perez JS, Carrillo-Nieves D, Ramirez-Mendoza RA, Iqbal HM, Parra-Saldívar R. *Botryococcus braunii* as a bioreactor for the production of nanoparticles with antimicrobial potentialities. *Int J Nanomedicine*. 2018 Sep 20;13:5591-5604. doi: 10.2147/IJN.S174205. PMID: 30271149; PMCID: PMC6154714.
10. Aroob S, Carabineiro S, Taj M, Ismat D, Raheel A, Javed T, Yahya R, Alelwani W, Verpoort F, Kamwilaisak K, Alfarraj S, Sillanpää M. Green Synthesis and Photocatalytic Dye Degradation Activity of CuO Nanoparticles. *Catalysts*. 2023 Mar 3;13(3):502. doi: 10.3390/catal13030502.
11. Arya A, Gupta K, Chundawat TS, Vaya D. Biogenic Synthesis of Copper and Silver Nanoparticles Using Green Alga *Botryococcus braunii* and Its Antimicrobial Activity. *Bioinorg Chem Appl*. 2018 Oct 21;2018:7879403. doi: 10.1155/2018/7879403. PMID: 30420873; PMCID: PMC6215593.
12. Asano N, Lu J, Asahina S, Takami S. Direct Observation Techniques Using Scanning Electron Microscope for Hydrothermally Synthesized Nanocrystals and Nanoclusters. *Nanomaterials*. 2021 Apr 8;11(4):908. doi:10.3390/nano11040908.
13. Badrooh M, Shokrollahi F, Javan S, Ghasemipour T, Rezaei Mojdehi S, Farahnak H, Jahani Sayyad Noveiri M, Hedayati M, Salehzadeh A. Trigger of apoptosis in adenocarcinoma gastric cell line (AGS) by a complex of thiosemicarbazone and copper nanoparticles. *Mol Biol Rep*. 2022 Mar;49(3):2217-2226. doi: 10.1007/s11033-021-07043-z. Epub 2022 Jan 10. PMID: 35001246.
14. Baygar T, Ugur A. In vitro evaluation of antimicrobial and antibiofilm potentials of silver nanoparticles biosynthesised by *Streptomyces griseorubens*. *IET*

Nanobiotechnol. 2017 Jul 13;11(6):677–81. doi: 10.1049/iet-nbt.2016.0199. PMCID: PMC8676315.

15. Beccia MR, Biver T, Pardini A, Spinelli J, Secco F, Venturini M, Busto Vázquez N, Lopez Cornejo MP, Martin Herrera VI, Prado Gotor R. The fluorophore 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) induces DNA folding in long double-stranded DNA. *Chem Asian J.* 2012 Aug;7(8):1803-10. doi: 10.1002/asia.201200177. Epub 2012 May 21. PMID: 22615219.

16. Bhattacharya P, Swarnakar S, Ghosh S, Majumdar S, Banerjee S. Disinfection of drinking water via algae mediated green synthesized copper oxide nanoparticles and its toxicity evaluation. *Journal of Environmental Chemical Engineering.* 2018;7:102867. doi: 10.1016/j.jece.2018.102867.

17. Chakraborty N., Banerjee J., Chakraborty P., Banerjee A., Chanda S., Ray K., Acharya K., Sarkar J. Green synthesis of copper/copper oxide nanoparticles and their applications: a review. *Green Chemistry Letters and Reviews.* 2022. Vol. 15. P. 185–213. DOI: 10.1080/17518253.2022.2025916.

18. Charlena C., Sugiarti S., Ardiansyah D. Synthesis and Characterization of Copper(II) Oxide (CuO-NP) Nanoparticles using Chemical Precipitation Method. *Jurnal Kimia Mulawarman.* 2024. Vol. 21, No. 2. P. 84–90. DOI: 10.30872/jkm.v21i2.1260.

19. Chaudhary, Jyoti & Tailor, Giriraj & Kumar, Deepak & Joshi, Ajit. (2017). Synthesis and Thermal Properties of Copper Nanoparticles. *Asian Journal of Chemistry.* 29. 1492-1494. 10.14233/ajchem.2017.20534.

20. Che, Xingkai & Ding, Ruirui & Li, Yuting & Zhang, Zishan & Gao, Huiyuan & Wang, Wei. (2018). Mechanism of long-term toxicity of CuO NPs to microalgae. *Nanotoxicology.* 12. 1-17. 10.1080/17435390.2018.1498928.

21. Chen S, Li Z, Gu Z, Ban X, Hong Y, Cheng L, Li C. A new micro-agar dilution method to determine the minimum inhibitory concentration of essential oils

against microorganisms. *J Microbiol Methods*. 2023 Aug;211:106791. doi: 10.1016/j.mimet.2023.106791. Epub 2023 Jul 26. PMID: 37506853.

22. Chetan Pandit, Arpita Roy, Suresh Ghotekar, Ameer Khusro, Mohammad Nazmul Islam, Talha Bin Emran, Siok Ee Lam, Mayeen Uddin Khandaker, David Andrew Bradley, Biological agents for synthesis of nanoparticles and their applications, *Journal of King Saud University - Science*, Volume 34, Issue 3, 2022, 101869, ISSN 1018-3647, <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101869>.

23. Che X, Ding R, Zhang Q, Li Y, Sun Q, Li Y, Zhang Z, Wang W, Gao H. The severe toxicity of CuO nanoparticles to the photosynthesis of the prokaryotic algae *Arthrospira* sp. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2021 Oct;28(38):54105-54116. doi: 10.1007/s11356-021-14341-3. Epub 2021 May 27. PMID: 34043167.

24. Chung E, Ren G, Johnston I, Matharu RK, Ciric L, Walecka A, Cheong YK. Applied Methods to Assess the Antimicrobial Activity of Metallic-Based Nanoparticles. *Bioengineering (Basel)*. 2023 Oct 28;10(11):1259. doi: 10.3390/bioengineering10111259. PMID: 38002383; PMCID: PMC10669044.

25. Crisan M.C., Mocan T., Mocan L. Copper nanoparticles: Synthesis and characterization, physiology, toxicity and antimicrobial applications. *Applied Sciences*. 2021. Vol. 12, No. 1. P. 141. DOI: 10.3390/app12010141.

26. Dang T.M.D., Le T.T.T., Fribourg-Blanc E., Dang M.C. Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2011. Vol. 2, No. 1. Article ID 015009. DOI: 10.1088/2043-6262/2/1/015009.

27. Din MI, Arshad F, Hussain Z, et al. Green Adeptness in the Synthesis and Stabilization of Copper Nanoparticles: Catalytic, Antibacterial, Cytotoxicity, and Antioxidant Activities. *Nanoscale Res Lett*. 2017;12:638. doi:10.1186/s11671-017-2399-8.

28. Djamila B, Eddine LS, Abderrhmane B, et al. In vitro antioxidant activities of copper mixed oxide (CuO/Cu₂O) nanoparticles produced from the leaves of Phoenix

dactylifera L. *Biomass Conv Bioref.* 2024;14:6567–6580. doi:10.1007/s13399-022-02743-3.

29. Dodoo-Arhin D, Mbu EE, Ntwampe SK, Malenga EN, Fosso-Kankeu E, Agyei-Tuffour B, Agbe H. Synthesis of nanostructured cupric oxide for visible light assisted degradation of organic wastewater pollutants. *Cogent Eng.* 2021;8(1). doi:10.1080/23311916.2021.1920563.

30. Ealias A, Saravanakumar M P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng.* 2017;263:032019. doi: 10.1088/1757-899X/263/3/032019.

31. Fathima JB, Pugazhendhi A, Oves M, Venis R. Synthesis of eco-friendly copper nanoparticles for augmentation of catalytic degradation of organic dyes. *J Mol Liq.* 2018;260:1–8. doi: 10.1016/j.molliq.2018.03.033.

32. Franco D, Calabrese G, Guglielmino SPP, Conoci S. Metal-Based Nanoparticles: Antibacterial Mechanisms and Biomedical Application. *Microorganisms.* 2022 Sep 3;10(9):1778. doi: 10.3390/microorganisms10091778. PMID: 36144380; PMCID: PMC9503339.

33. Gaur M, Misra C, Yadav AB, Swaroop S, Maolmhuidh FÓ, Bechelany M, Barhoum A. Biomedical Applications of Carbon Nanomaterials: Fullerenes, Quantum Dots, Nanotubes, Nanofibers, and Graphene. *Materials (Basel).* 2021 Oct 11;14(20):5978. doi: 10.3390/ma14205978. PMID: 34683568; PMCID: PMC8538389.

34. Gürsoy N, Yılmaz Öztürk B, Dağ I. Synthesis of intracellular and extracellular gold nanoparticles with a green machine and its antifungal activity. *Turkish Journal of Biology.* 2021;45(3):196-213. doi: 10.3906/biy-2010-64.

35. Hajizadeh Y, Harzandi N, Babapour E, Yazdanian M, Ranjbar R. Green Synthesize and Characterization of Copper Nanoparticles Using Iranian Propolis Extracts. *Advances in Materials Science and Engineering.* 2022;2022:1-9. doi: 10.1155/2022/8100440.

36. Ibrahim Khan, Khalid Saeed, Idrees Khan. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. Volume 12, Issue 7. 2019. Pages 908-931. ISSN 1878-5352. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>.
37. Jawad AH, Alkarkhi FM, Abdul Mubarak NS. Photocatalytic decolorization of methylene blue by an immobilized TiO₂ film under visible light irradiation: optimization using response surface methodology (RSM). *Desalination and Water Treatment*. 2015;56(1):161–172. doi: 10.1080/19443994.2014.934736.
38. Jenkins MB, Endale DM, Fisher DS, Gay PA. Most probable number methodology for quantifying dilute concentrations and fluxes of *Escherichia coli* O157:H7 in surface waters. *J Appl Microbiol*. 2009 Feb;106(2):572-9. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04028.x. PMID: 19200323.
39. Jiang X, Foldbjerg R, Miclaus T, Wang L, Singh R, Hayashi Y, Sutherland D, Chen C, Autrup H, Beer C. Multi-platform genotoxicity analysis of silver nanoparticles in the model cell line CHO-K1. *Toxicol Lett*. 2013 Sep 12;222(1):55-63. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.07.011. Epub 2013 Jul 18. PMID: 23872614.
40. Joudeh, N., Linke, D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *J Nanobiotechnol* 20, 262 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>
41. Kaasalainen M, Aseyev V, von Haartman E, Karaman DŞ, Mäkilä E, Tenhu H, Rosenholm J, Salonen J. Size, Stability, and Porosity of Mesoporous Nanoparticles Characterized with Light Scattering. *Nanoscale Res Lett*. 2017 Dec;12(1):74. doi: 10.1186/s11671-017-1853-y. Epub 2017 Jan 25. PMID: 28124301; PMCID: PMC5267583.
42. Kalaycıoğlu Z, Özüğür Uysal B, Pekcan Ö, Erim FB. Efficient Photocatalytic Degradation of Methylene Blue Dye from Aqueous Solution with Cerium Oxide Nanoparticles and Graphene Oxide-Doped Polyacrylamide. *ACS Omega*. 2023 Mar 29;8(14):13004-13015. doi: 10.1021/acsomega.3c00198. PMID: 37065069; PMCID: PMC10099124.

43. Karunakaran G, Sudha KG, Ali S, Cho EB. Biosynthesis of Nanoparticles from Various Biological Sources and Its Biomedical Applications. *Molecules*. 2023 Jun 2;28(11):4527. doi: 10.3390/molecules28114527. PMID: 37299004; PMCID: PMC10254633.
44. Kashyap J, Ashraf S, Riaz U. Highly Efficient Photocatalytic Degradation of Amido Black 10B Dye Using Polycarbazole-Decorated TiO₂ Nanohybrids. *ACS Omega*. 2017;2(12):8354-8365. doi: 10.1021/acsomega.7b01154.
45. Keabadile OP, Aremu AO, Elugoke SE, Fayemi OE. Green and Traditional Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles-Comparative Study. *Nanomaterials (Basel)*. 2020 Dec 14;10(12):2502. doi: 10.3390/nano10122502. PMID: 33327366; PMCID: PMC7764311.
46. Khandelwal M, Choudhary S, Harish, Kumawat A, Misra KP, Vyas Y, Singh B, Rathore DS, Soni K, Bagaria A, Khangarot RK. An Eco-Friendly Synthesis Approach for Enhanced Photocatalytic and Antibacterial Properties of Copper Oxide Nanoparticles Using *Coelastrella terrestris* Algal Extract. *Int J Nanomedicine*. 2024 May 9;19:4137-4162. doi: 10.2147/IJN.S452889. PMID: 38756417; PMCID: PMC11096669.
47. Leite M, Quinta-Costa M, Leite PS, Guimarães JE. Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death--study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60. *Anal Cell Pathol*. 1999;19(3-4):139-51. doi: 10.1155/1999/176515. PMID: 10866276; PMCID: PMC4618583.
48. León A, Plasencia J, Duran A, Albores A. Comparison of the In Vitro Antifungal and Anti-fumonigenic Activities of Copper and Silver Nanoparticles Against *Fusarium verticillioides*. *J Cluster Sci*. 2020;31. doi: 10.1007/s10876-019-01638-0.
49. Li J, Liu Y, Liu Y, Wang Q, Gao X, Gong Q. Effects of temperature and salinity on the growth and biochemical composition of the brown alga *Sargassum*

fusiforme (Fucales, Phaeophyceae). *J Appl Phycol*. 2019;31. doi: 10.1007/s10811-019-01795-9.

50. Meroni G, Soares Filipe JF, Martino PA. In Vitro Antibacterial Activity of Biological-Derived Silver Nanoparticles: Preliminary Data. *Vet Sci*. 2020 Jan 23;7(1):12. doi: 10.3390/vetsci7010012. PMID: 31979282; PMCID: PMC7157719.

51. Miu BA, Dinischiotu A. New Green Approaches in Nanoparticles Synthesis: An Overview. *Molecules*. 2022 Oct 1;27(19):6472. doi: 10.3390/molecules27196472. PMID: 36235008; PMCID: PMC9573382.

52. Mobarak M, Sikder MD, Muntaha K, Islam S, Rabbi SMF, Chowdhury F. Plant extract-mediated green synthesized CuO nanoparticles for environmental and microbial remediation: A review covering basic understandings to mechanistic study. *Nanoscale Advances*. 2025;7. doi: 10.1039/D5NA00035A.

53. Modan M, Schiopu AG. Advantages and disadvantages of chemical methods in the elaboration of nanomaterials. 2020;43. doi: 10.35219/mms.2020.1.08.

54. Mott D, Galkowski J, Wang L, Luo J, Zhong CJ. Synthesis of size-controlled and shaped copper nanoparticles. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*. 2007;23:5740–5745. doi: 10.1021/la0635092.

55. Murthy S. Biogenic synthesis of copper nanoparticles from blue-green alga *Arthrospira maxima* and its characterization. 2022.

56. Nasiri S, Rabiei M, Palevicius A, Janušas G, Vilkauskas A, Monshi A. Modified Scherrer equation to calculate crystal size by XRD with high accuracy, examples Fe_2O_3 , TiO_2 and V_2O_5 . *Nano Trends*. 2023;3:100015. doi: 10.1016/j.nwnano.2023.100015.

57. Pantidos N, Horsfall L. Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*. 2014;5. doi: 10.4172/2157-7439.1000233.

58. Pasieczna-Patkowska S, Cichy M, Flieger J. Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in characterization of green synthesized nanoparticles. *Molecules*. 2025;30:684. doi: 10.3390/molecules30030684.
59. Perez M, Cadenas-Pliego G, Perez O, Comparán V, Cabello-Alvarado C, Saucedo E. Green Synthesis of Copper Nanoparticles Using Cotton. *Polymers (Basel)*. 2021;13(12):1906. doi: 10.3390/polym13121906.
60. Premina S, Sundaralingam R, Andrew SN. Biosynthesis, characterization and antimicrobial potential studies of copper oxide nanoparticles produced from *Chlorella vulgaris*. *Paripex Indian Journal of Research*. 2020;3 pages. doi: 10.36106/PARIPEX.
61. Radhakrishnan AA, Beena BB. Structural and optical absorption analysis of CuO nanoparticles. *Indian Journal of Advances in Chemical Science*. 2014;2(2):158–161.
62. Rehana D, Mahendiran D, Kumar RS, Rahiman AK. Evaluation of antioxidant and anticancer activity of copper oxide nanoparticles synthesized using medicinally important plant extracts. *Biomed Pharmacother*. 2017 May;89:1067-1077. doi: 10.1016/j.biopha.2017.02.101. Epub 2017 Mar 11. PMID: 28292015.
63. Ruchi Roy, Sandeep Kumar, Anurag Tripathi, Mukul Das, Premendra D. Dwivedi. Interactive threats of nanoparticles to the biological system. *Immunology Letters*. Volume 158, Issues 1–2. 2014. Pages 79-87. ISSN 0165-2478. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.11.019>.
64. Saccà A. A Simple yet Accurate Method for the Estimation of the Biovolume of Planktonic Microorganisms. *PLoS One*. 2016 May 19;11(5):e0151955. doi: 10.1371/journal.pone.0151955. PMID: 27195667; PMCID: PMC4873252.
65. Salas-Herrera G, González-Morales S, Benavides-Mendoza A, et al. Impact of microalgae culture conditions over the capacity of copper nanoparticle biosynthesis. *J Appl Phycol*. 2019;31:2437–2447. doi: 10.1007/s10811-019-1747-8.

66. Samuel M, Ravikumar M, John A, Ethiraj S, Patel H, Chander P, Soundarya J, Vuppala S, Ramachandran B, Chandrasekar N. A review on green synthesis of nanoparticles and their diverse biomedical and environmental applications. *Catalysts*. 2022;12:459. doi: 10.3390/catal12050459.
67. Scimeca M, Bischetti S, Lamsira HK, Bonfiglio R, Bonanno E. Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *Eur J Histochem*. 2018 Mar 15;62(1):2841. doi: 10.4081/ejh.2018.2841. PMID: 29569878; PMCID: PMC5907194.
68. Shah M, Fawcett D, Sharma S, Tripathy SK, Poinern GEJ. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities. *Materials (Basel)*. 2015 Oct 29;8(11):7278-7308. doi: 10.3390/ma8115377. PMID: 28793638; PMCID: PMC5458933.
69. Sharma A, Kumawat A, Raput B, Khangarot R, Valiyaneerilakkal U, Chattopadhyay S, Misra KP. Effect of heavy Al doping on microstructural and morphological behavior of ZnO thin film deposited by sol-gel spin coating. *AIP Conference Proceedings*. 2021;2352:040001. doi: 10.1063/5.0052386.
70. Shazia Nouren, Ismat Bibi, Abida Kausar, Misbah Sultan, Haq Nawaz Bhatti, Yusra Safa, Sana Sadaf, Norah Alwadai, Munawar Iqbal. Green synthesis of CuO nanoparticles using Jasmin sambac extract: Conditions optimization and photocatalytic degradation of Methylene Blue dye. *Journal of King Saud University - Science*. Volume 36, Issue 3. 2024. 103089. ISSN 1018-3647. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2024.103089>.
71. Singh P, Kim YJ, Zhang D, Yang DC. Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends Biotechnol*. 2016 Jul;34(7):588-599. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.02.006. Epub 2016 Mar 2. PMID: 26944794.
72. Sun J, Aoki K, Wang W, Guo A, Misumi J. Sodium nitrite-induced cytotoxicity in cultured human gastric epithelial cells. *Toxicol In Vitro*. 2006

Oct;20(7):1133-8. doi: 10.1016/j.tiv.2006.02.005. Epub 2006 Feb 28. PMID: 16581224.

73. Thiruvengadam M, Chung IM, Gomathi T, Ansari MA, Gopiesh Khanna V, Babu V, Rajakumar G. Synthesis, characterization and pharmacological potential of green synthesized copper nanoparticles. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2019 Nov;42(11):1769-1777. doi: 10.1007/s00449-019-02173-y. Epub 2019 Aug 1. PMID: 31372759.

74. Valan, S. L., Cruz, A. E. D., Jacob, P. J., & Djearamane, S. Sustainable Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using *Aquilaria Malaccensis* (Agarwood) Leaf Extract as Reducing Agent. *International Journal of Technology*, 13(5), 1115. <https://doi.org/10.14716/IJTECH.V13I5.5845>.

75. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008;3(2):163-75. doi: 10.1038/nprot.2007.521. PMID: 18274517.

76. Yavaş C, Gülsoy N. Research Article: Comparative genotoxic and histopathological effects of copper nanoparticles and copper chloride in goldfish (*Carassius auratus*). *IJFS* 2024; 23 (3) :485-503 URL: <http://jifro.ir/article-1-5580-en.html>

77. Zhang C, Chen X, Tan L, et al. Combined toxicities of copper nanoparticles with carbon nanotubes on marine microalgae *Skeletonema costatum*. *Environ Sci Pollut Res*. 2018;25:13127–13133. doi: 10.1007/s11356-018-1580-7.

78. Екологічні біотехнології “зеленого” синтезу наночастинок металів, оксидів металів, металоїдів та їх використання: наукова монографія / С.І. Цехмістренко, В.С. Бітюцький, О.С. Цехмістренко, О.А. Демченко, Н.О. Тимошок, О.М. Мельниченко; за редакцією С.І. Цехмістренко. Біла Церква, 2022. 270 с.

79. Цехмістренко, О. С. Біотехнологія одержання та використання пробіотиків з наночастинками селену та діоксиду церію у птахівництві (Doctoral dissertation, Біла Церква, 2021, 36).