



МИННО-ГЕОЛОЖКИ УНИВЕРСИТЕТ
“СВ. ИВАН РИЛСКИ”
ГЕОЛОГОПРОУЧВАТЕЛЕН ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА “ИНЖЕНЕРНА ГЕОЕКОЛОГИЯ”

доц. д-р Александър Руменов Луканов

**ЕКОЛОГИЧНО СЪВМЕСТИМИ НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ ЗА
ОПАЗВАНЕ НА ОКОЛНАТА СРЕДА**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за придобиване на научна степен
„Доктор на науките”

Професионално направление 4.4. Науки за земята

Научна специалност: „Системи и устройства за опазване на околната
среда”

София
2016

“Там долу, има много свободно пространство –
това е покана в нов свят.
Няма теоретичен предел, а само практическа трудност,
защото сме твърде големи.”
Ричард Файнман, нобелов лауреат по физика – 1965

Посвещавам на моята дъщеря Юлияна, като
се надявам да оцени този труд, когато порастне.

Дисертационният труд “Екологично-съвместими нанобиотехнологии за опазване на околната среда” се състои от въведение, литературен обзор, цел и задачи, инструменти и експериментални установки, четири глави със съответните изводи и приложения, обобщени изводи и заключения, научни приноси и библиография. Общият му обем е 415 страници в 8 глави.

Дисертационния труд е обезпечен с 57 публикувани до момента оригинални авторски публикации в рецензирани чуждестранни и български научни списания, 3 учебника за студенти бакалаври и магистри и 2 монографии публикувани от престижното американско издателство WILEY. Общия брой на цитатите, регистрирани в интернет надхвърля 150, а общият импакт фактор на публикациите е 41.515 ($h_{\text{index}} = 8$).

Изследванията по дисертационния труд са извършени в МГУ “Св. Иван Рилски”, Лаборатория по “Инженерна нанобиотехнология” към катедра “Инженерна геоекология”, Университета Сайтама – Япония, Института по материали и химия на околната среда към Унгарската Академия на науките – Унгария и Калифорнийския университет в Бъркли – САЩ.

Авторът на дисертационния труд д-р Александър Руменов Луканов е доцент в катедра “Инженерна геоекология”, Геологопроучвателен факултет, Минно-геоложки университет “Св. Иван Рилски” и доцент във факултета по инженерни и природни науки в Университета Сайтама – Япония.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен катедрен съвет на катедра “Инженерна геоекология”, Минно-геоложки университет “Св. Иван Рилски”. Публичната защита ще се състои на открито заседание пред научно жури, назначено от Ректора на МГУ “Св. Иван Рилски” на 7.04.2017 г. от 13:30 часа в зала “Геотехмин”, Миннотехнологичен факултет, МГУ “Св. Иван Рилски”, гр. София на заседание на научното жури в състав:

1. Академик проф. Борис Гоцев Тенчов – МУ - София
2. Проф. ДФЗН Иван Йотов Лалов – СУ “Св. Климент Охридски”
3. Проф. ДХН Галин Петров Петров – СУ “Св. Климент Охридски”
4. Проф. ДФЗН Стефан Трифонов Иванов – СУ “Св. Климент Охридски”
5. Проф. д-р Недялко Веселинов Софрониев – МГУ “Св. Иван Рилски”
6. Проф. д-р Христо Стефанов Гагов – СУ “Св. Климент Охридски”
7. Доц. д-р Анатолий Цанков Ангелов – МГУ “Св. Иван Рилски”

Резервни членове:

1. Проф. ДХН Йовка Димитрова Драгиева (Българска академия на науките)
2. Доц. д-р Светлана Георгиева Браткова – МГУ “Св. Иван Рилски”

Материалите във връзка с предстоящата защита са на разположение на заинтересованите лица в сектор “Следдипломна квалификация”.

Съдържание на автореферата

	Стр.
Анотация	6
Кратка обща характеристика и актуалност на дисертационния труд...	7
Структура и съдържание на дисертационния труд	8
Обект и предмет на дисертационния труд	9
Цел и задачи на дисертационния труд	10

ПЪРВА ЧАСТ.

ИНСТРУМЕНТИ И ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ УСТАНОВКИ	12
1.1 Въведение	12
1.2 Микроскопски инструменти	13
1.3 Лабораторни реактори	14

ВТОРА ЧАСТ.

НАНОБИОСЕНЗОРИ ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ, ПРОСЛЕДЯВАНЕ И АНАЛИЗИРАНЕ НА ЦЕЛЕВИ МОЛЕКУЛИ	14
2.1. Въведение	14
2.2. Наноматериали с биосензорни свойства	17
2.3. Нанобиосензорни репортери за локализиране и идентифициране на мембранны протеини	18
2.4. Нанобиосензорни репортери за локализиране и идентифициране на нуклеинови киселини	20
2.5. Стимулиране на растежа на детектираните микроорганизми върху трансдюсер, изграден от наноструктуриран оксид.....	24

ТРЕТА ЧАСТ.

НАНОБИОСЕНЗОРИ ЗА МОНИТОРИНГ НА ЗАМЪРСИТЕЛИ В ОКОЛНАТА СРЕДА	27
3.1. Въведение	27
3.2. Ензимен нанобиосензор	27
3.3. Златни наночастици за колориметрична сензорна детекция на замърсители.....	29

ЧЕТВЪРТА ЧАСТ. НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ ЗА ПРЕЧИСТВАНЕ НА ЗАМЪРСЕНИ ПРИРОДНИ ОБЕКТИ

4.1. Въведение.....	34
4.2. Синтез на тънки слоеве от наноструктурирани оксиди, чрез зол-гел и спрей пиролиза. Магнитни прахове.....	35

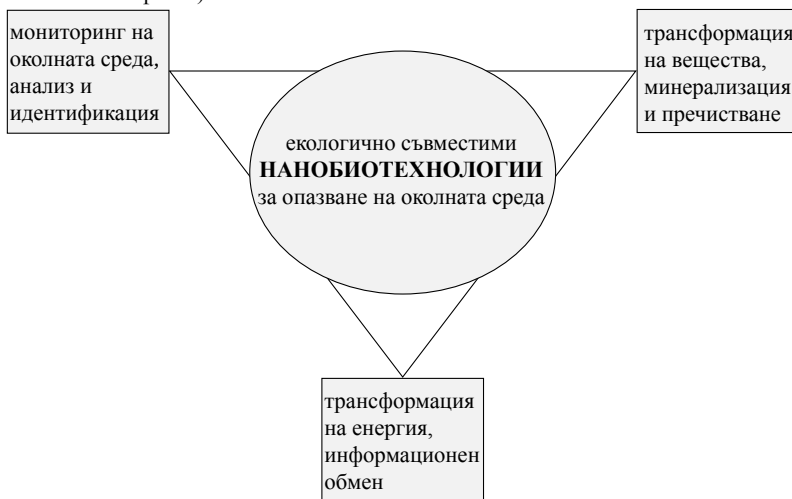
4.3. Тестване на фотокаталитичната активност на синтезирани образци спрямо азо багрила в отпадни води	36
4.4. Лабораторни нанобиореактори за комбинирано фотокаталитично и биологично почистване на отпадни води	40

ПЕТА ЧАСТ.

ХИБРИДНИ НАНОБИОМАТЕРИАЛИ, КАТО ЕНЕРГИЙНО ПРЕОБРАЗОВАТЕЛНИ СИСТЕМИ	42
5.1. Въведение	42
5.2. Въглеродни квантови точки	45
5.3. Екологично съвместими нанохибридни системи за преобразуване на енергията.....	49
5.4. Фотостабилност на вододиспергируеми квантови точки: покриване с лиганди и кислород.....	51
5.5. Високо разтворими фталоцианати и фталонитрили, като фоточувствителни донорни агенти.....	52
5.6. Метални нанокатализатори за горивни клетки.....	53
Обобщени изводи.....	54
Заклучение.....	59
Научно и научно-приложни приноси.....	62
Литература, посочена в автореферата на дисертационния труд.....	66
Приложимост на резултатите в учебния процес.....	67
Научни публикации по дисертационния труд.....	67
Научно-изследователски проекти по дисертационния труд.....	73

Анотация

Дисертационния труд е посветен на разработването на екологично съвместими нанобиотехнологии и внедряването им при решаване на конкретни проблеми, свързани с опазването на околната среда. Свойствата на наночастиците могат да се използват в tandem със свойствата на специфични биологични молекули, клетъчни органели, включително и някои микроорганизми. Целта на настоящия дисертационен труд е да се развие и открие ново научно направление, което обхваща потенциала от приложения на нанобиотехнологиите при опазването на околната среда. Дефинирана по този начин, задачата е развита от три различни перспективи: нанобиотехнологии за (а) мониторинг на околната среда, анализ и идентификация на различни видове аналити, (б) превръщане на вещества, минерализация и пречистване на ксенобиотици и (в) трансформация на енергия и информационен обмен (както е показано на фиг. I).



Фигура I. Развитие на екологични съвместими нанобиотехнологии за опазване на околната среда в три основни направления: (i) мониторинг на околна среда, анализ и иденстификация на аналити; (ii) трансформация на вещества, минерализация и пречистване; и (iii) трансформация на енергия и информационен обмен;

Идентификацията и количествения анализ на различни видове аналити е разработена на базата на чувствителни нанобиосензори, включващи хибридни наноматериали, полупроводникови квантови точки, метални наночастици и др., конюгирани към биоматериал (белтъци, антитела,

нуклеинови киселини). Представени са оригинални методики за манипулация на биомолекули на нано и супра-молекулно ниво с цел идентификация, анализиране и по-нататъшно вътреклетъчно проследяване.

За трансформацията и минерализирането на ксенобиотици са използвани екологично съвместими наноструктурирани полупроводникови оксиди, играещи ролята на катализатор за тяхното окисление и деградация. За пълното минерализиране и пречистване на органични ксенобиотици може да се използват разработените наноструктурирани катализатори в синергизъм с ензимни системи от микробиологични популации в активни утайки. Ефективността на методите е доказана с токсикологични тестове, чрез подходящи биоиндикатори по утвърдени международни стандарти.

Преобразуването на енергия и информацията обмен се осъществява от хибридни нанобиоматериали, играещи ролята на енергийно преобразователни системи (или наномашини). Те са базирани главно на нетоксични въглеродни наноточки, конюгирани с фоточувствителни молекули и/или полупроводникови квантови точки (образуване на диадни структури). Това им дава възможност да се развие ново поколение еко фотокатализатори (трансформиращи видима и инфрачервена а не UV светлина) за окисление на ксенобиотици, фотоволтаични клетки, нанобиосензорни технологии и т.н.

Кратка обща характеристика и актуалност на дисертационния труд

Напредъка в развитието на високите технологии през последните години създаде нова конвергенция между различните клонове на нанонауката и традиционните природни и технически науки. Нанотехнологията е смятана за следващата голяма революция в областта на науките за живота (предимно биологията и медицината). До момента са синтезирани стотици хибридни наноматериали с най-различни приложения, като подходът е насочен към дизайн на нанобиомашини (наричани още нанороботи), които са проектирани да изпълняват конкретни задачи на нано и супрамолекулно ниво. Благодарение на това се наблюдава бурно развитие при разработването на високо-чувствителни биосензорни технологии, които са в състояние да откриват следи, включително и единични молекули от анализираното вещество в пробата.

Основната движеща сила за развитието и усъвършенстването на нанобиотехнологичния инструментариум е породена от потенциала му за въздействие и ранна диагностика на множество медицински проблеми на субклетъчно ниво. Главния мотив в дисертационния труд е продиктуван от възможността за по-нататъшно разработване на този нанобиотехнологичен инструментариум и внедряването му в екологична насока с цел прилагане при решаването на конкретни задачи, свързани с опазването на околната среда. По

този начин се оформя **ново научно направление** – *екологично съвместими нанобиотехнологии за опазване на околната среда*. Такова направление би било особено полезно и актуално, с оглед на съвременните тенденции за развитие на високо ефективните инженерни еко-технологии които включват, като неделим елемент т. нар. принцип на превенция. Съгласно принципа на превенция използваните технологии или продукти трябва да се експлоатират по начин по който а) да не замърсяват околната среда, б) да опазват природните й дадености, и в) да не оказват влияние на биологичното разнообразие за дадения биогеографски район.

Структура и съдържание на дисертационния труд

Дисертационният труд е разработен в пет части (глави), всяка от които предлага нанобиотехнологични решения на научно-приложни проблеми, свързани с различни аспекти на мониторинга и еко-технологиите за опазване на околната среда.

В **първата част** са разгледани особеностите на микроскопския инструментариум и експерименталните установки, използвани в разработването на настоящия научен труд.

Във **втората и третата част** са разработени **нано-биосензори** за идентифициране, проследяване и изучаване на целеви биомолекули и нанобиосензори за мониторинг на ксенобиотици в околната среда. Представени са хибридни наноматериали, включващи полупроводникови квантови точки, метални наночастици и др., конюгирани към биоматериал (ензими, антитела, нуклеинови киселини). Наночастиците са трансдюзери за детекция на целевия аналит, благодарение на протичащи имунореакции за специфично биологично разпознаване. Поради малкият им размер наноматериалите се използват с успех и като биосензорни репортери за анализиране и проследяване на отделни целеви молекули, както в единични клетки, така и в отделни тъкани. По този начин те намират приложение освен в традиционните *in situ* анализи на ксенобиотици в околната среда, също и за *in vivo* изобразяване и проследяване на отделни аналити (в т.ч. и акумулирани замърсители) в едноклетъчни или в тъканите на многоклетъчни организми. Изучаването на влиянието на акумулираните замърсители върху биохимичните и физиологичните процеси в организмите посредством нанобиосензорни репортери е от особена важност за **екотоксикологията**. Разработени са и оригинални методики за манипулация на нуклеинови киселини на нано ниво с цел тяхната секвенция, молекулен анализ и вътреклетъчно проследяване.

В **четвъртата част** са представени наноструктурирани полупроводникови оксиди, като катализатори за фотохимично окисление и разрушаване на различни видове ксенобиотици. Изследванията са фокусирани

върху наноматериали, изградени от метални оксиди, които не представляват сериозен замърсител на околната среда (оксиди на цинка, желязото, титана и др.). Магнитните наночастици, съставени от оксиди на желязото могат да се използват за редукция и разграждане на химически инертни замърсители в природата, като азо багрила (използвани в текстилната и хартиената промишленост), халогено производни на наситени, ненаситени и ароматни въглеводороди и др. Освен това магнитните наночастици могат да редуцират целеви метали (в т.ч. уран, арсен и някои благородни метали) в концентрати или технологични разтвори. Предложени са технологични схеми на каталитични и магнитни реактори за пречистване и извличане на ценните компоненти под действието на външно магнитно поле. Напредъка в тази насока е от интерес за *химия на околната среда*. За пълното минерализиране и пречистване на органични замърсители може да се използват разработените наноструктурирани катализатори в синергизъм с ензимни системи от микробиологични популации в природни активни утайки. Ефективността на метода е доказана с токсикологични тестове, чрез подходящи *биоиндикатори* по утвърдени международни стандарти. Предложени са бъдещи перспективи за трансформиране на енергията от химичните връзки на органиката в електрична енергия, чрез използване на електроактивен биофилм в микробна горивна камера. В дисертацията са представени някои предварителни, но обещаващи резултати в тази насока.

Петата част е посветена на хибридни нанобиоматериали, като енергийно преобразователни системи. Това са изцяло нови материали, за които е известно, че не са токсични, лесно се разграждат и усвояват в околната среда (т.е. те са екологично целесъобразни). Синтезирани са нов вид органични въглерод-съдържащи квантови точки, които проявяват фотолуминисцентна ъпконверсия и притежават каталитични свойства, благодарение на диадната структура с квантови точки или метален катион - комплексообразувател с фоточувствителни лиганди, конюгирани към повърхността на наночастицата. Тези наночастици проникват в еукариотни клетки, чрез ендоцитоза и са нов тип биосензорни репортери. При възбуждане с инфрачервена светлина те инициират фотореакции за превръщане на триплетния кислород в синглетен. Това свойство намира приложение във фотодинамичната лазерна терапия и въз основа на него в дисертационния труд се разработват ново поколение незамърсяващи околната среда еко-катализатори за третиране на замърсители и за генериране на възобновяема зелена енергия във фотоволтаици, чрез използване на видимия и инфрачервения спектър на светлината. Разгледана е и възможността за използване на въглеродни наночастици, дотирани с азот като катализатори за редукция на кислород (т.е. заместители на благородни метали).

Обект и предмет на дисертационния труд

Фокуса в настоящия дисертационен труд е да се разгърне потенциала на нанобиотехнологията, като интердисциплинарна наука в насока развитие на

екологично съвместими хибридни наноматериали, нанобиотехнологични подходи, методики и инструментариум за решаването на конкретни практически задачи, отнасящи се към мониторинга и опазването на околната среда. Предимството на екологично съвместимите наноматериали е, че са изградени от елементи и съединения, които са често срещани в природата (желязо, цинк, титан, сяр, кислород, графит, силиции, органични съединения базирани на въглерода и др.), лесно разградими са и не представляват сериозна заплаха за замърсяването на околната среда. Това е и необходимо условие за по-нататъшното им внедряване в дизайна на различни еко-технологии с цел повишаване на тяхната ефективност и в същото време да отговарят на изискванията за превенция спрямо замърсяване на околната среда. Въпреки че в дисертацията са предложени някои инженерни схеми на лабораторни реактори за пречистване, преработка и добив на електрическа енергия, потенциалът от практическо внедряване на разработените нанобиотехнологични иновации в еко-технологиите е доста обширен и е извън рамките на настоящия дисертационен труд.

Цел и задачи на дисертационния труд

Нанобиотехнологичния инструментариум може да бъде разработен и насочен за решаването на конкретни задачи, свързани с екологията и опазването на околната среда. Това дава основание на автора да претендира за обособяването на ново научно направление – екологично съвместими нанобиотехнологии за опазване на околната среда”. То е особено необходимо за развитието на еко-технологиите, които включват, като неделим елемент т. нар. принцип на превенция. Базирайки се на гореизложените мотиви, дефинираната цел на настоящия дисертационен труд е *да се разработят хибридни наноматериали и наносистеми от химични елементи и съединения, които не представляват заплаха за замърсяване на природата (т.е. те са екологично съвместими), и в синергизъм с биотехнологични инструменти, методики и подходи да участват в решаването на практически задачи, отнасящи се за детекцията, мониторинга, трансформацията и пречистването на ксенобиотици в околната среда.*

За постигане на заложената цел следва да бъдат изпълнени следните задачи:

1. *Синтезиране на екологично съвместими наноматериали.* Те трябва да са изградени от елементи и съединения, които са често срещани в природата (например природни съединения). По този начин след експлоатация да могат бързо да се разграждат от микроорганизмите и да не представляват сериозна заплаха за замърсяването на околната среда. Наноматериалите са изградени предимно от органични съединения, базирани на въглерода, водорода,

кислорода, азота и сярата. Обект на изследване са и полупроводникови материали, съдържащи желязо, цинк, титан и др. В някои редки случаи ефективността и свойствата им се сравняват с тези на кадмия (Cd намира ограничено приложение в дисертационния труд в състава на нанобиосензорните репортери за мониторинг на аналити и биомолекули в клетки и тъкани).

2. *Инкорпориране на наноматериалите в хибридни наносистеми.* Отделните наноматериалите изпълняват единични функции, като абсорбция и емисия на електромагнитни лъчения, излъчване на магнитно поле и екситони, генериране на електрони, радикали и др. Когато са физически свързани (хибридни нанокompозити) те работят в тандем, като наномашини (или нанороботи). Наномашините проявяват нови уникални свойства – фотокатализа, сензорна детекция, превръщане на светлинната енергия в електрична и т.н. В дисертационния труд единични наночастици се свързват по между си (като части), образувайки т. нар. хибридни наносистеми (наномашини). По този начин те придобиват уникални свойства, които са обект на по-нататъшна експлоатация.

3. *Постигане на синергизъм с биотехнологични инструменти, методики и подходи.* Наноматериалите и нанокompозитите се свързват химически (конюгират) към биологични молекули (специфични белтъци, нуклеинови киселини, фоточувствителни молекули и др.). Така към тяхните уникални свойства се придават също и високо селективни биологични способности, които им отварят нови практически приложения при имунодетекцията на биомолекули и ксенобиотици, повишена ефективност при усвояването и трансформацията на спектъра на светлината, фотохимичната деградация и др. По този начин се очертават: (i) облика и принципа на работа на представените нанобиотехнологии, и (ii) обекта и полето им на действие в настоящия дисертационен труд.

4. *Демонстриране на приложението при решаване на практически задачи, свързани с опазването на околната среда.* Приложението на разработените нанобиотехнологии за опазване на околната среда е демонстрирано в три насоки: (I) мониторинг на околната среда, анализ и идентификация на различни видове аналити, (II) превръщане на вещества, минерализация и пречистване на ксенобиотици и (III) трансформация на енергия и информационен обмен.

→ *Мониторинг на околната среда.* Да се развие и представи ново поколение нанобиосензори, които могат да идентифицират и измерят количествени промени в рН, концентрация на метали и пестициди, детекция на разнообразни биомолекули (токсини, специфични белтъци, липиди, нуклеинови киселини и др.). Развити са нанобиосензорни репортери за проследяване на анализираните

вещества (в т. ч. и на единични биологични молекули) в разнообразни биологични образци (бактерии, клетъчни култури и тъкани).

→ *Минерализация и пречистване на ксенобиотици.* Да се разработят полупроводникови наноструктурирани оксиди за фотоокисление и минерализиране на органични ксенобиотици. Повишаването на ефективността им е постигнато чрез: (i) дотиране с други химични елементи и (ii) конюгиране с въглеродни квантови точки. По този начин абсорбцията на фотокатализаторите е изместена от близката ултравиолетова област във видимата част на светлината. Това ги прави особено практични във фотокаталитичните реактори. Фотокатализата е приложена в синхрон с бактериално разграждане за пълно минерализиране на ксенобиотика. Неорганичните ксенобиотици могат да бъдат извлечени от водни разтвори, чрез редукция с магнитни наночастици.

→ *Трансформация на енергия.* Предложено е разработването на флуоресцентни въглеродни наночастици, които в синергизъм с други наноматериали могат да имитират природни процеси за превръщане на енергията (фотосинтезата) и са подходящи, като: (i) катализатори за редукцията на кислород (в горивни клетки), (ii) фоточувствителни агенти във фотоволтаичните слънчеви клетки, (iii) фотокатализата и разграждане на ксенобиотици, (iv) детекция и мониторинг на природни процеси в биологични образци.

ПЪРВА ЧАСТ. ИНСТРУМЕНТИ И ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ УСТАНОВКИ

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Развитието на нанобиотехнологиите през последните десетилетия стана възможно благодарение на съвременните микроскопски инструменти, с които може да се надникне в наносвета. Чрез високо-резолюционните електронни микроскопи се наблюдават и изучават процеси на нано, супрамолекулно, молекулни, атомно и дори субатомно ниво. Атомно-силовия микроскоп позволява дори да се манипулират атомни процеси, например преместване на отделни атоми на тежки елементи върху субстрата. Съвременните атомно-силови микроскопи могат да документират процеси в реално време, протичащи в нанобио-света във воден разтвор. В дисертационния труд са използвани електронни микроскопи, атомно силов микроскоп, светлинен (флуоресцентен и конфокален) микроскоп за проследяване на наносензорните биорепортери в тъкани и клетки. Конструирани са в лабораторен мащаб фотокаталитичен, магнитен и биотехнологичен реактор, използващи наноматериали и микроорганизми за окисление и минерализиране на ксенобиотици. Използван е и традиционния

инструментариум за анализ – спектрофотометри (абсорбционен и флуоресцентен), измерване на квантовия добив, динамично светлоразсейване, ЯМР, ИЧ, циклична волтамперометрия и други.

1.2. МИКРОСКОПСКИ ИНСТРУМЕНТИ

Фазово-контрастен трансмисионен електронен микроскоп.

Биологичният трансмисионен електронен микроскоп (ТЕМ) дава възможност да се визуализират редица “невидими” наноразмерни обекти, включително и такива, които са меки, крехки или хидратирани. Това се постига благодарение на някои конвенционални микроскопски техники за приготвяне на пробата, каквито са химичната фиксация (превръщане на меките субстанции в твърди), дехидратацията, вграждането в смола, оцветяването и др. Тези техники често страдат от недостатъци, свързани с появата на артефакти а в следствие на това и трудности при коректното интерпретиране на получените данни. В дисертационния труд е използван фазово контрастния ТЕМ метод за наблюдаване на прозрачни биологични обекти, за които е характерно, че не се подлагат на предварителна химична обработка. По този начин се избягва появата на артефакти, а наблюдаваните нано и ултраструктури в биологичните обекти се доближават максимално близо до тяхното живо физиологично състояние. Разликата между фазово контрастния ТЕМ и конвенционалния ТЕМ е наличието на фазова пластинка в обратната фокусна равнина, където апертурата поддържа тънкия филм на пластинката. Характерното за фазово контрастния метод е, че част от вълните на преминаващият през пробата електронен лъч могат да се абсорбират (променя се тяхната амплитуда) и/или да се пречупят (променя се тяхната фаза). Пробите които абсорбират преминаващите вълни до голяма степен произвеждат микроскопски изображения главно, чрез промяна в амплитудата на вълната.

Диференциално-контрастен трансмисионен електронен микроскоп.

Диференциално контрастния ТЕМ също е използван за наблюдение на биологични образци, поради получения висок контраст. Контрастът се постига чрез поставяне на фазова пластинка към обратната страна на фокалната равнина на обектива. π -Фазовата пластинка обхваща половината равнина от апертурата. Изображението получено чрез диференциално-контрастния ТЕМ притежава топографска информация, заради еднопосочната антисиметрия на функцията на фазово контрастния трансфер. За по-големи обекти, като например клетки или клетъчни органели диференциално контрастния ТЕМ обикновено е оптималния избор.

Сканиращ електронен микроскоп.

При сканиращия електронен микроскоп електронният сноп се фокусира до нанометрови размери, чрез магнитни елементи и при попадането му върху образеца се наблюдават различни ефекти даващи информация за пробата. Анализирайки енергията на характеристичните рентгенови фотони излъчени от образеца може да се получи и информация за елементния състав в областта, в която попада лъча. Сканирайки лъча по образеца и регистрирайки съответния ефект се изготвят карти за елементния състав (елементно картиране) на пробата с нанометрова разделителна способност. Наночастиците се диференцират по химичен състав или електронния им контраст.

1.3. ЛАБОРАТОРНИ РЕАКТОРИ

Лабораторни каталитични фото- и магнитни реактори са създадени, благодарение на опита от пречистването на замърсени води. Нововъведението е наноматериалите от оксидни материали, които играят ролята на катализатори за обезцветяване и деструкция на водоразтворими багрила. Дизайна на реакторите е конструктивно и технологично оразмерен по начин, който да постигне максимална ефективност на фотоокислението и минерализирането. За ускоряване на процесите на деструкция са регулирани интензитета на светлинния източник, площта на катализатора, топлообменната повърхност, работния обем, както и дебита на преминаващия разтвор с цел да се установи оптималното контактно време. Лабораторната инсталация на биотехнологичния реактор е подобна на каталитичния, но в този случай вместо неорганичен катализатор се използва константно количество електроактивна биомаса. Деструктурираните окислени ксенобиотици съдържат повече функционални групи (карбоксилни, карбонилни, хидроксилни и други) и са полесни за усвояване от хетеротрофните микроорганизми, отколкото ненаситените ароматни ксенобиотици, които не са предварително обработени.

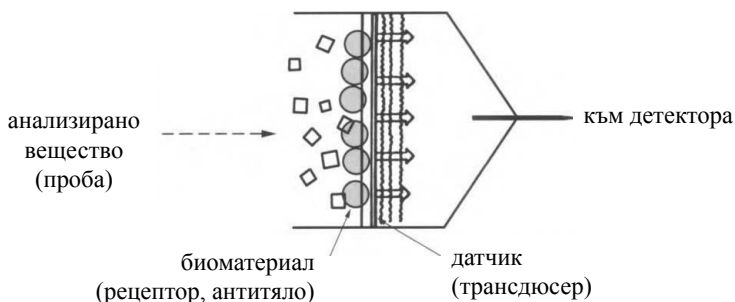
ВТОРА ЧАСТ. НАНОБИОСЕНЗОРИ ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ, ПРОСЛЕДЯВАНЕ И АНАЛИЗИРАНЕ НА ЦЕЛЕВИ МОЛЕКУЛИ

2.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Биосензорът е аналитично устройство (или техника), използвано за откриване на аналити (химични вещества, природни продукти, отпадъци, биологични агенти, микроорганизми и др.), което работи на базата на два комбинирани етапа: разпознавателен и преобразователен, както е показано на фиг. 2.1.

Принципът на детекция на нанобиосензорите е аналогичен на оптичния биосензор, тъй като винаги полученият сигнал е оптичен, както е показано на

фиг. 2.2. На фигурата са представени двата основни етапа – разпознавателен и преобразователен при нанобиосензорите, за да е реализиран даден биосензорен процес. В конкретния случай, наночастицата играе ролята на трансдюсер и тя е покрита с химически имобилизиран биоматериал. Имобилизацията може да бъде физична (електростатично привличане на разноименно заредени повърхности) или химична (чрез ковалентна връзка). Биоматериалът взаимодейства специфично с анализираното вещество в пробата. Разпознавателната реакция протича върху повърхността на частицата. Реакцията води до промени във физикохимичните и оптичните свойства на наночастиците и тези промени се регистрират с помощта на оптичен детектор. Промените винаги имат количествени измерения, т.е. стойностите им зависят от концентрацията и природата на анализираното вещество. По-надолу тези процеси ще се разгледат по-задълбочено и ще се представят предимствата на разработените в дисертацията нанобиосензорни системи пред класическите биосензорни устройства.

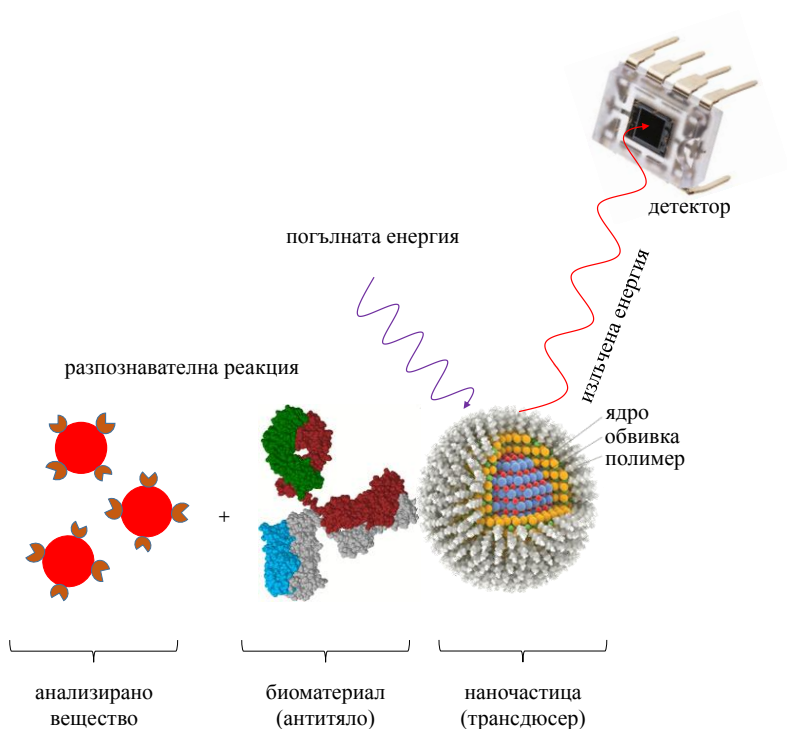


Фигура 2.1. Общ принцип на действие на биосензорите.

При класическия биосензор анализираното вещество най-често е представено в разтвор. Работният ензимен електрод е потопен в пробата и на повърхността му протичат съответните аналитичните реакции. Трансдюсера е свързан с детектора посредством електрична верига. Такова устройство може да анализира единствено аналити в макро разтвори, но то не е в състояние да установи количествено присъствието на дадени аналити (замърсители) в биологични среди - тъкани, клетки, едноклетъчни организми и т.н. Тази характеристика е особено необходим елемент за екоотоксикологията, където се изучават акумулирането и по-нататъшната съдба на различни видове замърсители в организмите, хранителните вериги, страничните реакции и последици.

Разработените нанобиосензори са решение на проблема с мониторинга на акумулирани ксенобиотици. Те са в състояние да идентифицират и измерят количествено промените в рН, количеството на метали и пестициди, детекция на биомолекули (токсини, специфични белтъци,

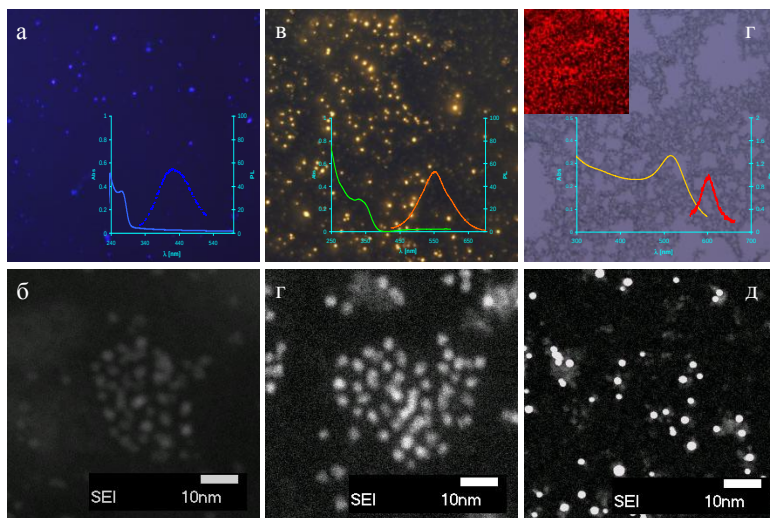
липиди, ДНК и др.), както в тъкани, така и в единични клетки или едноклетъчни организми (например биоиндикатори). Това е възможно благодарение на (i) малкият размер на наночастиците, (ii) способността им да проникват в тъкани и вътреклетъчни пространства и (iii) възможността за предаване на разстояние (извън образца) на оптичен сигнал до измервателния оптичен детектор. В дисертационният труд са представени освен такива наносензори, също така и сензорни репортери за проследяване на анализирани вещества (в т.ч. и на единични молекули) в дадените биологични образци.



Фигура 2.2. Общ принцип на действие на нанобиосензорите. Полученият сигнал е оптичен (фотони от видимата, инфрачервената или рентгеновата част на спектъра). Той се улавя от фоточувствителен детектор (най-често CCD-камера, Charge-Coupled Device или зарядо-свързан прибор), който го трансформира в електричен сигнал или изображение.

2.2. НАНОМАТЕРИАЛИ С БИОСЕНЗОРНИ СВОЙСТВА

Изследвани са способностите наносензори от разнообразни химични съединения, като полупроводникови II-IV (квантови точки), въглеродни, златни, магнитни и други органични и неорганични наночастици (фиг. 2.3). Използваните наноматериали са с размери сходни до размерите на биомолекулите, използвани за разпознаване на анализа. Поради малките си размери те могат да бъдат погълнати от клетките и да се идентифицират и проследяват *in vivo* макромолекули или друг целеви аналит.

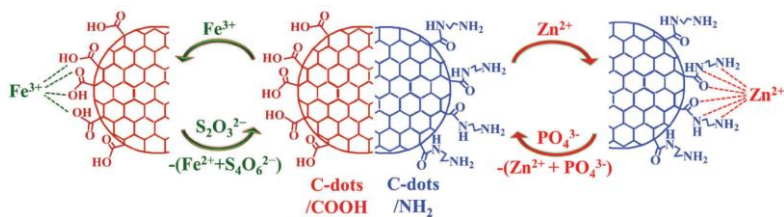


Фигура 2.3. Оптична и електронна микроскопична диференциация на еднакви по размер наночастици. (а, б) ZnS-стрептавидин, (в, г) CdS-стрептавидин, (д, ж) колоидно злато-тexasки червено. На флуоресцентните снимки са показани абсорбционните и фотолуминисцентни спектри на съответстващите наночастици. 200 kV сканиращ трансмисионен електронен микроскоп в тъмно полеви режим. Скала за (б), (г), (ж) = 10 nm.

При наносензорните репортери биоматериала се свързва към анализа благодарение на разпознавателна имуно-реакция (системата авидин-стрептавидин или антиген-антитяло). Това е особено полезно в случаите, когато обект на анализа са специфични биологични макромолекули (например мембранни протеини) в клетки или тъкани. При тях наносензорните репортери, които участват в имуно-разпознавателна реакция остават биологично свързани в пробата. Останалите (несвързаните) наночастици се отмиват и по този начин се елиминира фоновия шум на сигнала. По-нататък, за да се регистрират

биосензорните репортери пробата се излага на облъчване с лъч от фотони или електрони. При това облъчване наночастиците поглъщат и излъчват енергия с определена честота, която може да зависи, както от размерите на частиците (квантов ефект), така и от техният химичен състав. Излъчената енергия (фотони от видимата, ултравиолетовата или рентгенова област) се регистрира чрез детектор. Тя е характеристична и по нея се определя химичния състав на съответния биосензорен репортер.

Сензорните свойства на въглеродните квантови точки (C-dots) спрямо някои метали в буферен разтвор са демонстрирани на фиг. 2.4. Въглеродните наночастици съдържат различни функционални групи на повърхността си ($-\text{COOH}$, $=\text{CO}$, $-\text{NH}_2$, $=\text{NH}$ и др.), които проявяват селективност при свързването си с дадени йони при определено рН на разтвора. Сред изследваните йони Fe^{3+} демонстрира силен ефект на загасване на флуоресценцията на наночастиците. По повърхността на наночастиците се съдържат множество карбоксилни групи, които показват афинитет към свързване с железните (III) йони. Интензитета на флуоресценцията намалява с увеличаване на концентрацията на железни (III) йони, но не се наблюдава отместване на пика при $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$.



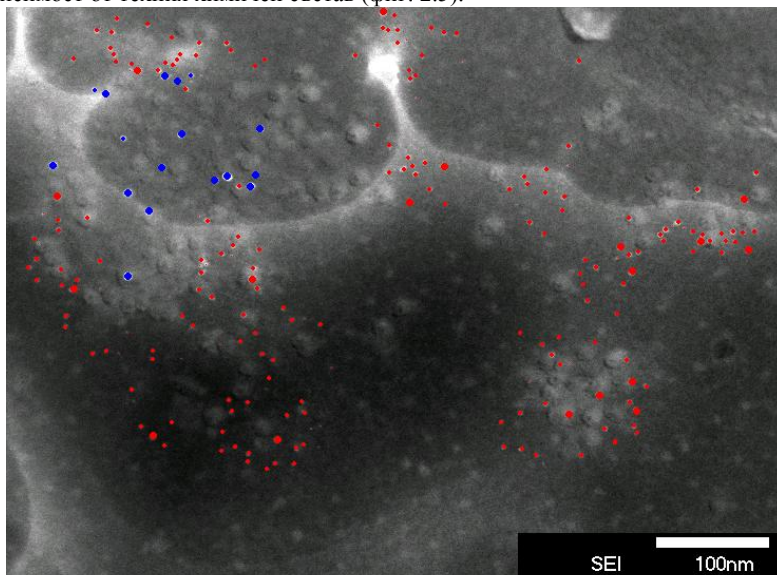
Фигура 2.4. Схематично представяне на сензорния процес на въглеродни квантови точки към метални катиони и неметални аниони.

Този ефект на затихване може да се дължи на неизлъчващ електронен трансфер от възбуденото състояние на въглеродните наночастици към d-орбиталите на Fe^{3+} йон. Ако желязото бъде отстранено от разтвора (например при реакция с $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) интензивността на флуоресценцията на наночастиците се възстановява. Някои други метали обаче (Zn^{2+}) оказват обратно въздействие, т.е. повишаване на интензитета на флуоресценцията на въглеродните квантови точки. При този случай интензитета на флуоресценцията се увеличава с увеличаване на концентрацията на цинковите (II) йони, но позицията на λ_{max} отново си остава същата ($\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$). Наблюдаваното повишение се дължи до голяма степен на по-високия афинитет на Zn^{2+} към неподделените електрони на amino-групите от повърхността на наночастиците.

2.3. НАНОБИОСЕНЗОРНИ РЕПОРТЕРИ ЗА ЛОКАЛИЗИРАНЕ И ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ПРОТЕИНИ

В дисертацията са разработени наносензори и методика за детекцията им върху тъкани, така че да се диференцират еднакви по размер наночастици (колоидно

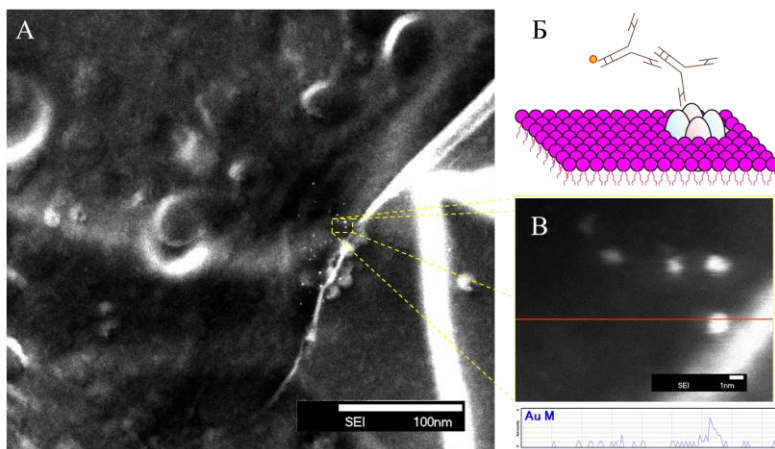
злато и квантови точки). Методът е демонстриран, чрез анализ на глутаматови рецептори (NMDA- и AMPA-мембранны белтъци). Флуоресцентните свойства на наносензорите позволяват лесно да се откриват протеините върху повърхността на репликата от тъкан с помощта на флуоресцентен микроскоп. Голямото предимство на наблюденията със сканиращ трансмисионен електронен микроскоп (СТЕМ) е възможността да бъде използван в tandem с EDX детектор за прецизен микроанализ и детектиране на наночастиците в зависимост от техния химичен състав (фиг. 2.5).



Фигура 2.5. Мултитипно маркиране на мембранны глутаматови рецептори върху реплика на нервна тъкан чрез златни нанобиосензорни репортери (син цвят) и полупроводникови квантови точки (червен цвят). Репликата е изградена от въглероден филм с дебелина между 15 и 20 nm. Въпреки, че не е покрита с платинена отливка върху нея ясно се виждат контурите, очертанията и морфологията на тъканта.

Чрез използване на ултрамалки 1.4 nm златни наночастици, като нанобиосензорни репортери може да се повиши чувствителността на маркираните мембранны белтъци до степен детектиране на техните отделни субединици. Много малкия размер на частиците намалява пространственото отблъскване между антителата и антигените, което води до по-висока ефективност на детектиране на повече от една субединица в четвъртичната белтъчна структура на глутаматовия рецептор, както е показано на фиг. 2.6.

Методът дава възможност за картиране на елементното разпределение върху микрографската снимка, както и определяне субединичния състав на белтъка (хомо или хетеро четвъртичен белтък).

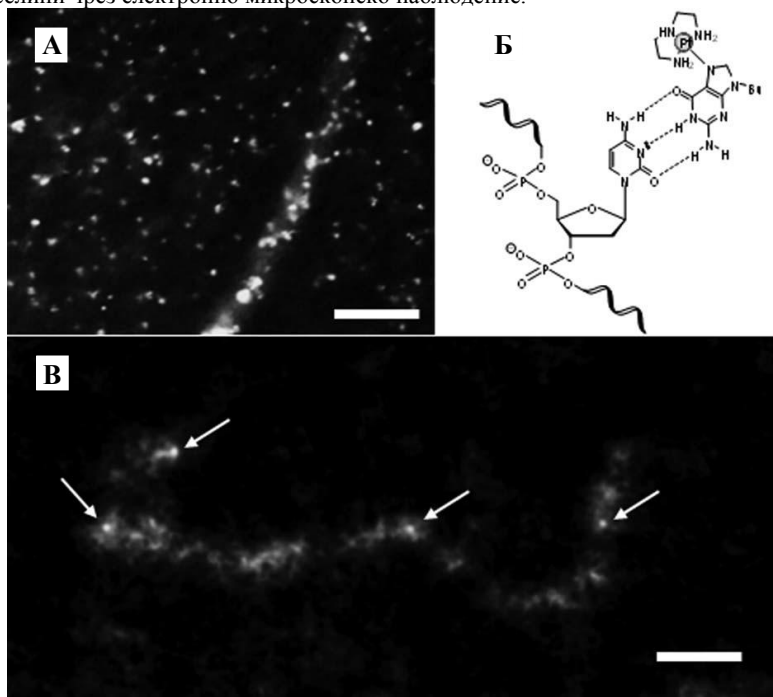


Фигура 2.6. Реплика на хипокампус, маркирана с 1 nm златни нанобиосензорни репортери. (А) СТЕМ изображения на клъстер от златни наночастици. (Б) Схематично представяне на детекцията на субединици, и (В) EDX-сканиращ анализ на 1 nm златни наночастици. Мащаб на скалата в А = 100 nm и В = 1 nm.

2.4. НАНОБИОСЕНЗОРНИ РЕПОРТЕРИ ЗА ЛОКАЛИЗИРАНЕ И ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА НУКЛЕИНОВИ КИСЕЛИНИ

Разработен е метод за визуализиране на ДНК в трансмисионен електронен микроскоп, чрез маркиране на цитозиновите азотни бази с гуанинови производни, които съдържат платина, като високо-контрастен тежък елемент. За тази цел са получени опънати едноверижни ДНК фрагменти, чрез модифициране на двойно верижна ДНК. Методът на маркиране включва следните етапи: 1) разтягане и адсорбция на ДНК върху подложката на електронно микроскопската решетка (т.е. върху въглеродния хидрофобен филм, който улавя отрицателно заредената ДНК); 2) комплементарно свързване на цитозиновата база на опънатите едноверижни ДНК нишки върху подложката с гуаниново производно, съдържащо платина, чрез базово-специфична водородна връзка; и 3) получаване на увеличено изображение на специфично маркираната ДНК. Опънатите едноверижни ДНКи върху подложката са получени, чрез бързо удължаване на ДНК нишки на повърхността между въздуха и буферния воден разтвор. Свързаното платинено

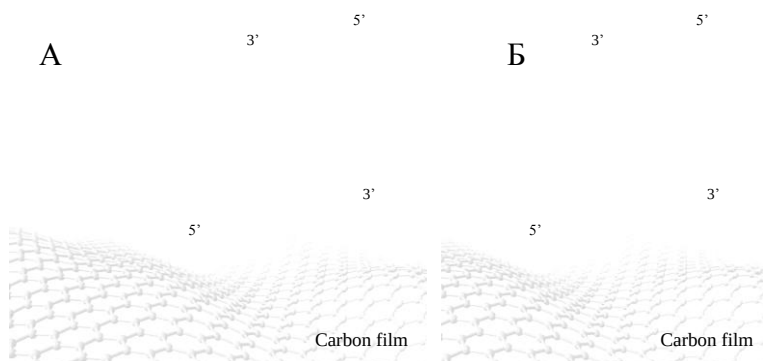
производно на гуанина служи, като богат на електронна плътност маркер и то може да бъде разграничено от заобикалящия го фон на въглеродния филм и визуализирано, чрез наблюдаване с конвенционален ТЕМ при 100 kV ускорено напрежение (фиг. 2.7). Този метод позволява изследване на специфични нуклеинови макромолекули чрез анализа атом-по-атом и е обещаващ начин за бъдещо секвениране на ДНК или молекулярна диагностика на нуклеинови киселини чрез електронно микроскопско наблюдение.



Фигура 2.7. Комплементарно маркиране на едноверижна ДНК с Pt-съдържащо гуаниново производно. (А) Контролен експеримент - 9-бутил-7-Pt-(диетилентриамин) гуанидин перхлорат върху въглероден филм; (Б) Образуване на водородна връзка (Уотсън и Крик) между 9-бутил-7-Pt-(диетилентриамин) гуанидин перхлорат и цитозиновата азотна база от захарно фосфатния скелет на ДНК; и (В) електронно микроскопска снимка (100 kV СТЕМ в режим на тъмно поле) на маркирана едноверижна ДНК нишка. Със стрелки са показани единичните атоми на платината. Машаб = 5 nm.

Имобилизирането и разтягането на навити ДНК молекули върху хидрофобен въглероден филм е предизвикателна микроскопична техника, която намира

различни приложения, особено за генна секвенция. В настоящата дисертация е използвано пиреновото ядро, като котвен елемент за захващане на отрицателно заредената двойно верижна ДНК молекула към графитената хидрофобна повърхност или датчик (фиг. 2.8). ДНК и пирена са свързани, чрез линкер, който е съставен от четири алифатни метиленови групи. За получаването на пиренова ДНК е проектирано мултифункционално фосфорно-амидно мономерно съединение. То съдържа пиренилбутоксилова група, като котвен елемент за π -адсорбционно закачване към въглеродния филм, 2-цианоетоксил и диизопропиламино, като свързващи групи за конюгиране към активирана олигонуклеотидна верига или ДНК молекула.



Фигура 2.8. Пирен – дуплекс взаимодействия: (А) адсорбция чрез π -атомните орбитали върху хидрофобната графитена повърхност и (Б) интеркалация между базовите двойки във вътрешността на ДНК веригата.

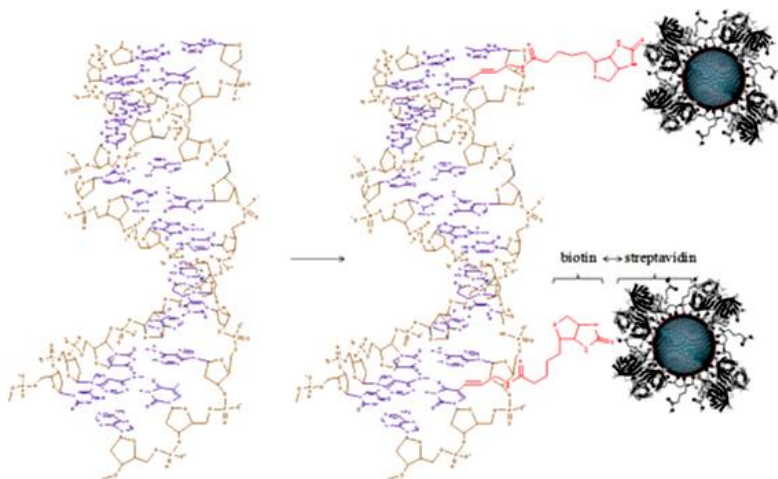
Нанобиосензорните репортери детектират и проследяват функционално активна плазмидна нуклеинова киселина в цианобактерии. За тази цел биотинилирана плазмидна slr2060 ДНК се конюгира с Qdots-стрептавидин. Биологично активната ДНК се визуализира чрез зелена емисия в светлинен флуоресцентен или конфокален микроскоп. Образуваните Qdots-ДНК конюгатите са биологично-активни, т.е. те експресират ензима ацилтрансфераза. Qdots-ДНК и конфокалните микроскопични техники за визуализиране са в състояние да изследват задълбочено генния транспорт 3D пространството през мембраната на живи цианобактериални клетки в реално време. Дългосрочните кинетични изследвания разкриват стъпките на извънклетъчната и вътреклетъчната микросреда за транспортиране на плаزمиди в живи клетки. Генния транспорт и инкорпориране в цианобактериалната хромозома е доказан, чрез конфокален микроскоп и

индикаторни биологични тестове (петрита). В представените изследвания маркираната с квантови точки плазмидна ДНК се използва за първи път за дългосрочно наблюдение на протичащите вътреклетъчни процеси в цианобактериите PCC6803 (както е показано на фиг. 2.9 и 2.10).

Механизмът за разпознаване и поправяне на неприродни ДНК остатъци не пречат на функционирането на клетъчния цикъл. По този начин се наблюдава вътреклетъчния трафик и геномно инкорпориране на плазмидна ДНК, маркирана с Qdots. В началната точка на мониторинга (0 ÷ 24 часа) транслокацията на Qdots-ДНК от външната среда към вътрешността на клетката е показано ясно с увеличаване на времето за наблюдаване. Още в първите 6 до 12 часа инкубиране се наблюдават Qdots-ДНК конюгат съответно в клетъчната мембрана или цитоплазмата.

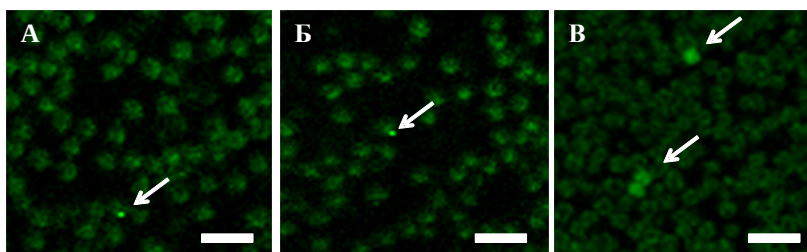
Тъй като клетките са в различни етапи на клетъчния цикъл клетъчното ядро не може да поеме Qdots-ДНК по едно и също време във всички клетки. Стрелките показват единични клетки, в които експресията на srl2060 нараства постоянно с времето. Светлите зелени петна на конюгатите Qdots-ДНК са ясно видими в заразените клетки по време на няколко часовото наблюдение.

В контролния експеримент се наблюдават само хомогенност в контраста на цианобактериите.



Фигура 2.9. Получаване на ДНК маркирана с Qdots. Първата стъпка е включване на aminoallyl-dUTP към плазмидната ДНК чрез стандартен PCR протокол. Втората стъпка е ковалентно закачване на биотин-сукцинимидилов

естер към amino групата. Третата стъпка е маркирането с Qdots-стрептавидин, чрез имуно-реакция.

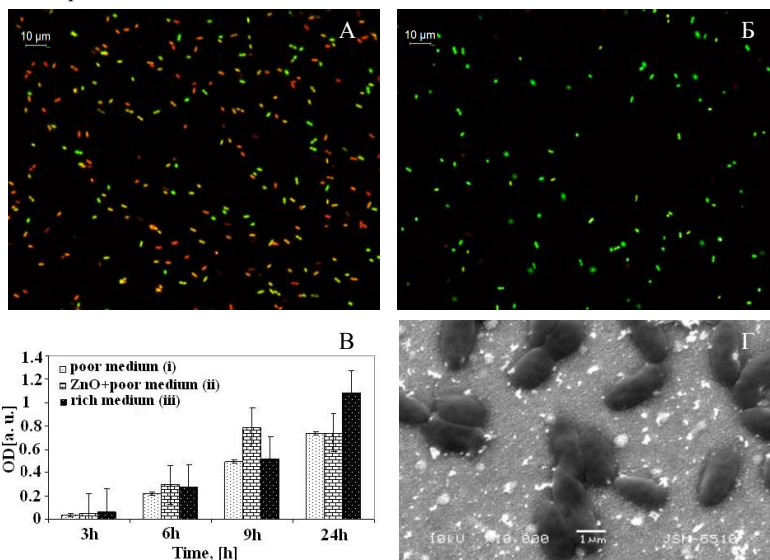


Фигура 2. 10. Мониторинг в реално време и проследяване на преминаването на Qdots-ДНК конюгат във вътреклетъчното пространство на цианобактерията *Synechocystis* sp. PCC6803, чрез конфокален микроскоп. На микрографските изображения (А) и (Б) клетките са наблюдавани в конфокалния микроскоп след 6 часа инкубация, и на микрографията (В) след 12 часа инкубация с Qdots-sr12060. Машаб на скалата = 10 μm .

2.5. СТИМУЛИРАНЕ НА РАСТЕЖА НА ДЕТЕКТИРАНИТЕ МИКРООРГАНИЗМИ ВЪРХУ ТРАНСДЮСЕР, ИЗГРАДЕН ОТ НАНОСТРУКТУРИРАН ОКСИД

Полупроводниковия цинков оксид е широко използван наноматериал в биосензорните технологии при дизайна на високочувствителен датчик (или трансдюсер) за различни приложения. В опит да се оцени влиянието му върху микроорганизмите в дисертационния труд са изследвани два вида наноструктурирани филми (средна дебелина 600 – 100 nm), които се използват за направата на трансдюсери. Единият вид е приготвен чрез нанасяне на подложка от зол-гел суспензия (зол-гел метода) а другия е, чрез магнетронно разпръскване. Тяхната поликристална структура и специфичната характеристика на повърхността са анализирани, чрез рентгенова дифракция и атомно-силов микроскоп. Оценката за стимулиране на растежа на бактериите се определя, чрез епифлуоресцентен микроскоп (оцветяване на живите и мъртви бактерии съответно в зелен и червен цвят с китовите Live/Dead BacLight). В проведените експерименти стимулирането на растежа върху наноструктурирания трансдюсер от ZnO се демонстрира, чрез грам положителни и грам отрицателни бактерии, като биоиндикаторни микроорганизми, съответно *Bacillus cereus* и *Pseudomonas putida*. Тези два бактериални вида са избрани, защото са добре познати и проучени в

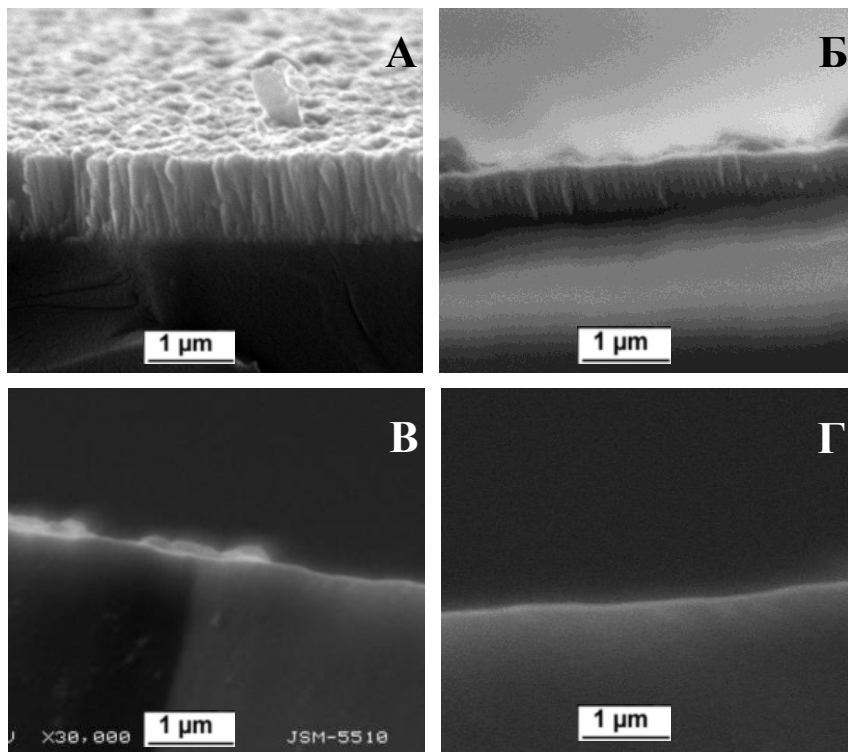
биосензорните технологии. И освен това те притежават структурни различия на клетъчните им стени. Тези патогени са често срещани в хранителни източници или в някои търговски продукти. Получените данни разкриват, че метода на получаване на трансдюсера влияе силно върху бактериалното инхибиране и делене на клетките (фиг. 2.11). Тези резултати отразяват прецизно природата на сигнала, когато цинковия оксид е използван материал в биосензорните технологии.



Фигура 2. 11. Флуоресцентни микроскопични изображения на бактериални суспензии на *Pseudomonas putida* и *Bacillus cereus* в бедна хранителна среда: (А) контролен експеримент на бактериалната суспензия в mid-log фазата; (Б) присъствие на наноструктурирани филми от цинков оксид, получени чрез магнетронно разпръскване в бактериалната суспензия в mid-log фазата; (В) оптична плътност и (Г) СЕМ микрографски изображения на бактериални колонии върху филма от цинков оксид, получен чрез магнетронно разпръскване. Всички бактериални проби са взети в шестия час от началото на култивирането им. Машаб на скалата: А и Б = 10 μm, Г = 1 μm.

Наноструктурираните трансдюсери, приготвени от цинков оксид, чрез отлагане с магнетронно разпръскване притежават експлоатационно време на живот, което зависи от разтварянето им в анализираната проба. Разтварянето на филмите, получени чрез магнетронно разпръскване при контакт с бактериалната суспензия може да се проследи посредством сканиращ

електронен микроскоп. Данните потвърждават намаляване на дебелината на наноструктурирания филм, както е показано на фиг. 2. 12. Представените СЕМ микрографски снимки показват, намаляване на дебелината на трансдюсерите от ZnO при контакт с микроорганизмите в бактериалната суспензия. Първоначалната дебелина на филма е около 1 μm (фиг. 2.12А). След 120 min контактено време с бактериалната суспензия дебелината на филмите е по-малка от 500 nm (фиг. 2.12Б), а след 180 min или повече (фиг. 2.12В, Г) филма напълно изчезва.



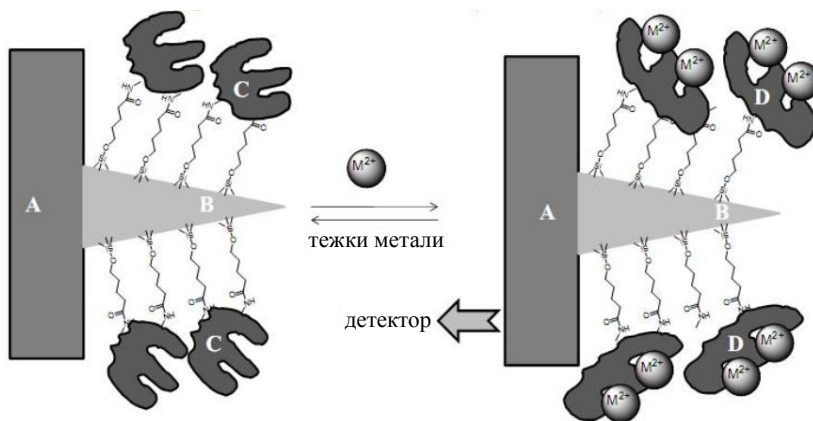
Фигура 2. 12. СЕМ изображения на наноструктуриран тънък филм от ZnO, който е взаимодействал с бактериалната суспензия (при неутрално pH на средата). Времето на разтваряне е А = 0 min (първоначално състояние); Б = 120 min; В = 180 min; Г = 240 min. Мащаб на скалата = 1 μm .

Резултатите от това проучване са от голямо значение за приложението на ZnO, като преобразователен материал в дизайна на биосензорните технологии.

ТРЕТА ЧАСТ. НАНОБИОСЕНЗОРИ ЗА МОНИТОРИНГ НА ЗАМЪРСИТЕЛИ В ОКОЛНАТА СРЕДА

3.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Откриването на специфични замърсители в околната среда в особено ниски концентрации (в рамките на mM или pM), като тежки метали, пестициди, токсични органични интермедиати и т.н. е от особена важност за екологията. Биосензорите, базирани на уникалните свойства на наноматериалите могат значително да подобрят чувствителността на анализа и да разширят границите на детекция. В дисертационния труд са разработени няколко нанобиосензори за определяне на тежки метали. При тях имобилизираният биоматериал представлява ензими, които са способни да реагират селективно с анализираните металните йони. Освен ензими могат да се използват и органични полимери, аминокиселини и др., както е показано при оптично-влакнестия биосензор на фиг. 3.1. При контакт със солите на тежкия метали в разтвор се образува хелатен комплекс, който придава характерен цвят на повърхността на датчика. При този колориметричен анализ биосензора работи в синхрон с оптичното влакно и получения оптичен сигнал се трансформира в електричен посредством чувствителен детектор.

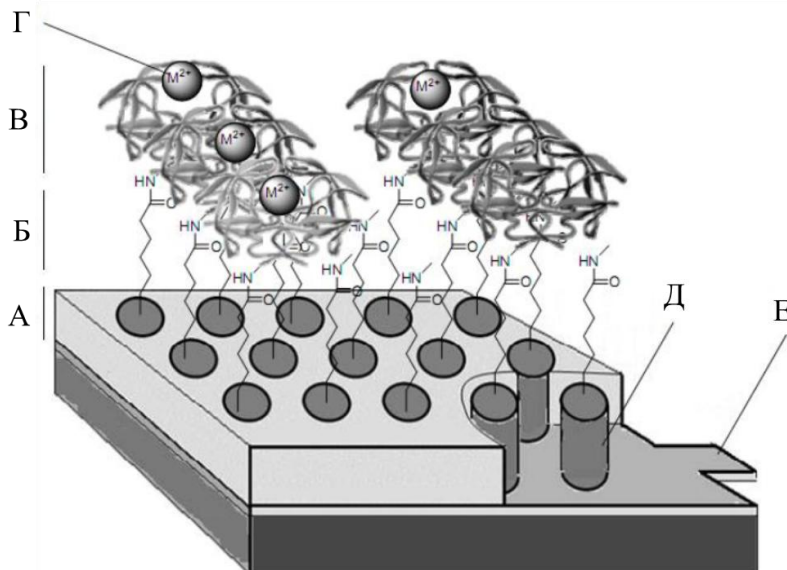


Фигура 3.1. Детекция на тежки метали с оптично-влакнест биосензор, покрит с ензими за селективно улавяне на анализа в разтвор. (A) трансдюсер, (B) оптично влакно и (C) ензим.

3.2. ЕНЗИМЕН НАНОБИОСЕНЗОР

Някои от ензимите могат да бъдат имобилизирани върху въглеродни

нанотръби (фиг. 3.2). Предимството на въглеродните нанотръби е че са химически инертни, биосъвместими и притежават висока електропроводимост. Това значително повишава чувствителността на анализа. При някои случаи нанотръбите се използват освен за посредник при пренасянето на електричните заряди, също и като катализатор за ускоряване на окислително-редукционната реакция по време на аналитичния процес. За откриване на тежки метали и пестициди се използват редица ензими, като ацетилхолинестераза, алкална фосфатаза, уреаза, инвертаза, пероксидаза, L-лактат дехидрогеназа, тирозиназа, нитрат редуктаза и други. Инхибирането на имобилизирания ензим може да се измерва, чрез електрохимичен (амперометричен, потенциометричен, кондуктометричен) или оптичен детектор (Loukanov et al., 2010).

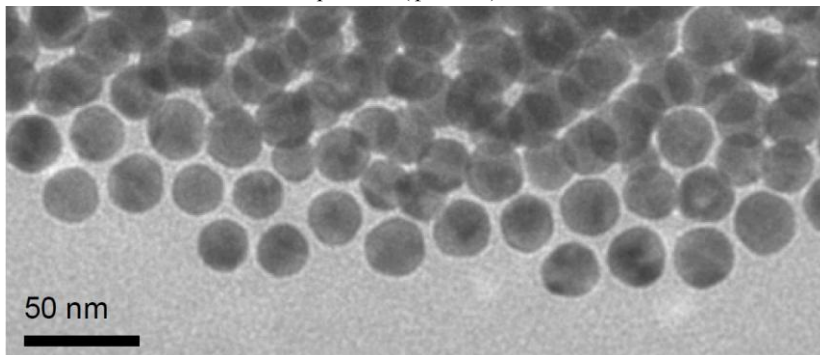


Фигура 3.2. Нанобиосензор за детекция на тежки метали. Ензимите са имобилизирани върху въглеродни нанотръби. Тяхното инхибиране води до промяна в електропроводимостта на нанотръбите (съответно на електричния сигнал). А – изолационен слой, Б – химически линкър, В – имобилизирани ензими, Г – метални йони, Д – въглеродни нанотръби, Е – електричен контакт (повърхност на работещ електрод).

При анализа на пестициди най-често се измерва инхибирането на дадения ензим (особено ефективна е холинестеразата, ChE). Основните инхибитори на ChE са органофосфорните и карбаматните инсектициди. Освен тях обаче инхибираща роля имат още тежките метали, флуоридите, никотина и др.

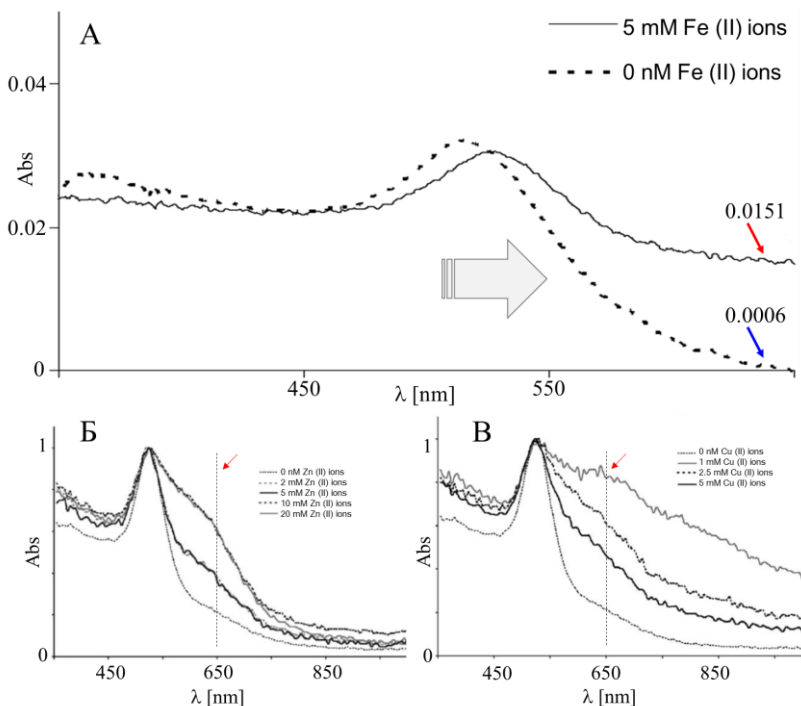
3.3. ЗЛАТНИ НАНОЧАСТИЦИ ЗА КОЛОРИМЕТРИЧНА СЕНЗОРНА ДЕТЕКЦИЯ НА ЗАМЪРСИТЕЛИ

По-долу са разгледани златни наночастици, като колориметрични наносензори за детекция на метални катиони в киселинно-руднични води. В това изследване повърхността на златните наночастици (Au NP) е модифицирана с органичен слой от лиганди за селективна детекция на Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} йони в кисел буферен разтвор при фиксирано рН. Органичната обвивка, състояща се от етилендиамин тетраоцетна киселина (ЕДТА) изпълнява две функции – позволява стабилизирането на частиците и ги функционализира да улавят специфично анализирания метални йони в пробата. По такъв начин Au NP-ЕДТА наносензори адсорбират само Fe^{3+} или Fe^{2+} йони в зависимост от приложеното рН. Химичната реакция води до промяна на диелектричната константа на наночастицата и измества пика на повърхностния плазмонен резонанс към червената област. Ефекта на растеж на абсорбцията при 650 nm е пропорционално зависим от концентрацията на анализа и по този начин количеството на замърсителя може да се измери, чрез конвенционален UV-VIS спектрофотометър. След оптичния анализ химически свързаните метални йони се отстраняват от органичната обвивка, чрез промиване с подходящ буфер. Така Au NP-ЕДТА наносензори следва да се използват многократно за мониторинг на съдържанието на желязо в замърсена вода (Loukanov et al., 2010). Синтеза на златните наночастици е базиран на документирания от Тюркевич протокол, при който воден разтвор на HAuCl_4 се добавя към дейонизирана вода и се загрява до кипене. Цвета на суспензията се променя от почти безцветно до червено, което съответства на монодисперсни колоидни златни наночастици с диаметър 20 nm (фиг. 3.3).



Фигура 3.3. TEM микрографска снимка на синтезираните златни наночастици (диаметър около 20 nm) по метода на Тюркевич. Не се забелязва промяна във формата на наночастиците и поради това няма отклонение в Abs спектър. Мащаб на скалата = 50 nm.

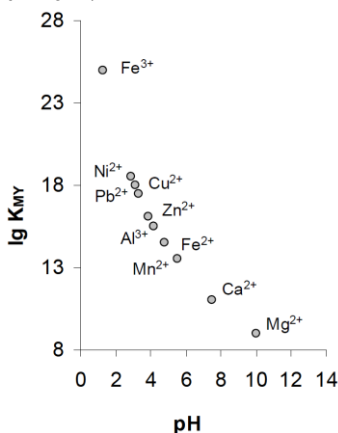
Абсорбционния спектър на Au NPs е индикатор за тяхната форма и размер (Liz-Marzan 2004). UV-VIS спектъра на синтезираните Au NPs показва пик при 515 nm (фиг. 3.4 А), който съответства на частици с размери между 10 nm и 20 nm в диаметър (Sadtler et al. 2002). ТЕМ анализа (на фиг. 3.3) потвърждава, че наночастиците притежават среден диаметър около 20 nm. Регистрират се еднакви по формата и размер наночастици, получени чрез редукция с натриев цитрат. Суспензията от Au NPs е стабилизирана с 2 % полиетилен гликол (MW 4000). Такава колоидна суспензия е много чувствителна към концентрацията на анализираните йони.



Фигура 3.4. Детекция на метални катиони със златни наночастици. Влияние на различни концентрации на (А) желязо, (Б) цинк и (В) мед върху Abs спектри на Au NPs-ЕДТА.

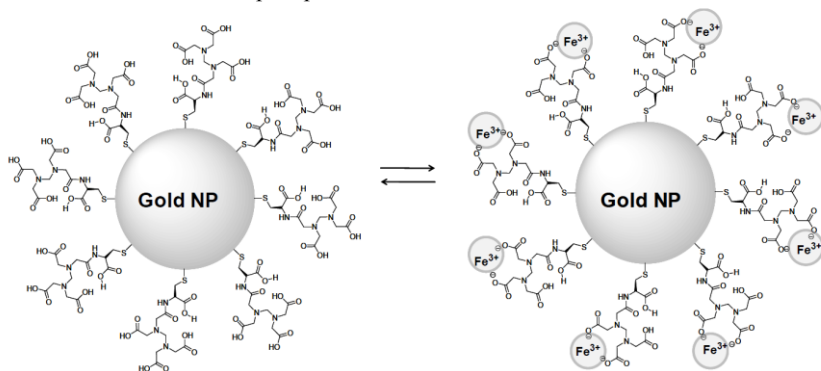
Ако детектираните тежки метали са с високи концентрации резултата най-често е агломерация на наночастиците. Тя лесно се забелязва, защото цвета на разтвора се променя от червено в тъмно синьо. Поради тази причина в повечето случаи анализираната проба трябва да е с ниска концентрация или

силно да се разрежи преди анализа. Препоръчително е преди анализ пробата с анализираното вещество да се третира с подходящ буферен разтвор (в случая с желязни йони пробата е третирана с ацетат), за да се създадат необходимите рН условия за комплексобразуване и селективна детекция. Известно е, че ЕДТА е ефективен комплексобразовател за метални катиони. При смесване на Au NPs-ЕДТА с желязо, цинк и мед се регистрират нарастване на абсорбцията при 650 nm, както е показано на фиг. 3.4. Промяната е ясно изразена при желязото и медта (3.4. А, В), при които ширината на пика на плазмонния резонанс прогресивно нараства с повишаване на концентрацията. Подобен ефект се наблюдава и при цинка (фиг. 3.4 Б), но ясното отчитане на данните се регистрират при по-големи различия в концентрациите. ЕДТА е известен, като ефективен хелатиращ агент за йони на тежки метали (Hristova et al. 2003). Неговите полезни практически качества се дължат на ролята му, като хексадентантен лиганд и хелатиращ агент, т.е. благодарение на способността му да свързва селективно метални йони, като Fe^{3+} , Ca^{2+} и др. Получените комплексни съединения MY^{n-4} са разтворими във вода. Влиянието на $[\text{H}^+]$ върху равновесието във воден разтвор на MY^{n-4} е основен параметър за избора на условия за комплексометрично определяне на специфичните метални йони. Количествения критерий е стойността на константата за стабилност K_{MY} . Както е показано на фиг. 3.5. Тежките метали притежават различни стойности на K_{MY} , които силно зависят от рН на разтвора. Йоните с по-висока степен на окисление могат да получат по-стабилни комплекси с ЕДТА и те се откриват в по-кисела среда. Така количеството на Fe^{3+} е възможно да се определи селективно от това на Fe^{2+} йони.



Фигура 3.5. Максимални стойности на рН, които са подходящи за комплексометрично откриване на често срещаните се йони в кисели руднични води.

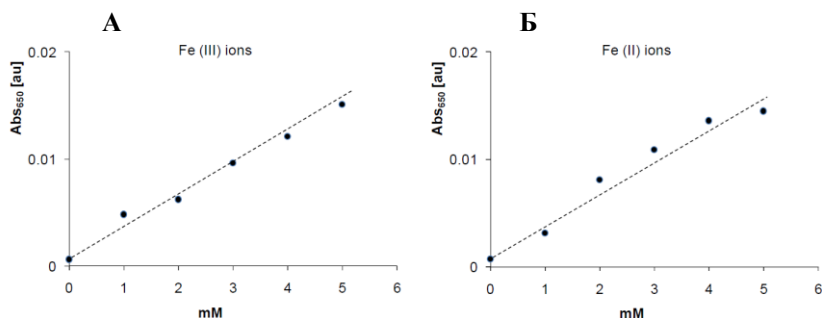
В проведените експерименти AuNPs-ЕДТА откриват наличието на Fe^{2+} йони при рН около 4 ~ 5, в сравнение с Fe^{3+} йони, където рН е близо до 1. Au NP-ЕДТА наночастици са добре разтворими във вода и в разреден ацетатен буфер с рН от 1 до 12. Етилен диаминтетраоцетната органична обвивка притежава четири константи на дисоциационните й състояния, които са зависими от рН на разтвора. Ако ацетатния буфер е с рН около 1 всички карбоксилни групи са протонирани. Това състояние е най-доброто за селективно свързване на Fe(III) чрез лигандите на ЕДТА, както е показано на фиг. 3.6. Получените комплекси са разтворими във вода и те водят до промяна на цвета на суспензията и съответно абсорбционния спектър. Това е индикация за протичането на химична реакция, която може да бъде измерена и оценена, чрез колориметричен апарат, като VIS-спектрофотометър. Обхвата на сензорната ефективност на тази реакция е пропорционален на концентрацията на Au NP-ЕДТА в пробата. При по-големи количества на наночастиците могат да се детектират по-високи концентрации на желязни йони. Въпреки това, високите концентрации може да доведат до агломерация на колоидните златни наночастици и те не са препоръчителни.



Фигура 3.6. Адсорбция на Fe(III) върху Au NP-ЕДТА в кисели условия. Този процес е обратим при алкално рН на буфера.

Експериментално е установено, че най-възпроизводимите условия за Au NP-ЕДТА наносензора се намират в концентрационния интервал на наночастиците между 5 nM ~ 5 mM (както е показано на фиг. 3.7). Този малък концентрационен обхват е недостатък на метода, тъй като той изисква предварително разреждане (обработка) на анализиранията проба. Сензорната ефективност може да се подобри, чрез добавяне на стабилизиращ материал към суспензията, като полиетилен гликол (PEG, MW: 4000). Адсорбцията на желязни йони с различна степен на окисление върху Au NP-ЕДТА е рН зависима. По този начин, наличието на Fe^{2+} може да бъде детектирано при рН

5. Десорбцията на метални йони протича при алкално рН, като Au NP-ЕДТА се центрифугират и промиват с амониев буфер. След тази процедура наночастиците са готови за употреба при анализа на следващата проба. При излагане на Au NP-ЕДТА на различни концентрации на Fe^{3+} и Fe^{2+} в моделни разтвори се наблюдава зависимост между промяната на концентрацията и стойностите на оптичната абсорбция. Промяната в абсорбционните спектри е много ясна в случая на Fe^{2+} йони (фиг. 3.4 А), където ширината на пика на повърхностния плазмонен резонанс намалява с понижаване на концентрацията на анализа. Спектралната функция се дължи на абсорбцията на Fe^{2+} йони от ЕДТА лигандите, като по този начин се променят диелектричните свойства на носителя около наночастиците.



Фигура 3.7. Линейна зависимост между концентрацията на анализираното вещество (А) Fe^{3+} и (Б) Fe^{2+} , и абсорбционен интензитет на Au NPs-ЕДТА при фиксирана 650 nm дължина на вълната.

Тесният пик при 524 nm е оригиналният плазмонен пик на Au NPs-ЕДТА без присъствието на желязни йони, докато по-широкият червено отместен, центриран при 531 nm се дължи на полученото комплексно съединение. Зависимостта на нормализираната абсорбция на светлина при 650 nm и стойността на концентрацията е графично представена на фиг. 3.7 А,Б. Графиките показват, че ЕДТА покритите златни наночастици може да се използват не само за откриване на наличието, но и за измерване на концентрацията на анализираните замърсители (в случая разтворими метални катиони) в пробата (т.е. за селективен качествен и количествен анализ). По такъв начин Au NPs-ЕДТА наносензорът намира практическо приложение при детекцията на неизвестно количество разтворени метални йони в киселинно руднични води.

В обобщение, златните наночастици като наносензори са разработени за откриване на разтворими метални катиони (желязо в различни степени на

окисление, мед, цинк и други) в кисело руднични води. По такъв начин концентрацията на желязо се определя специфично дори и в присъствието на други тежки метали, които обикновено съпътстват пробата. Бъдеща модификация на повърхността на наночастиците може да доведе до висока специфичност на наносензора, при различни приложения за детекцията освен на други тежки метали, също така и на някои органични ксенобиотици.

ЧЕТВЪРТА ЧАСТ. НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ ЗА ПРЕЧИСТВАНЕ НА ЗАМЪРСЕНИ ПРИРОДНИ ОБЕКТИ

4.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Най-често срещаните и трудни за пречистване замърсители от органичен произход са добре познатите пестициди, фунгициди, багрила, торове и т.н. Често процесите на разграждане, трансформация, утаяване и акумулиране на ненаситените антропогенни ксенобиотици в околната среда не са задълбочено изучени, поради неизброимото им голямо разнообразие. За много замърсители не се откриват данни относно биоаккумулятивния им риск и по-нататъшните последствия, произтичащи от него. Тази причина остро налага третирането на отпадни води, съдържащи резистентни и трудно разградими ксенобиотици преди изхвърлянето им в околната среда. В настоящия дисертационен труд са предложени зелените нанобиотехнологии за преработване и минерализиране на ксенобиотици. Разпространения цинковия оксид се заменя с наноструктуриран титанов диоксид. Поради добре развитата си наноструктура фотокатализатора притежава по-голяма повърхност и повече каталитични центрове, а от тук и по-висока ефективност на разграждане. Освен това TiO_2 е устойчив на промени в рН на разтвора и не се разтваря, както цинковия оксид или други полупроводникови оксиди. При дотиране абсорбцията на наночастиците от титанов диоксид се измества към по-дългите дължини на вълните. В дисертационния труд е предложено и образуването на хибридни наноструктури с въглеродни наночастици (получени при карбонизирането на биомолекули) с цел адсорбция на видима и инфрачервена светлина. Това дава възможност за инициране на фотокатализа, чрез стандартните волфрамови източници на светлина и дори по-ефективно усвояване на спектъра на слънчевата светлина. Изследвани са химичните механизми на фотоокисление и разграждане и са идентифицирани крайните продукти. За пълното минерализиране на окислените органични замърсители е приложено третиране с микробни популации, извлечени от природни активни утайки. Успешното пречистване е доказано чрез стандартизирани токсикологични тестове с биоиндикаторни организми. В допълнение, получената смес от окислени

продукти представлява ненаситени карбоксилни киселини, алкохоли и феноли. Те могат да бъдат използвани от биоелектричния филм на микробните горивни елементи, като субстрат за получаването на зелена електрическа енергия.

4.2. СИНТЕЗ НА ТЪНКИ СЛОЕВЕ ОТ НАНОСТРУКТУРИРАНИ ОКСИДИ, ЧРЕЗ ЗОЛ-ГЕЛ И СПРЕЙ ПИРОЛИЗА. МАГНИТНИ ПРАХОВЕ.

Спрей пиролизата е подходящ метод за приготвяне на наноструктурирани филми с висока фотокаталитична ефективност и дълъг експлоатационен живот. В много от проведените синтети са използвани и комплексообразуватели – органични съединения, като ацетилацетон, както и полимери – етилцелулоза. Те забавят скоростта на хидролиза, като стабилизират зола, допринасят за намаляване на агломерирането на частичките, както и за формирането на порьозна структура. Това води до повишаване на фотокаталитичната активност на наноструктурираните слоеве. Получената смес се разбърква интензивно при стайна температура за 24 часа, след което се пулверизира върху предварително нагрятата подложка. След спрей пиролизата получените образци се нагряват в пещ от стайна температура до 400°C. Предложена модификация на спрей пиролиза води до получаването на филми от TiO_2 с ясно изразена кристална анатаза, както се доказва от рентгеновия анализ. Снимките от сканиращата електронна микроскопия на тънките слоеве от TiO_2 , отложени върху алуминиево фолио непосредствено след спрей пиролизата и след нагряване на нанесения слой при 400°C показват, че тези слоеве имат сравнително развита повърхност (като следват контурите на металната пластинка). Слоевете отложени върху стъклена подложка обаче притежават равна повърхност и нямат видими пори. Естеството на повърхностните хидроксилни групи върху филма е важно за неговите физикохимични свойства. Киселинно-основните свойства на тези групи определя адсорбцията на ксенобиотиците върху филмите в разтвора. Наличието им показва, че получените слоеве от титанов диоксид имат развита повърхност, което е много важен параметър определящ фотокаталитичната им активност. Фотокаталитичната ефективност е силно зависима, както от метода на получаване, така и от вида на подложката. При филмите, отложени върху стъклена подложка се регистрира наличието на натрий, дължащ се на проникване на натриевите йони от стъклената подложка в слоя, чрез термодифузионен процес. Те инхибират фотокатализата и влошават ефективността на пречиствателния процес. При филмите от алуминиево фолио разграждането на ксенобиотка протича значително по-бързо, което се обяснява със следните причини: (1) по-развитата повърхност на слоя от TiO_2 нанесен върху алуминиевата подложка в сравнение със стъклената, (2) забавянето на

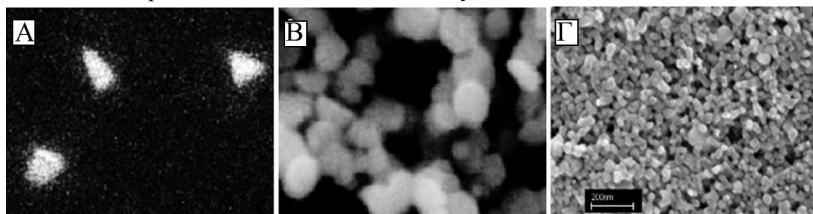
процесите на рекомбинация електрон-дупка върху метала. Изолиращата стъклена подложка създава условия за бързо протичане на тези процеси, и (3) негативно влияние на натриевите йони.

При зол гел метода се използват разтвори на титанови прекурсори в стабилизирана золна суспензия. Към нея се добавя разтвор на етилцелулоза в етилов алкохол. Сместа се нанася върху стъклени подложки и се нагрява при висока температура. При зол гел хибридни филми от TiO_2 се използва Degussa (75% анатаз и 25% рутил с размер на частиците на анатазната фаза 26 нанометра). Така получените золове или суспензии се нанасят върху стъклени подложки чрез спинеруване, след което се сушат стъпаловидно до 200°C . За да се получи подходяща дебелина на слоя процесът на нанасяне и сушене се повтаря няколко пъти. Крайната термична обработка се провежда при 400°C за 1 час на въздух.

Магнитни наночастици от типа $\text{Fe}/\text{Fe}_2\text{O}_3$ ядро-обвивка се синтезират в лабораторни условия чрез редукция на железен хлорид с алкален разтвор на натриев борхидрид. За целта воден разтвор на железна сол се прибавя бавно на капки към прясно воден разтвор на натриев борхидрид при стайна температура и атмосферно налягане. Реакцията протича за около 30 минути при непрекъснато бъркане с магнитна бъркалка. Магнитните прахове имат голяма повърхност и обезцветяват бързо разтвори на азо-багрила. Диазо връзката е по-слаба от връзката въглерод-въглерод, лесно се редуцира и разкъсва в присъствие на железни наночастици в кисели разтвори.

4.3. ТЕСТВАНЕ НА ФОТОКАТАЛИТИЧНАТА АКТИВНОСТ НА СИНТЕЗИРАНИ ОБРАЗЦИ СПРЯМО АЗО БАГРИЛА В ОТПАДНИ ВОДИ

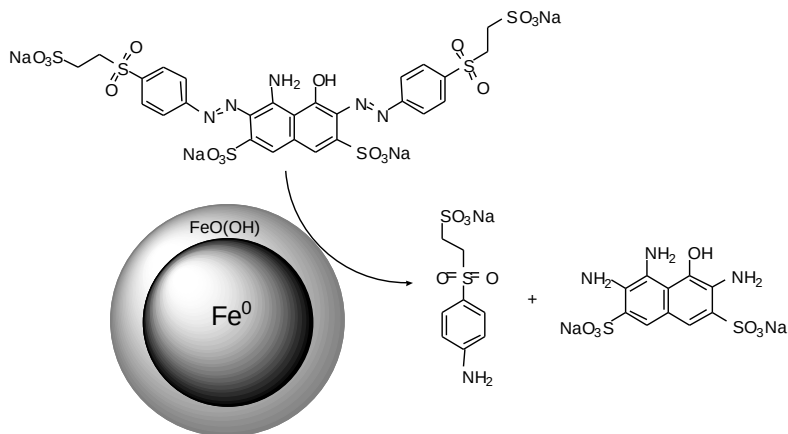
Електронно-микроскопски снимки на ZnO и TiO_2 приготвени по зол-гел метода и $\text{FeO}(\text{OH})$ наночастици са представени на фиг. 4.1. Анализа разкрива, че наночастиците са сферични със среден диаметър на ZnO между 150-230 nm в сравнение с TiO_2 , който е между 40-50 nm.



Фигура 4.1. Снимки получени чрез сканиращ електронен микроскоп на (А) $\text{FeO}(\text{OH})$, (Б) ZnO and (В) TiO_2 nanoparticles. Скала = 200 nm.

Размера на наночастиците и тяхната повърхност играят важна роля за ефективността на техните фотокаталитични свойства. Магнитните наночастици притежават триъгълна геометрична форма с размер около 150-200 nm. Те са изградени от ядро, което съдържа елементарно желязо и оксидна обвивка от Fe (II) и Fe (III).

Магнитните наночастици се инжектират в магнитния реактор под формата на суспензен разтвор. Те не са имобилизирани върху подложка, както е при ZnO и TiO₂. Поради тази причина FeO(OH) притежават много по-голяма контакта повърхност със съдържащия багрило разтвор и скоростта на обезцветяване е по-висока. Разделянето им от реакционната смес се осъществява, чрез прилагане на външно магнитно поле. Тази им способност ги прави лесни за боравене и дава възможност да бъдат прилагани при решаването на екологични проблеми, свързани с пречистване на замърсени или отпадни води. Магнитните наночастици са в състояние да редуцират и разкъсат диазо връзката, като реакцията протича най-бързо в кисела среда по механизма показан на фиг. 4.2.

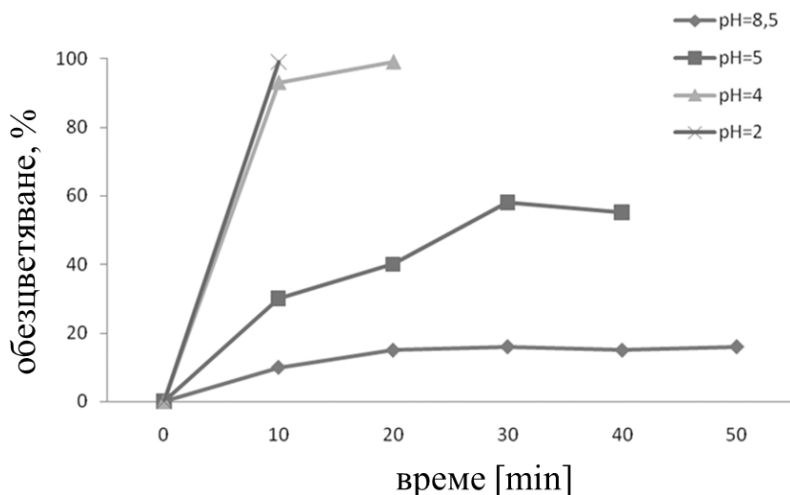


Фигура 4.2. Разкъсване на диазо връзката посредством магнитна FeO(OH) наночастица.

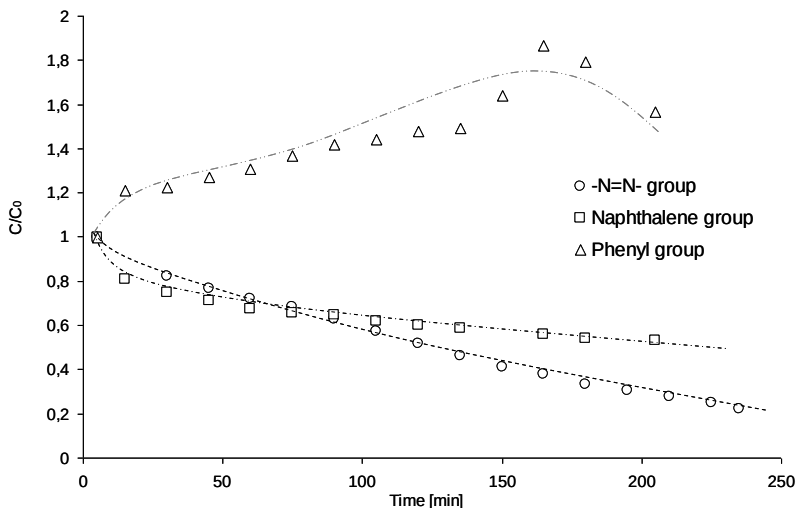
Причината поради която реакцията протича най-бързо в кисела среда е, че протоните взимат участие в механизма на разкъсване на двойната връзка. При увеличаване на pH на средата обезцветяването значително намалява (фиг. 4.3).

При фотокатализа протича окисление, което започва с диазо групата. Тя губи своя ненаситен характер и се превръща в хидроксилна структура. След което се разкъсва и от реактивно черно се получават различни производни на бензена и нафталена (както е показано на Фиг. 4.5).

По-нататъшното фотоокисление засяга предимно нафталеновата група, която се превръща в смес от ароматни карбоксилни киселини. Поради тази причина в началото на процеса нарастват бензеновите производни и това се отчита в ултравиолетовия спектрален анализ на пробата (фигура 4.6).



Фигура 4.3. Ефект на pH върху обезцветяването на реактивно черно 5 от магнитни наночастици.



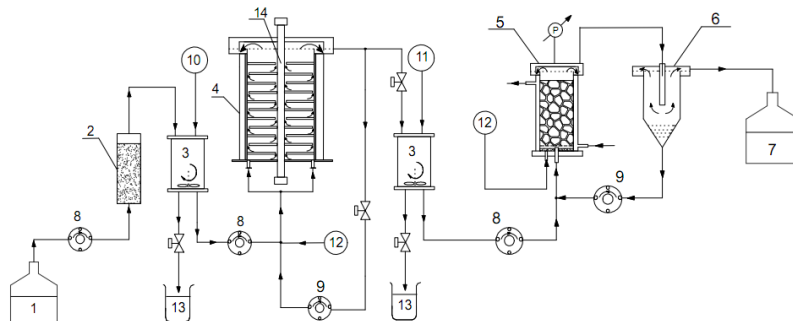
Фигура 4.6. Кинетика на фотокаталитично разграждане на азо, нафталеновата и бензеновата група.

Забелязва се, че при бензеновите производни първоначално концентрацията расте, след което достига до един максимум и бавно започва да намалява. Причината за този ход на кривата е, че бензеновите производни са много по-стабилни на окисление от нафталеновите. Ето защо фотокаталитичната реакция при нафталена протича много по-бързо за разлика от бензена, което води до слабо покачване на кривата. Разгледаните до тук механизми на реакциите и данните за кинетиката са важен елемент, свързан с проектирането и изготвянето на дизайна, а в следствие и оптимизиране на ефективността на фотокаталитичния, магнитния и биотехнологичния реактор.

4.4. ЛАБОРАТОРНИ НАНОБИОРЕАКТОРИ ЗА КОМБИНИРАНО ФОТОКАТАЛИТИЧНО И БИОЛОГИЧНО ОЧИСТВАНЕ НА ОТПАДНИ ВОДИ

На фигура 4.7 е представена лабораторна схема на каталитичния и биотехнологичния реактор. Замърсените с ксенобиотици води постъпват първоначално във филтър за отстраняване на неразтворените вещества(2). В химичния реактор (3) се извършва при необходимост предварителна корекция на рН на постъпващите води посредством киселина или основа (10). В работния обем на каталитичния реактор (4), има 4 броя вертикално поставени

лампи (14) с пълен спектър на излъчване и полезна мощност от 25 W в работния обем. За предпазване на прекия контакт с водата лампите са поставени в кварцови тръби с диаметър. Хоризонтално в каталитичния реактор на равни разстояния по между им са поставени 5 броя прозрачни тарелки, които са перфорирани в краищата си за преминаване на водния поток.



Фигура 4.7. Лабораторна инсталация на каталитичен и биотехнологичен реактор.

Върху тези тарелки са подредени под ъгъл от 45° образците от наноструктуриран оксид. Хомогенизирането в реактора е организирано чрез външна помпа (9), създаваща възходяща посока на движение на водния поток. Посредством компресор (12) е осигурена възможността за аерация на средата в реактора. След преливник от изхода на каталитичния реактор водите постъпват в стъпалото за тяхното биотехнологично третиране. Като първоначално отново преминават през хим. реактор за корекция на pH (3), след което постъпват в аеробен биореактор с имобилизирана биомаса в работния обем. Биореактора е запълнен с подходящ насител за биомасата на микроорганизмите (зеолит).

Биореактора има водна риза за регулиране на температурата чрез външна водна баня. За да се предотврати отмиване на активна биомаса от биореактора е предвиден вертикален утаител от който чрез помпа същата се връща обратно в него. Хомогенизирането и аерацията на средата в реактора се извършва от компресор.

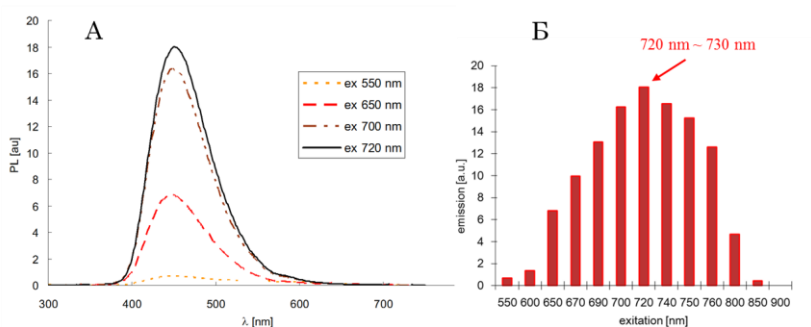
Ефективността на пречистване се доказва, чрез токсикологична оценка с *Artemia salina*. Този вид биоиндикатор се използва често за оценка на токсичността на отпадни води от текстилната индустрия. Данните доказват, че токсичността на багрилото намалява с 65 % след третиране с TiO_2 и е практически нетоксична след крайната обработка в двата реактора.

ПЕТА ЧАСТ. ХИБРИДНИ НАНОБИОМАТЕРИАЛИ, КАТО ЕНЕРГИЙНО ПРЕОБРАЗОВАТЕЛНИ СИСТЕМИ

5.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Наноструктурираните материали притежават уникални и полезни свойства, които произхождат от техните: огромна повърхност спрямо единица обем; променящи се физични свойства, зависещи от размера на наночастиците; проводникови и полупроводникови свойства, и т.н. Тези особености дават възможност на наноматериалите да се развият в нови модерни направления, като енергийно преобразователни системи с потенциални приложения за разработването на ново поколение слънчевите клетки, катализатори, термоелектрични, литиево-йонни батерии, суперкондензатори, както и като системи за съхранение на водород. Изследванията в дисертационния труд са фокусирани върху аспекти от приложението на хибридни наноматериали, като енергийно преобразователни системи в опазването на околната среда, както следва: (1) нетоксични въглеродни наночастици за трансформиране на енергията и фотоокисление на ксенобиотици, фотодетекция и генериране на зелена енергия (2) екологично съвместими метални нанокompозити за ускоряване на окислително-редукционните процеси в горивни елементи (в т.ч. и микробни-горивни клетки), (3) дизайн на опто-електрични и каталитични свойства на хибридни (неорганични-органични-биохимични) наносистеми (наномашини). Подобряването на енергийно-преобразователните свойства на наноструктурираните материали са постигнати, чрез дизайн на нови хетеронанокompозити и методи за получаване им, възможността за дотиране с други елементи и образуването на сандвичеви хибридни наноструктури.

Фотолуминисцентната ъпконверсия е атрактивно оптическо свойство на нетоксичните въглеродните квантови точки (C-dots), което им дава възможност за множество приложения. C-dots излъчват силна емисия във видимата област при облъчване с лазер (458 nm) или фемтосекундарен импулсен лазер за дву-фотонно възбуждане в близката инфра-червена област (700 ~ 800 nm). Представения по-долу дву-фотонен луминесцентен спектър демонстрира фотолуминисцентната ъпконверсия на C-dots (фиг. 5.1.A) На фигурата е представен фотолуминисцентния спектър на въглеродни квантови точки, които са възбудени чрез дълговълнова светлина (от 500 ~ 900 nm) с емисионна ъпконверсия разположена в диапазона между 350 ~ 450 nm. Интензитетът на излъчената емисия (или квантовия добив) зависи от дължината на възбуждащата вълна. Както е показано на фиг. 5.1 Б експериментално е установено, че максимална емисия е получена при възбуждане на квантовите точки с инфрачервена светлина в диапазона между 720 nm ~ 730 nm дължина на вълната.

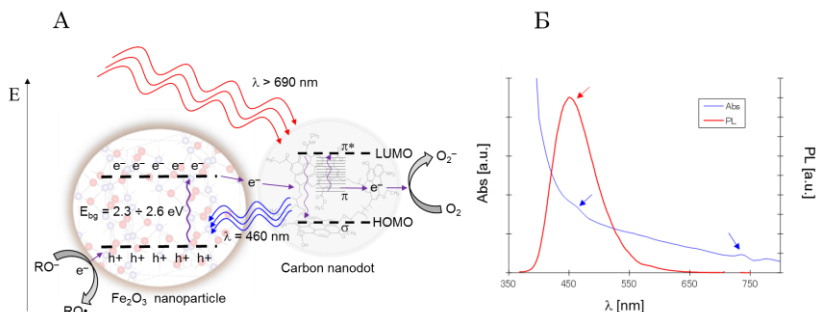


Фигура 5.1. Оптични свойства на въглеродните квантови точки. (А) Фотолуминисцентната ъпконверсия при различни дължини на вълните на възбуждане; и (Б) най-голямо количество квантов добив (максимална емисия) се постига при облъчване (възбуждане) на C-dots с инфрачервена светлина с дължина на вълната между 720 ~ 730 nm.

Тези уникални свойства на въглеродните наноточки предоставят възможността да се проектират и синтезират нови фотокатализатори (чрез комбинация на C-dots с различни полупроводникови наночастици, като Fe_2O_3 , TiO_2 , ZnO и др.). Новото при тези фотокатализатори е, че могат да се активират с видима и/или инфрачервена светлина, те са екологично съвместими и стабилни срещу фотокорозия. По-долу са представени $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{C-dots}$ нанокomпозити, които адсорбират видима и инфрачервена светлина и генерират синглетен кислород и кислороден анион радикал. При осветяване на воден разтвор, съдържащ $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{C-dots}$ с инфрачервен фемтосекундарен лазер или видима светлина (генерирана от ксенонова лампа) въглеродните квантови точки адсорбират дълговълнова светлина и излъчват късовълнова, чрез фотонна ъпконверсия, която възбужда полупроводниковата наночастица от дижелезен триоксид. Формира се екситон, т.е. двойка отрицателен електрон и положително заредена дупка (фиг. 5.2). Екситона реагира с адсорбираните окислителни или редуктори по повърхността на наночастицата (обикновено с кислорода), като по този начин се генерира кислороден радикал или синглетен кислород.

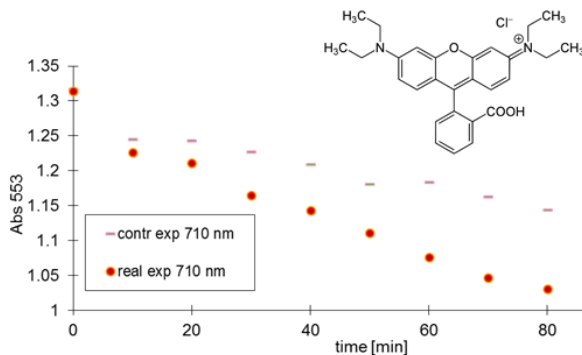
Показателно е, че когато C-dots са свързани към повърхността на Fe_2O_3 или TiO_2 (диадна структура), относителната позиция на ширината на забранената зона на въглеродната квантова точка позволява енергиен преход на фотони, сепарация на зарядите и стабилизиране на получената рекомбинация. Електроните могат да се движат свободно по проводящата мрежа от графенови фрагменти на C-dots, докато положителните дупки при на Fe_2O_3 или TiO_2 запазват дълъг живот и висока активност на фотокаталитичната

система.



Фигура 5.2. (А) Схематично илюстриране на фотолуминесцентната ъпконверсия, процесите на електронен преход и фотокаталитичен механизъм за генериране на кислороден анион радикал; и (Б) абсорбция и емисия на $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{C-dots}$ нанокомпози. Абсорбционния и емисионния пик се припокриват, което благоприятства преобразуването на енергията между двете наночастици.

Фотокаталитичната активност на хибридните $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{C-dots}$ нанокомпози е оценена с окислителното разграждане на органичното багрило родамин Б (Rhodamine B), при облъчване с инфрачервена светлина ($\sim 720 \text{ nm}$).



Фигура 5.3. Промяна на концентрацията на родамин Б при облъчване с 710 nm инфрачервена светлина в присъствието на катализатор (кръгчета) и контролен експеримент в отсъствие на катализатор (чертички).

Както е демонстрирано на фиг. 5.3. концентрацията на разтвора на багрилото се понижава (обезцветява) в продължение на 60 min при третиране с $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{C-dots}$ с концентрация 1 mg/ml. Контролният експеримент (само воден р-р на

багрило) показва, че протича също и процес на фоторазпадане на багрилото, който е значително по-бавен в отсъствие на катализатор. Процеси на фоторазграждане в присъствие на $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{C-dots}$ се регистрират и при възбуждане с видима светлина.

5.2. ВЪГЛЕРОДНИ КВАНТОВИ ТОЧКИ

Въглеродните квантови точки (C-dots) се считат за следващото поколение зелени наноматериали с многофункционални приложения (Long et al., 2012), дължащи се на техните предимства, като: високата водоразтворимост, добрата химична инертност, лесна модификация и висока устойчивост към фотоизбелване, стабилна фотолуминисценция (PL), широк емисионен спектър на възбуждане и излъчване с настройваема дължина на вълната, ниска токсичност и т.н. Въпреки многобройните публикации, докладващи обещаващи био-приложения, въглеродните наноточки са все още изправени пред две основни предизвикателства. Първото предизвикателство е ефективността на маркиране за целите на мултимодални изображения, а второто е загасващия ефект на флуоресценцията им в биологична среда или в околната среда. Тези въпроси са разгледани по-долу в дисертационния труд и е предложено решение чрез разработване на фоточувствително-конюгирани ултра-малки въглеродни квантови точки. В предложената синтетична стратегия се използва микровълновата пиролиза на подходящ въглероден източник, като лесен и възпроизводим метод за получаване на въглеродни наноточки. По време на пиролизата се въвеждат аминокислотни групи, които играят ролята на пасивиращи агенти, които повишават интензитета на флуоресценцията (т.е. квантовия добив) на получените C-dots (фиг. 5.4).

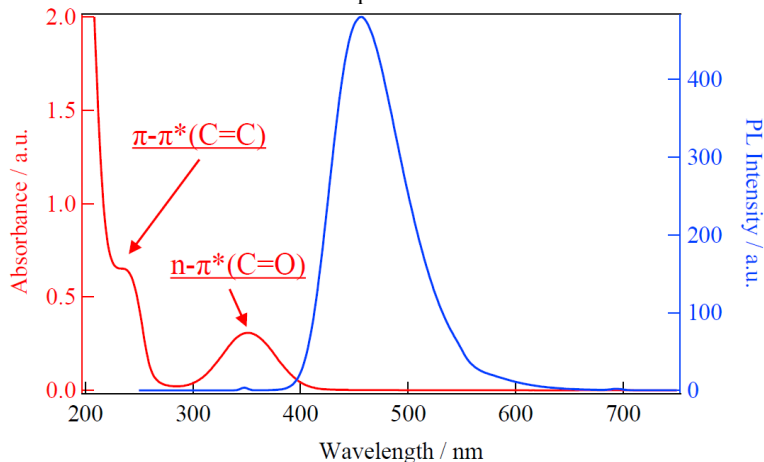
пиролиза, 3 min
600 W

лимонена киселина етилен диамин 80 % добив на въглеродни наноточки

Фигура 5. 4. Приготвяне на високо луминисцентни въглеродни наноточки чрез микровълнова пиролиза.

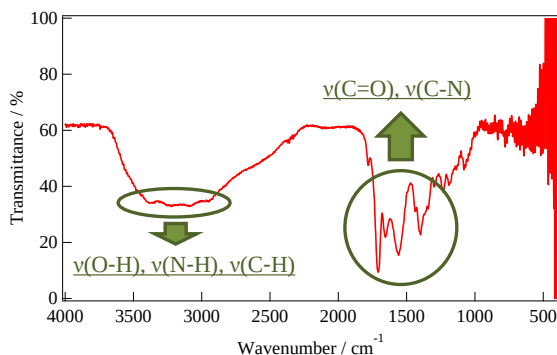
На фиг. 5.5 са представени оптичните свойства (абсорбционния и фотолуминисцентния спектър) на C-dots. В UV-VIS спектъра наночастиците проявяват два абсорбционни пика при 250 nm и 360 nm. Те се дължат на $\text{C}=\text{C}$ и $\text{C}=\text{O}$ и се наблюдават и при въглеродни квантови точки, получени чрез други

методи. Във флуоресцентния спектър въглеродните наночастици показват емисионен пик около 460 nm с ширина около 150 nm.



Фигура 5.5. Оптични свойства на високо луминисцентните въглеродни наноточки – абсорбция и фотолуминисценция.

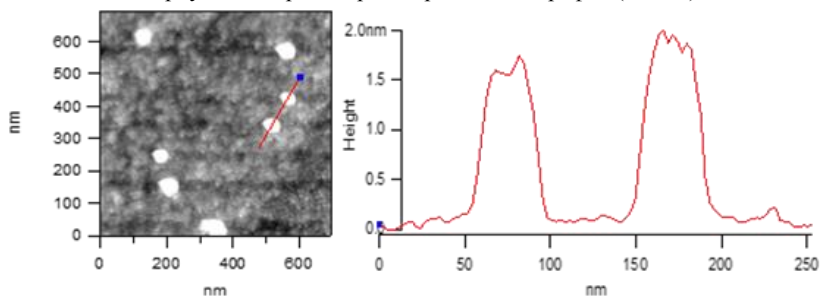
На фиг. 5.6 е показан инфрачервения спектър на наночастиците. Абсорбционните ивици при 3328 и 3217 cm^{-1} съответстват трептенето на N–H групата, а трептенията при 2975, 2927, 2854, 1460 и 1380 cm^{-1} съответстват на групите CH_3 , CH_2 , C=O , и C-N .



Фигура 5.6. Инфрачервен спектър на високо луминисцентните въглеродни наноточки.

Синия цвят на емисията е свързан с C=O и C=N функционални групи на повърхността на наночастиците, които могат да генерират богата структурна

конфигурация и въвеждат нови енергийни нива в тяхната електронна структура и следователно водят до повече възможности за електронен преход. Луминисцентните свойства на въглеродните наноточки произхождат от рекомбинацията на двойката електрон-дупка предимно от функционалните групи, съдържащи кислород. На фиг. 5.7 е показана AFM (атомно силов микроскоп) снимка на ултрамалки немодифицирани (голи) въглеродни наночастици, приготвени чрез микровълнова пиролиза. В този експеримент пробата е получена, чрез нанасяне на капка от разреден разтвор на наночастици върху силно ориентиран пиролитичен графит (HOPG).



Фигура 5. 7. Топографско изображение на въглеродни наноточки чрез атомно силов микроскоп. Височинен профил. Височинния профил показва, че вертикалните размери на C-dots са между 1.5 ~ 2.0 nm.

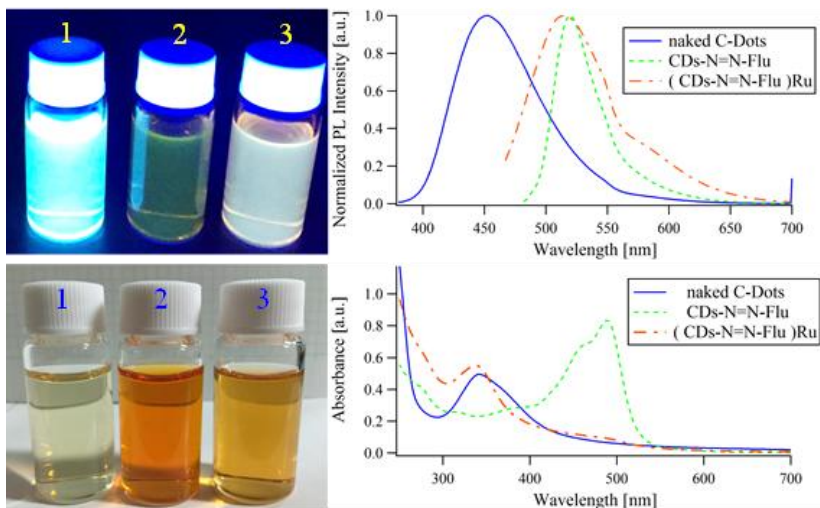
Наномасщабната височина на наночастиците може да се обясни с по-малката молекулна маса на изходните прекурсори. Абсорбционния пик на приготвените флуоресцин- $\text{N}=\text{N}-\text{CDs}$ е червено отместен в сравнение с немодифицираните наночастици. Получените метални комплекси [флуоресцин- $\text{N}=\text{N}-\text{CDs}$] Ru^{2+} показват абсорбционен максимум при същата дължина на вълната, както при немодифицираните квантови точки, но с батохромно отместване на флуоресценцията, т.е. жълт цвят и възстановен емисионен сигнал от графитените ядра на наночастиците, както е показано на фиг. 5.8. Голите квантови точки в проведените експерименти не притежават зависима от възбуждането емисия. Тяхната силна емисия произхожда от квантово-размерната графитена структура, вместо от въглерод-кислородната повърхност и квантовия добив се контролира от повърхностната химия. Голите квантови точки и [флуоресцин- $\text{N}=\text{N}-\text{CDs}$] Ru^{2+} показват едни съща характеристична абсорбция около 345–350 nm, която може да се препише на $n \rightarrow p^*$ прехода (на $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{N}$ и $-\text{N}=\text{N}-$) с опашка във видимия диапазон.

C-dot

$\rightleftharpoons$ C-dot

нефлуоресцентна наночастица

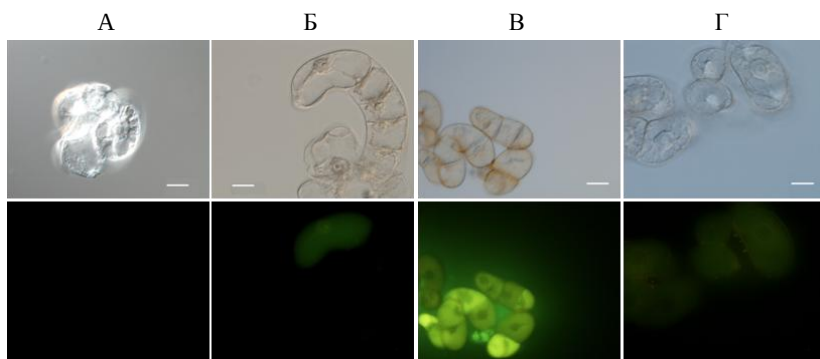
флуоресцентна наночастица



Фигура 5.8. Сравнение на оптичните свойства на въглеродни квантови точки и фоточувствително-конюгирани квантови точки.

За разлика от повечето луминесцентни квантови точки функционализираните наночастици проявяват зависима от дължината на възбуждане фотолуминисценция само при възбуждане със светлина с по-голяма от 380 nm вълна. По-специално фотолуминисцентния пик се измества от 460 към 530 nm при промяна на дължината на възбуждащата вълна от 400 до 460 nm. За разлика на това, фотолуминисцентния пик остава почти непроменен (при 460 nm) при възбуждане с вълни под 320 ÷ 400 nm. Когато промяната на дължината на възбуждане се променя от 340 до 480 nm позицията на максималния емисионен пик се измества към по-голяма дължина на вълната, от 450 до 550 nm. Това се нарича още червено отместване и този ефект е около 100 nm. Интензитетът на фотолуминисценцията се увеличава забележително, което показва ясна зависимост от дължината на светлината, използвана за възбуждане на наночастиците. Трябва да се отбележи, че тъй като дължината на възбуждане е червено отместена излъчената емисия може да достигне червена светлина и следователно би могла да се използва за визуализиране на

клетъчни ултраструктури. Тютюневи растителни BY-2 клетки, инкубирани с въглеродни наночастици изглеждат в здраво физиологично състояние, както е показано на фиг. 5.9.



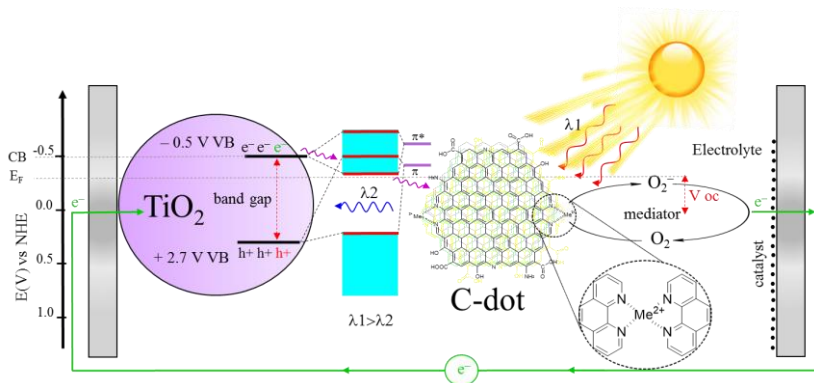
Фигура 5. 9. Светлинно микроскопско наблюдение на тютюневи BY-2 клетки: (А) контролен експеримент, (Б) голи ядра от въглеродни квантови точки, (В) флуоресцин–N=N–квантови точки и (Г) фоточувствително-конюгирани квантови точки в комплекс с метал.

BY-2 клетките оцветени с флуоресцин–N=N–CDs притежават значително посилен емисионен сигнал от тези оцветени с $[\text{флуоресцин–N=N–CDs}]\text{Ru}^{2+}$. Този ефект може да се обясни с различния квантов добив на наночастиците, който въздейства на техните емисионни сигнали във флуоресцентния микроскоп. В допълнение, при оцветяване с $[\text{флуоресцин–N=N–CDs}]\text{Ru}^{2+}$ се наблюдават някои маркирани детайли в ображдащата клетъчна стена, които не се наблюдават при маркирането с флуоресцин–N=N–CDs. Забелязва се също, че след по-дълъг инкубационен период клетъчното ядро поглъща голямо количество наночастици, вследствие на което неговата флуоресценция се повишава. Също така в случая с флуоресцин–N=N–CDs се открива и нехомогенно оцветяване на делящите се клетки. Изследванията на тези феномени са все още незавършени. Всички тези характеристики демонстрират, че въглеродните квантови точки, конюгирани с фоточувствителни молекули имат добра биосъвместимост, което ги прави подходящи кандидати в за вътреклетъчни изображения.

5.3. ЕКОЛОГИЧНО СЪВМЕСТИМИ НАНОХИБРИДНИ СИСТЕМИ ЗА ПРЕОБРАЗУВАНЕ НА ЕНЕРГИЯТА

Представена е стратегия за проучване и използване на N-покрити въглеродни квантови точки, конюгирани с фоточувствителни молекули при дизайна на слънчеви клетки, използващи титанов диоксид. Предложен е нов синергичен фоточувствителен механизъм за получаване на хибридни C-dots/TiO₂

наноматериали (фиг. 5.10).



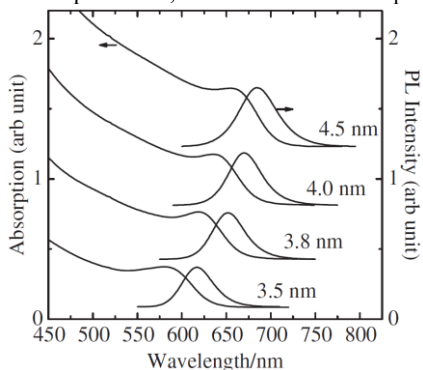
Фигура 5.10. Приложение на въглеродните квантови точки при разработване на нов дизайн на фоточувствителна фотоволтаична клетка.

Механизмът се базира на дизайна на ново поколение въглеродни квантови точки с по-висока стабилност на корозията, пренос на заряди и контролирани фотокаталитични свойства за редукция на кислород (с оптимизирана ширина на забранената зона, химичен състав и модификация на повърхностните функционални групи на наночастицата). Предимствата на въглеродните наноточки, като обещаваща алтернатива на скъпите и неустойчиви багрила, съдържащи Ru-комплекс е подобрената ефикасност при преобразуване на светлинната енергия в електрична, по-добрата способност за фотоиндуциран електронен трансфер, екологичната им съвместимост и по-ниската цена на производство. Те проявяват каталитична способност да редуцират кислорода, както е показано на фиг. 5.10 и проявяват широка абсорбционна способност, която обхваща ултравиолетовата и видимата област. Електролит, базиран на кислорода може да се използва, като алтернатива на трийодид/йодид, защото $\text{I}^{3-} / \text{I}^-$ електролита е известен, като корозивен материал за редица фоточувствителни молекули (включително и за въглеродните наноточки) и по този начин понижава фото-тока. Увеличаването на обхвата на TiO_2 може потенциално да се подобри чрез селекция на размера на по-малките C-dots или функционализиране на TiO_2 с бифункционални свързващи молекули. От проведените експерименти се установява, че наночастиците дотирани с азот притежават по-добра фотокаталитична активност от тези, в които азота отсъства. Следователно, присъствието на азот е отговорно за повишената фотокаталитична активност. Известно е, че азота може да намали работната функция на въглеродните наноматериали. Когато се възбуждат с видима светлина фотогенерираните електрони се прехвърлят по-ефективно върху въглеродните наноточки и впоследствие участват в генерирането на други частици с окислителни свойства. Като резултат частиците, съдържащи азот проявяват по-висока фотокаталитична активност от

другите наночастици.

5.4. ФОТОСТАБИЛНОСТ НА ВОДОДИСПЕРГИРУЕМИ КВАНТОВИ ТОЧКИ: ПОКРИВАНЕ С ЛИГАНДИ И КИСЛОРОД

Изследван е ефекта на различни видове покрития с лиганди върху оптичните свойства и фотостабилността на квантови точки във воден разтвор. Динамиката на фотовъзбудените състояния е изучена посредством транзитна фотолуминесцентна спектроскопия. Получените резултати показват, че интензитетът на луминесценцията на вододиспергируемите квантови точки силно се влияе от молекулярния кислород и облъчването със светлина. CdTe нанокристали са синтезирани по метода на горещата матрица и техните оптични свойства са характеризирани чрез абсорбционна и фотолуминесцентна спектроскопия, както е показано на фигура 5. 11.

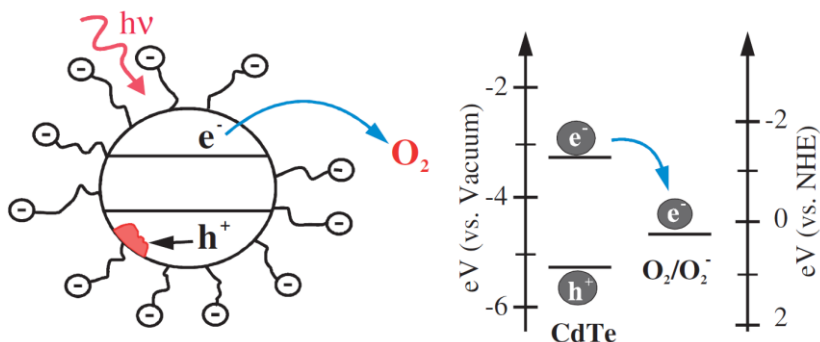


Фигура 5. 11. Абсорбционни и фотолуминесцентни спектри на CdTe квантови точки в хлороформ ($\lambda_{ex} = 450 \text{ nm}$).

Всички експерименти доказват, че фотолуминесцентното загасване зависи от концентрацията на кислорода. Изглежда, че по-големите (като DHLA лиганди с дължина около 1.2 nm) служат, като стабилен слой за защита на повърхността на наночастицата от водните молекули. Противно на DHLA, по-къси лиганди, като меркаптооцетната киселина са относително по-кратки (около 0.7 nm), при което те привличат водните молекули по-близо до повърхността на квантовите точки. Последните улесняват фотоиндуцирания електронен преход от квантовите точки към кислородните молекули. Крайната дестинация на фотоиндуцираните електрони се очаква да бъде водната молекула. Фотоиндуцирания електронен преход от квантовите точки към кислорода е енергетично предпочитан, както е показано на фиг. 5. 12.

Облъчването на квантови точки в разтвор, съдържащ кислород за кратко време предизвиква предимно повърхностни промени. Въпреки това, за по-дълги времена индуцира деградация на квантовите точки. В заключение, фотостабилността на квантовите точки във водна среда е силно зависима от

дължината на лигандите, използвани за покриване на нанокристала. Ето защо е необходим компромис между квантовия добив и фотостабилността на квантовите точки за конкретните приложения.

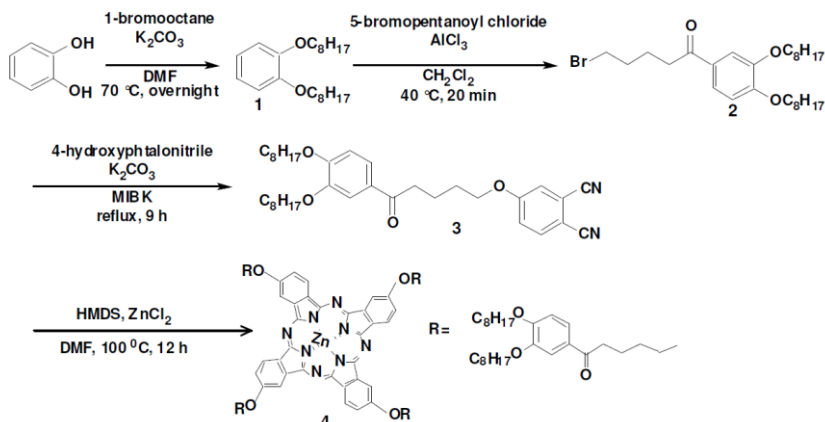


Фигура 5. 12. Фотоиндуциран електронен трансфер от полупроводниковата квантова точка към кислорода и представените енергийни нива.

5.5. ВИСОКО РАЗТВОРИМИ ФТАЛОЦИАНАТИ И ФТАЛОНИТРИЛИ, КАТО ФОТОЧУВСТВИТЕЛНИ ДОНОРНИ АГЕНТИ

Фталоцианатите (Pc) са много реактивоспособен клас хетероароматни съединения и са добре известни, като едни от най-важните класове индустриални багрила и пигментни материали. Представен е нов синтез на цинков фталоцианат (ZnPc) чрез прилагане на хексаметилдисилазановия метод. Полученото съединение е добре разтворимо в органични разтворители и може да се използва, като донорен материал за органични тънки филми във фотоволтаичните слънчеви клетки. Синтетичната стратегия на цинков фталоцианат е предложена на фигура 5.13. По-нататък допълнително е проучен хексаметилдисилазановия метод за лесен синтез на фталоцианини и третиране на нови фталонитрили с метални соли при меки условия. За преодоляване на проблема с разтворимостта, фталоцианиновата структура се модифицира с дълги алкилови вериги, които позволяват на молекулата да се разтваря в хлороформ и по този начин може да бъде използвана за нанасяне на тънкослойни покрития в органичните фотоволтаични клетки.

Поради високата си разтворимост ZnPc може да бъде използвано в органичните слънчеви клетки. Фотоволтаичните тествания на това съединение са все още в ход.



Фигура 5.13. Реакционна схема на фталоцианати.

5.6. МЕТАЛНИ КАТАЛИЗАТОРИ ЗА ГОРИВНИ КЛЕТКИ

Горивните клетки (химични и биологични) обикновено съдържат газове, като сероводород, въглеродни оксиди и др., които отравят каталитичната центрове на нанокатализаторите. Толерантността към въглероден оксид може да бъде постигната, чрез модификация на Pt/C електрокатализатор с дотиране (добавяне) с други метали (W, Sn). Модификатора може да бъде имобилизиран върху електрода или легиран в платината. В дисертационния труд са синтезирани и изпитвани сплави от наночастици Pt-Sn и подложка от $\text{Ti}_{0.7}\text{W}_{0.3}\text{O}_2$ -въглероден нанокомпозит за толерантност спрямо CO на Pt-базирани електрокатализатори. Волфрамовите оксиди значително подобряват толерантността на Pt/C катализатори към CO, но те са склонни да се разтварят в кисела среда. Стабилизирането на W се постига, чрез изовалентна субституция на волфрама в кристалната решетка на рутиловия TiO_2 , докато проводимостта и корозионното съпротивление пресича очаквания потенциал/pH. Нанокомпозити от $\text{Ti}_{0.7}\text{W}_{0.3}\text{O}_2$ -C са приготвени чрез три метода: (а) микровълнов солво-термичен синтез, (б) зол-гел синтез и (в) ниско-температурен зол-гел базиран многоетапен синтез. Предварителното образуване на рутилова фаза в присъствието на активен въглен при стайна температура при третия синтез е доказано, че е предпоставка за пълното инкорпориране на волфрама в рутилната кристална решетка на TiO_2 при редуктивно третиране при 650°C . Потвърдено е чрез XPS, че инкорпорирания

волфрам преобладава предимно в + 4 степен на окисление. Трансмисионно-електронния микроскопски анализ потвърждава равномерното разпределение на силно разпръснати платинени наночастици в 40 wt% Pt/Ti_{0.7}W_{0.3}O₂-C електрокатализ (2.3 ± 0.8 nm, а на Pt/C е 4.5 ± 1.8 nm). Повишената толерантност на електрокатализатора към СО се доказва, чрез появата на пик, съответстващ на окисление между 150 ÷ 540 mV и чрез изместване на максимума на пика за окисление на СО до 110 mV (в посока отрицателен потенциал, сравнен с Pt/C). В действителност се наблюдава производителност, дори превишаваща тази на PtRu/C. Електрохимичната дългосрочна стабилност на Pt/Ti_{0.7}W_{0.3}O₂-C и Pt/C е сравнена с цикличния потенциал между 0.05 ÷ 1.25 V за 5000 цикли: загубата на активност е около 30 % и над 70 % съответно при двата композита. Измерванията в лабораторни горивни клетки показват, че 100 ppm концентрация на СО водят до 140 mV загуба на напрежението при 1 A/cm² сила на тока в случая на Pt/Ti_{0.7}W_{0.3}O₂-C, докато при Pt/C катализатор загубата е 360 mV.

Обобщени изводи

1. Разработен е оригинален микроемулсионен метод за синтез на неорганични наночастици ядро-обвивка, които се прилагат, като трансдюсери в нанобиосензорните технологии. Чрез обема на разтвора или концентрацията на прекурсора във вътрешността на микроемулсионната капка се контролира дебелината на предпазващата обвивка около полупроводниковото ядро на квантовата точка. По този метод се получават еднакви по размер наночастици, но с различен химичен състав. Посредством тях се детектират и идентифицират специфични белтъци в клетъчни култури или тъкани. Посредством електронен микроскоп с висока разделителна способност могат да се визуализират ултрамалки нанобиосензорни репортери с размери около 1 nm. Наночастиците с различен химичен състав се разпознават в аналитичния електронен микроскоп благодарение на техния различен контраст, характеристичните им рентгенови и йонизационно електронен спектър.
2. Ултра малките ~1 nm наносензорни репортери се наблюдават и идентифицират, чрез EDX анализ на въглеродна реплика на тъкан. Този подход се използва и при микроанализа на ултамалки квантови точки. Всеки наносензорен репортер се диференцира въз основа на характеристичния му рентгенов спектър. Анализата намира приложение при определяне на субединиците на кватернерни белтъци с различни субединици, като глутаматовите рецептори. Единственото изискване за различаване на наночастиците е да имат различен химичен състав, който да бъде

диференциран чрез EDX спектрометър.

3. Предложена е оригинална нанобиотехнологична методика за разтягане, маркиране и визуализиране на едноверижна ДНК. Цитозиновата база от полимерната верига е специфично маркирана с гуаниново производно, съдържащо платина. Синтезирания биосензорен репортер е в състояние да се свърже комплементарно, чрез формиране на водородни Уотсън-Крик връзки, които притежават добра стабилност. Така маркираните едноверижни ДНК нишки може да се наблюдават в конвенционален електронен микроскоп и да се изучи тяхната секвенция.

4. 5'-Пирен-модифицирана ДНК е в състояние да се имобилизира върху хидрофобната повърхност на въглеродния филм. Тази нанобиотехнологична техника позволява да се опънат индивидуални вериги с достатъчно пространствена резолюция и е подходяща за тяхното изследване, чрез електронен микроскоп. Тя разкрива нови възможности за развитие на биоаналитичните наносензорни технологии, ДНК-секвенция и устройства, използващи нуклеинови киселини. Флуоресцентни маркери (карбоксиеозин-dUTP, еритрозин-dUTP и бодипи-dUTP) са използвани, като сензорни репортери за *in vivo* маркиране на функционална ДНК (в генома на клетката) и нейното изобразяване в корелативната микроскопия. Те не са токсични за клетката и дават възможност за дългосрочно наблюдение и изучаване на динамиката на вътреклетъчните физиологични процеси и структурните промени на генома.

5. Биотинилирана плазмидна ДНК се конюгира с полупроводникови квантови точки, чрез биологична връзка (биотин-стрептавидин). Локализирането на така получената Qdots-slr2060 в цианобактерии се установява посредством конфокален микроскоп. Изображенията дават възможност да се визуализира едновременно вътреклетъчното проследяване, инкорпориране, дистрибуцията и деградацията на маркираната плазмидна ДНК. Трансформацията на цианобактерията показва нетоксичност на флуоресцентните репортери, свързани с вектора slr2060. По този начин конюгатите Qdots-ДНК са приложим метод за проследяване на биомолекули, тъй като те произвеждат стабилен флуоресцентен сигнал, който може да се използва за продължителни проучвания. В допълнение, конюгацията не оказва влияние върху функционалността на плазмидната ДНК. Тази нанобиотехнологична техника позволява корелация между разпределението на ДНК и експресията на протеини. Qdots-ДНК конюгатите могат да бъдат използвани в бъдещи изследвания, за да се проучи по-задълбочено ефективността на различни процеси, участващи във вътреклетъчните и вътреядрените ултраструктури.

6. Биосензорните трансдусери, изградени от наноструктурни оксиди (като цинков оксид) оказват влияние върху физиологичното състояние на

анализираните микроорганизми в пробата. Методът на приготвяне на трансдюзерния филм оказва голямо влияние върху протичащите химични и физико-химични реакции между филма и анализираната проба. Филмът, получен чрез зол-гелно нанасяне инхибира анализираните микроорганизми, поради слабата адхезия и освобождаването на единични наночастици и йони в разтвора. Филми, приготвени чрез магнетронно разпръскване притежават по-добра адхезия и активират клетъчното делене. Наноструктурирания тънък филм от цинков оксид притежава известна разградимост във водна среда, особено когато е в контакт с бактериална суспензия. Ето защо неговият експлоатационен живот трябва да се вземе под внимание, когато ZnO се използва в дизайна на датчици в биосензорни технологии за анализ на водни проби.

7. Златните наночастици (диаметър ~ 20 nm) демонстрират обещаващи нанобиосензорни свойства за селективен и чувствителен анализ на ксенобиотици. Те се базират на ефекта върху повърхностния им плазмонен резонанс (SPR). Детекцията на аналити е свързана с промяната на SPR и/или цвета на разтвора, съдържащ златни наночастици, заради агрегацията на частиците и последващата локалната промяна в индекса им на пречупване. По този начин може да се откриват и анализират токсини, тежки метали (Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{2+} , Hg^{2+} и Fe^{2+}) и други замърсители в околната среда, намиращи се както във водни, така и в почвени проби. Колориметричния анализ, използващ златни наночастици не използва органични разтворители, ензимни реакции и фото-чувствителни молекули и по този начин преодолява някои от ограниченията, срещани се при повечето конвенционални методи.

8. Чрез използване на неконвенционален полимерен модификатор – етилцелулоза и изходни съединения $\text{Ti}(\text{i-OPr})_4$ и TiCl_4 се получават високо устойчиви золи. Чрез UV-VIS спектрофотометрия е доказано, че получените тънки слоеве от TiO_2 успешно обезцветяват и разграждат азо багрила (например реактивно черно 5). Установена е висока фотокаталитична активност за получените тънки слоеве от TiO_2 , която се запазва и след неколкостотин тестове. Изследването на влиянието на голям брой различни параметри върху разграждането на азо багрилата дава възможност да се намерят оптималните параметри за получаване на катализаторите. Фотокаталитичното разграждане на текстилното багрило зависи силно от вида на титановия прекурсор и от термичната обработка. Слоевете получени от прекурсор TiCl_4 показват по-висока фотокаталитична активност от тези, получени от $\text{Ti}(\text{i-OPr})_4$. Като правило филмите третирани термично са по-активни фотокатализатори, отколкото тези, които не са третирани, което се обяснява с образуване на кристална анатазна фаза със стехиометричен състав.

9. Чрез оригинален метод на спрей пиролиза от золи, съдържащи полимера

поливинилов алкохол (PVA) се получават образци от нанометричен ZnO с висока фотокаталитична активност при разлагането на багрила. Установено е, че слоевете от ZnO, получени от золи съдържащи полимера, имат развита повърхностна структура – формират се ганглии-което повишава каталитичната им активност. Слоевете от ZnO, получени от $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ разграждат по-бързо багрилото, отколкото слоевете, получени от $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Чрез горимия гел-метод са получени наночастици от ZnO (около 10-20 nm диаметър) в ZnO-TiO₂ система. Получените прахове са с добри фотокаталитични свойства при обезцветяване на азо багрила. Образци, които съдържат по-големи количества от ZnO притежават по-висока фотокаталитична активност. Предимството на микровълново третиране на оксидни филми води до по-голяма специфична повърхност с много по-малки кристали и множество частици, разпръснати върху повърхността за разлика от конвенционания метод на термична обработка. Микровълновата обработка също съкращава значително времето и разхода на енергия при провеждане на процеса зол-гел и така може да бъде ефективен и удобен начин за получаване на слоеве и многослойни структури с висока фотокаталитична активност.

10. Моделни разтвори на азо-багрила се обезцветяват при прилагане на наноструктурирани оксиди от TiO₂ ZnO и магнитни наночастици от FeO(OH). В извършените експерименти TiO₂ притежава по-добра фотокаталитична ефективност от ZnO. Освен това крайните продукти получени при третиране на багрилото с TiO₂ притежават по-ниска токсичност. Титановия оксид разрушава багрилото по-ефективно при ниски стойности на pH (между 2.5-3.0), където цинковия оксид се разтваря. Получени са композити на основата на наноразмерен TiO₂, нанесен на активен въглен обработени при две различни температури. Доказано е, че образецът отгрят при 680 °C проявява по-висока фотокаталитична активност под действие на UV-A, UV-C и видима светлина за разграждане на азо багрило. ZnO се проявява като катализатор в неутралния диапазон. При редица азо-багрила протича по-скоро адсорбция отколкото фотокатализа върху повърхността на ZnO. Най-ефективни при обезцветяване на азо багрила са оказаха магнитните наночастици. Причината за това е тяхната висока повърхност и реактивоспособност в разтвора. Получените при редукацията ароматни амини притежават висока токсичност, което ограничава в частично приложение на FeO(OH) наночастиците.

11. Предложен е нов дизайн на микробна горивна клетка базирана на процеса на дисимилативна микробна сулфатредукция. Установена е скоростта на микробна сулфатредукция при различни контактни времена на хранения разтвор и е проследена динамиката на основните технологични параметри. Предложена е технологична възможност за усвояване на органиката получена при фотохимичното окисление на азо-багрила и отстраняване от анолита на

получената елементарна сяра при което електрохимичните параметри на МГК остават стабилни. При горивните елементи (в т.ч. и микробните горивни клетки) ефективността на процесите значително се повишава, чрез въвеждане на катализатори в анодния и респективно катодния електрод. Традиционните катализатори са изградени от благородни метали, но те са трудно приложими, заради високата си цена и чувствителността им към някои разтворими газове, като сероводород, въглероден оксид и др. В дисертационния труд са предложени наночастици, изградени от сплави с брутна формула $Pt/Ti_{0.7}W_{0.3}O_2-C$, за които е доказано, че проявяват толерантност предимно към въглеродния оксид. Те могат да се нанесат електрохимично върху анодния електрод.

12. Разработени са флуоресцентни въглеродни квантови точки, които са експлоатирани, като нанобиосензори, екологично съвместими наносистеми за превръщане на енергията и подходящи биомаркери за изобразяване на биологични процеси и потенциална диагностика. Получен е синтез за приготвяне на конюгирани въглеродни наноточки с фоточувствителни молекули (флуоресцентни багрила и др.), чрез образуване на хелатен комплекс с метален йон. Получените модифицирани наночастици притежават емисия във видимата област и тя зависи от дължината на светлината, с която се облъчват (възбуждат). Жълто-излъчващи [флуоресцеин- $N=N$ -CDs] Ru^{2+} проявяват максимална абсорбция, като при немодифицираните въглеродни наноточки, но не съдържат смес от синьо и синьо-зелено излъчващи наночастици. Техният среден размер е около 3 nm и следователно лесно могат да навлязат във вътрешността на клетъчни култури, чрез ендцитоза. По този начин те визуализират клетъчните ултраструктури в ярко жълта емисия във флуоресцентния микроскоп. Флуоресцентните микроскопски изображения разкриват, че функционализираните въглеродни наночастици не са токсични за *in vivo* прилагане в клетъчни култури при дози, които са необходими за изучавания на маркираните клетки. Тези въглерод-базирани нетоксични флуоресцентни наномаркери са мощна алтернатива на токсичните кадмиево-базирани квантови точки. Като нови флуоресцентни сонди предимствата на конюгираните въглеродни наночастици включват високата водоразтворимост, контролирания цвят на емисията, добрата фотостабилност във физиологичния диапазон на рН и хранителни среди. Това ги прави подходящи кандидати, като маркери за прилагане в областта на био-изобразяване.

13. При цялостна характеристика на въглеродните наночастици се установява, че те притежават ядро, изградено от sp^2 -хибридизирани въглеродни атоми. Ядрото е покрито с хидроксилни, карбонилни, карбоксилни и аминоксидни групи. Наночастиците могат да участват в комплексни реакции с метални соли и получените комплексни съединения проявяват каталитични свойства при редукцията на кислород. Чрез функционалните си групи наночастиците лесно

се имобилизират върху полупроводникови наночастици от титанов диоксид или железен оксид. По този начин C-dots се използват, като фото-чувствителни молекули в дизайна на фотоволтаични слънчеви клетки или фотокатализатори, използващи видима или ИЧ светлина. Този ефект е благодарение на фотолуминисцентната ъпконверсия. Получените нанокомпозити C-dots/TiO₂ проявяват синергичен ефект с повишена фотокаталитична активност, която е по-голяма в сравнение с единичните наночастици. Тези хетеро нанокомпозити са изградени от вещества, които лесно се усвояват в природата и не представляват сериозен замърсител за околната среда. С успех може да се използват при фотоокислението и минерализирането на различни видове органични ксенобиотици. В дисертационния труд фотоокислението е демонстрирано с азо-багрила.

14. Полупроводниковите квантови точки са използвани в хибидни системи за преобразуване на енергията. Те са чувствителни към окисление с кислород, което се отразява върху експлоатационните им качества. Когато са облъчени със светлина за кратко време кислорода предизвиква предимно повърхностни промени. При по-дълго облъчване обаче се наблюдава индуцирано разграждане на квантовите точки. Фотостабилността на квантовите точки във водна среда е силно зависимо от дължината и химичната природа на лигандите, с които е стабилизирани нанокристалите. Наночастици покрити с меркаптооцетна киселина притежават висок квантов добив, но по-ниска фотостабилност. За разлика от меркаптооцетната киселина, наночастици функционализирани с дихидролипоева киселина проявяват по-нисък квантов добив, но по-висока фотостабилност. Ето защо е необходим компромис между квантовия добив и фотостабилността на квантовите точки за конкретните фото-енергийни приложения.

15. Синтезирано е ново органометално съединение (цинков фталоцианин), което може да се използва с успех във фотоволтаичните преобразователни технологии. При ниски концентрации цинкът не е особено токсичен елемент за околната среда. Поради добрата си разтворимост цинковия фталоцианин може да се използва за получаване на тънки филми върху наноструктурирани композити в слънчевите клетки.

Заключение

Наноматериалите притежават уникални свойства, които могат да влязат в употреба при решаване на множество проблеми, свързани с различни аспекти на опазване на околната среда. Например, класическите химични инструментални методи за анализи не са подходящи от практическа гледна точка за идентификацията, анализа и мониторинга на множество

ксенобиотиците в околната среда. Причината е, че инструменталните методи използват проби, които трябва да съдържат химически чисти вещества в количества, които в много случаи са значително по-големи от замърсителите в околната среда (концентрациите им често са в порядъка на μg , ng или следи). В допълнение, инструменталните методи изискват високо-квалифициран персонал и сравнително скъпи консумативи за работа. Те могат в голяма степен да бъдат изместени в екологичните практики, чрез използване на мощни биосензорни технологии, които са в състояние да анализират сложни вещества с много ниски концентрации и при това в смес от други субстанции в пробата. Често не се изисква предварителна обработка на взетите от околната среда проби и дори могат да се анализират непосредствено на дадения обект. Повечето от съвременните биосензори използват електроди, които се потапят в пробата и извършват дадения анализ. При този подход могат да се откриват и идентифицират целеви съединения във водни разтвори, но не може да се установи тяхната концентрация в живи клетки или тъканите на организми. Последното е необходимо при изучаване на разпространението на различни видове замърсители по хранителните вериги в даденото местообитание. Тези изследвания са обект на изучаване на екотоксикологията. Чрез разработените в дисертацията биосензорни репортери е възможно да се анализира концентрацията на някои замърсители (тежки метали, неметали и други ксенобиотици) в рамките на живата клетка. Освен замърсители нанобиосензорните репортери могат да откриват специфични биологични макромолекули (мембранни протеини, специфични белтъци и антитела), както и да проследяват разпространението на плазмидни нуклеинови киселини и други химични или биологични агенти в клетъчни култури или тъкани. Възможно е и да се извърши мониторинг на вътреклетъчни физиологични процеси. На базата на специфичното биологично разпознаване би могло да се извърши също молекулна секвенция на природни биополимери. Металните наночастици нямат флуоресцентни свойства. Детекцията на неорганични и някои органични замърсители може да се установи по изместването на пика ($\square_{\text{max}}$) на техния повърхностен плазмонен резонанс (например при златните и сребърните наночастици). Този анализ би бил полезен при бързия мониторинг на замърсени с тежки метали проби. Той изисква освен металните наносензори също и лесно достъпни фотоизмервателни уреди, като спектрофотометри. За да се придадат флуоресцентни свойства на металните наночастици е необходимо тяхната повърхност да се модифицира с молекули на флуоресцентни багрила или биомолекули, които вече са модифицирани с такива багрила. Тогава металните наночастици се оказват много полезни биосензорни репортери за детекцията на множество целеви молекули, чрез използване на корелативната (светлинна и електронна) микроскопия.

Наноматериалите могат значително да подобрят чувствителността на биосензорите. Това се постига, чрез покриване на тънки наноструктурирани филми (например цинков оксид) върху биосензорния трансдюсер. Този подход позволява и модифицирането на биосензора с по-разнообразен биоматериал, тъй като ZnO е биосъвместим, ниско токсичен и притежава изоелектрична точка близо до неутралния пункт. Според някои очаквания в литературата цинковия оксид е подходящ материал за детекция на биологични агенти и патогенни микроорганизми във въздушни среди.

Магнитните наночастици са изградени от ядро, съставено от нулево валентно желязо и обвивка от желязни оксиди. Те демонстрират магнетизъм само при контакт с външно магнитно поле. Това е много важно, защото без външното магнитно поле наночастиците са добре суспендирани и не агрегират по между си. Проявяват силно редукионни свойства. Могат да редуцират и разрушават множество органични ксенобиотици, както и тежките метали - силни окислителни (намиращи се след желязото в реда на относителната активност на металите). Когато са разпръснати в разтвор поради малките си размери имат много голяма обща площ. Така малко количество магнитни наночастици може да се използва за извличане на целеви и благородни метали от концентрати или отпадни технологични разтвори.

Наноструктурираните полупроводникови оксиди (ZnO и TiO₂) имат окислителни фотокаталитични свойства. От тях може да се приготвят тънки филми, които поглъщат ултравиолетова и част от спектъра на видимата светлина и генерират множество окси-, хидрокси и пероксидни радикали в разтвор. По този начин всяка органика се окислява и деструктурира. Реакциите на окисление са сложни а реакционните пътища разнообразни, но винаги се получава смес от силно окислени продукти (например алкохоли и карбоксилни киселини). Крайният етап на окислението е пълно минерализиране до въглероден диоксид и вода, но голяма част от ксенобиотиците представляват ароматни съединения и трудно се подават на пълна минерализация. Процесът на фотокатализа може да се съчетае с биотехнологично пречистване и крайно минерализиране на изходящите органични ксенобиотици. В този случай микробиологичните популации в биофилма от активни утайки разполагат с широка гама от ензимни системи, посредством които да се постигне пълното очистиране на отпадната вода. Те използват окислената органика (смес от алкохоли и карбоксилни киселини), като хранителен субстрат. Крайния екологично приложен резултат от този смесен нано-биотехнологичен подход може да се докаже, чрез стандартизирани екотоксикологични тестове. При подходящи анаеробни условия биофилма се превръща в електроактивен. Тогава микроорганизмите могат да превръщат химичната енергия, заложена в

химичните връзки на органиката в електрична. Този процес значително се ускорява, ако в електродите се имобилизират наночастици от метални сплави, играещи ролята на катализатори за редуциране на кислорода.

Въглеродните квантови точки са нов вид наноматериали, за които е известно, че не са токсични, проявяват флуоресцентни свойства, могат да се използват, като биосензорни репортери за детекция на дадени метални катиони и неметални аниони, както и pH във вътреклетъчни среди. Те са фоторезистентни и имат потенциала да изместат токсичните органични багрила, използвани във фотоволтаичните клетки. Притежават фотолуминисцентна ъпконверсия при облъчване с видима и инфрачервена светлина. По този начин, работейки в синергизъм с полупроводников титанов диоксид или дижелезен триоксид може да се използват, като ефективни фотокатализатори или хибридни енергийно-преобразователни наносистеми за трансформиране на слънчевата енергия в зелена възобновяема електроенергия.

Научно и научно-приложни приноси

1. РАЗРАБОТЕНИ СА НАНОБИОСЕНЗОРНИ РЕПОРТЕРИ ЗА ДЕТЕКЦИЯ И ПРОСЛЕДЯВАНЕ НА ЦЕЛЕВИ МОЛЕКУЛИ

Разработени са еднакви по размер флуоресцентни наночастици с диаметър между $3 \div 5$ nm, които са използвани с успех при детекцията и проследяването на целеви молекули. Наночастиците могат да имат неорганичен химичен състав - полупроводникови флуоресцентни квантови точки от ZnS, CdS, CdSe/ZnS & CdS/ZnS ядро-обвивка и др., метални наночастици от Au, Pt, Ag и др., метални сулфиди Cr_2S_3 & V_2S_3 , които са с по-малка молекулна маса и по-висока детектираща способност. Към органичните наночастици спадат флуоресцентните въглеродни наноточки, които са сравнително по-ниско токсични от неорганичните, тъй като са получени природни съединения (захари). Металните наночастици не притежават флуоресцентни свойства, но могат да бъдат модифицирани с флуоресцентни молекули. Изброените наночастици са покрити с органичен слой от лиганди, съдържащ карбоксилни или аминокиселини (меркаптооцетна киселина, DHLA и др.). По този начин те са водоразтворими и могат да се конюгират с биологично активни молекули (биоматериал), като авидин, стрептавидин, вторични антитела, биотин и други. Наночастицата играе роля на трансдюсер, а биоматериала се използва за специфично разпознаване на анализираното вещество (тежки метали, ксенобиотици, мембранни протеини, нуклеинови киселини и др.). Полученият сигнал е оптичен и лесно може да бъде уловен от детектор (CCD-камера и др.),

който го трансформира в електричен или го представя на записващо устройство. Ултрамалки метални наночастици (например Au & Pt) с диаметър около 1 nm, конюгирани с вторично антителио IgG бяха използвани с успех при детекцията на мембранни кватернерни белтъци. Посочените нанобиосензорни репортери бяха използвани с успех в корелативната (светлинна и електронна) микроскопия.

2. СИНТЕЗИРАНИ СА ФЛУОРЕСЦЕНТНИ СЕНЗОРНИ БАГРИЛА ЗА КОРЕЛАТИВНА МИКРОСКОПСКА ДЕТЕКЦИЯ НА ЦЕЛЕВИ МОЛЕКУЛИ И ИЗОБРАЯВАНЕ НА УЛТРАКЛЕТЪЧНИ СТРУКТУРИ

Синтезирани са следните флуоресцентни маркери: 5-карбоксиеозин-аминоалил-деокси УТФ, бодипи-деоксиУТФ и еритрозин-деоксиУТФ. Те са подходящи флуоресцентни сензорни багрила за корелативна детекция във светлинния и електронен микроскоп на биологични макромолекули (в случая приложението им е демонстрирано с *in vivo* маркиране на ДНК). Те са ниско токсични за клетките и позволяват дългосрочно наблюдаване вътреклетъчните физиологични процеси. Чрез този метод могат да се идентифицират и изучават структурните промени на нуклеиновите киселини при ниско (флуоресцентно) и високо (електронно) микроскопско ниво. На електронно-микроскопските изображения маркираната ДНК е с по-висок контраст в сравнение с природната. Изучаваните образци могат да се изследват в биологичен трансмисионен електронен микроскоп с висока резолюция, като се използва техниката електронно-спектроскопско изобразяване. По този начин се идентифицират динамичните и ултраструктурните промени при синтеза на ДНК, които са много близки до живото физиологично състояние на клетките.

3. УСТАНОВЕНО Е ВЛИЯНИЕ НА НАНОСТРУКТУРИРАНИЯ БИОСЕНЗОРЕН ТРАНСДЮСЕР ВЪРХУ ФИЗИОЛОГИЧНОТО СЪСТОЯНИЕ НА АНАЛИЗИРАНИТЕ МИКРООРГАНИЗМИ

Установено е че наноструктурирания цинков оксид, който се използва в дизайна на биосензорния трансдюсер оказва влияние върху физиологичното състояние на анализирания микроорганизми. Това влияние се дължи на разтварянето на цинкови йони в анализирания проба или преминаването на наночастици от твърдата във водната фаза на разтвора. В различните случаи влиянието е противоположно, например при разтваряне на малки количества цинкови йони (следи) се стимулира растежа и активността на бактериите; обратно при преминаване на наночастици в разтвора се наблюдава токсичен ефект, дължащ се на разрушаване на клетъчната мембрана. Метода за приготвяне на наноструктурираните филми са отговорни за тяхната адхезия и

по-нататъшното влияние върху анализираните микроорганизми. Филмите приготвени, чрез зол-гел метода притежават по-ниска адхезия и проявяват инхибиращ ефект. Филмите приготвени, чрез магнетронното разпръскване са по-стабилни и оказват активиращ ефект. Чрез микроскопски и химични анализи е установено, че наноструктурираните филми от цинков оксид притежават известна разтворимост във вода, която трябва да се има предвид при дизайна на биосензора и отчитане на експлоатационния му живот, както и при правилно интерпретиране на получените данни.

4. РАЗВИТИ СА НАНОБИОТЕХНОЛОГИЧНИ МЕТОДИКИ ЗА МАНИПУЛИРАНЕ НА ОЛИГОНУКЛЕОТИДИ И ДНК МАКРОМОЛЕКУЛИ (ИМОБИЛИЗИРАНЕ, РАЗТЯГАНЕ И ОПЪВАНЕ ВЪРХУ ХИДРОФОБНА ТРАНСДЮСЕРНА ПОДЛОЖКА

Разработен е метод за имобилизиране (закотвяне) на отрицателно заредената ДНК молекула към хидрофобната повърхност на въглеродния филм. Този метод може да намери приложение в биосензорните технологии, където се използват графитени електроди, като трансдусери. За да се постигне имобилизацията към 5'-края на ДНК олигонуклеотида е прикачена пиреновата група, като котвен елемент. Чрез нея ДНК може да се доближи до въглеродната повърхност и да се адсорбира, чрез хидрофобни π -взаимодействия. По този начин се получават индивидуални опънати двойноверижни нуклеинови с достатъчно пространствена резолюция за микроскопски анализ. Едноверижни нуклеинови киселини също могат да се разтегнат и имобилизират върху хидрофобен въглероден филм. За целта едноверижни ДНК нишки се суспендират в буферен разтвор, съдържащ детергент и след това се инжектират в капка, съдържаща вода и формамид. ДНК молекулите се разстилат и разтягат по повърхността на капката. По този начин ако повърхността на капката се допре до графитена подложка молекулите се прикрепват към повърхността на филма. Цитозиновата азотна база може да се маркира комплементарно с производно на гуанина, съдържащо платинен атом, който е високо-контрастен в електронния микроскоп. По този начин секвенцията на маркираната ДНК може да се анализира, чрез използване на конвенционален сканиращ трансмисионен електронен микроскоп с висока разделителна способност.

5. ПРИГОТВЕНИ СА МАГНИТНИ НАНОЧАСТИЦИ ЗА АДСОРБЦИЯ, РЕДУКЦИЯ И ДЕГРАДАЦИЯ НА ОРГАНИЧНИ И НЕОРГАНИЧНИ КСЕНОБИОТИЦИ

Магнитните наночастици, изградени от ядро от нулево валентно желязо и обвивка от железни оксиди са ефективни при извличане на тежки метали в

отпадни киселинно-руднични води, чрез адсорбционна реакция протичаща на повърхността им. Редукционната реакция протича в рамките на минути контактно време и отстраняването на наночастиците от разтвора се извършва чрез прилагане на външно магнитно поле (при експлоатация в магнитен реактор). Магнитните наночастици разрушават редица видове ксенобиотици, в т.ч. и биологично резистентните азо-багрила. Обезцветяването на разтвора протича по-бързо, отколкото при фотокаталитичното окисление. Получените продукти от разграждането на азот-съдържащи ксенобиотици често са ароматни амини, които са токсични за някои биоиндикаторни микроорганизми.

6. РАЗРАБОТЕНИ СА КАТАЛИТИЧНИ НАНОСТРУКТУРИРАНИ ОКСИДИ И ЕНЗИМНИ СИСТЕМИ ЗА ФОТООКИСЛЕНИЕ И МИНЕРАЛИЗИРАНЕ НА ОРГАНИЧНИ КСЕНОБИОТИЦИ

Фотокаталитичната ефективност на полупроводникови наноструктурирани оксиди зависи, както от метода на получаване, така и от химичния състав и морфологията на субстрата, върху който са нанесени (алуминиевата подложка е за предпочитане пред стъклената). От практическа гледна точка титановия диоксид е по-добър фотокатализатор, отколкото цинковия оксид, защото той е по-устойчив към промени на рН в реакционната среда по време на фотоокислението и разграждането на ксенобиотиците. Дотирането с други химични елементи във фазата на TiO_2 може да повиши, както каталитичната ефективност на материала, така и да се измести абсорбираната за фотореакцията светлина във видимата област. Това е важно с оглед дизайна на фотокаталитични реактори, които консумират слънчева светлина и по този начин се намаляват енергийните разходи, съпътстващи използването на UV-лампи. При деградиране на органични ксенобиотици се получава смес от ненаситени алкохоли и карбоксилни киселини. Множество стандартизирани токсикологични тестове с редица биоиндикаторни микроорганизми доказват, че получената смес от разпадни окислени продукти притежава по-ниска токсичност от изходния материал. От тази гледна точка титановия диоксид е екологично-съвместим катализатор, който може да се използва в пилотни и промишлени фотокаталитични реактори. Установено е, че по време на фотоокислението на азо багрила най-бързо се разрушава азо групата, а най-устойчиви на фотоокисление остават ароматните производни. Сместа от окислени продукти се усвоява от микробиологични популации в активни утайки за разлика от изходните ксенобиотици, които често се адсорбират във флокулата. Микроорганизмите притежават многообразни ензимни системи за пълно минерализиране на окислената органика. Процесът на минерализация е сравнително по-бавен от фотокатализата.

7. ОТКРИТИ СА ЕКОЛОГО СЪВМЕСТИМИ ЕНЕРГИЙНО ПРЕОБРАЗОВАТЕЛНИ ХИБРИДНИ СИСТЕМИ ОТ ДИАДНИ НАНОКОМПОЗИТИ, СЪДЪРЖАЩИ ВЪГЛЕРОДНИ НАНОЧАСТИЦИ И ПОЛУПРОВОДНИКОВИ КВАНТОВИ ТОЧКИ

Въглеродните наночастици са подходящи за разработването на нанобиосензорни репортери, тъй като са ниско токсични и фоторезистентни. Те могат да детектират присъствието на някои тежки метални катиони и неметални аниони в разтвор, както и промени в рН на средата. Чрез тях може да се визуализират вътреклетъчни физиологични процеси. Те притежават фотолуминисцентна ъпконверсия, благодарения на която в синергизъм с полупроводникова квантова точка катализират редукцията на кислород или превръщането на триплетен кислород в синглетен. Тази способност се повишава при изграждане на каталитични центрове по повърхността на наночастицата, благодарение на комплексобразуващи реакции. Тези уникални свойства намират практически приложения при дизайна на ново поколение фотокатализатори, използващи видима и инфрачервена светлина; за третирането на патогенни микроорганизми; в разработването на фотоволтаични слънчеви клетки, в които органичните багрила са заменени с въглеродни квантови точки и др.

Литература, посочена в автореферата на дисертационния труд

- Hristova, R., Alexandrov, S., Calev, D., Zhelyazkova, B. Guidance of Quantitative Analysis, St. Kl. Ohridski Edition, Sofia, 2003.
- Long, Y.-M., Zhou, C.-H., Zhang, Z.-L., Tian, Z.-Q., Bao, L., Lin, Y. & Pang, D.-W. 2012. Shifting and non – shifting fluorescence emitted by carbon nanodots. *J. Mater. Chem.* 22: 5917–5920.
- Loukanov, A., Angelov, A., Plochev, S., Bratkova, S., Nikolova, K., Nakabayashi, S. 2010. Frontiers of the heavy metals detection in acid mine water: synergy of the advanced Nano-Bio-Sensor technology, *Universitaria Simpro* (2010) 87-92.
- Loukanov, A., Angelov, A., Plochev, S., Bratkova, S., Nikolova, K., Nakabayashi, S. 2010. Gold nanoparticles as colorimetric sensor for iron ions detection in acid mine waters, *Analele Universitatii "Constantin Brancisnu" din Targu Jiu* 3, 275-284.
- Liz-Marzan, L. M. 2004. Nanometals: formation and color. *Materials Today* 7 (2), 26-31.
- Sadtler, B., Wei, A. 2002. Spherical ensembles of gold nanoparticles on silica: electrostatic and size effects. *Chem. Commun.* 15, 1604-1605.

Приложимост на резултатите в учебния процес

Като пряк резултат от разработването на дисертационния труд е: (1) създаването на учебно-изследователска лаборатория по инженерна нанобиотехнология в катедрата, (2) внедряване на нови лабораторни упражнения по дисциплините Биохимия, Генетика, Ензимология, Химия на околната среда, Биосензори и биоиндикатори и Екотоксикология, (3) издаване на три основни учебника за студентите от специалностите “Биотехнология”, ОКС „Бакалавър” и „Магистър” и “Екология и опазване на околната среда” ОКС „Магистър”. Учебниците са съответно Експериментална биохимия – 2013, Химия на околната среда – 2015 и Биосензори и биоиндикатори – 2016 г. (4) Основните принципи, методи и технологии, представени в дисертационния труд са включени в учебните програми и обучението на студенти от споменатите специалности. (5) Създадени е билатерална програма за академичен обмен между Минно-геоложкия университет “Св. Иван Рилски” – България и Университета Сайтама – Япония, и (6) обучение на двама редовни докторанти в катедра “Инженерна геология” в МГУ и (7) лекционни курсове по нанобиотехнология и наномедицина в Университета Сайтама – Япония.

Научни публикации по дисертационния труд

A. Статии в реферирани списания с импакт фактор:

1. **Alexandre Loukanov**, Ryota Sekiya, Midori Yoshikawa, Yuji Moriyasu, Seiichiro Nakabayashi, Photosensitizer-conjugated ultrasmall nanodots as multifunctional fluorescent probes for bioimaging, *Journal of Physical Chemistry* (2016). ISSN: 1932-7455 Impact Factor: 4.772
2. **Alexandre Loukanov**, Ivan Nikolov, Svetlin Toshev, Polina Mladenova, Functional electron spectroscopic imaging of boron-labeled Escherichia coli, *Microscopy Research and Technique* (2017). ISSN: 1097-0029, Impact Factor: 1.850.
3. **Alexandre Loukanov**, Saim Emin, Biotinylated vanadium and chromium sulfide nanoparticles as probes for co-localization of membrane proteins, *Microscopy Research and Technique* (2016). ISSN: 1097-0029, Impact Factor: 1.850.
4. **Alexandre Loukanov**, Vesselin Zhelyazkov, Yukako Hihara, Seiichiro Nakabayashi, Intracellular imaging of Qdots-labeled DNA in cyanobacteria, *Microscopy Research and Technique* **79** (2016) 447-452. ISSN: 1097-0029, Impact Factor: 1.850.

5. **Alexandre Loukanov**, Ivan Nikolov, Anatoly Angelov, Carbon nanodots as environmental friendly photosensitizers in the solar cells technology. (2017). In progress.
6. **Alexandre Loukanov**, Chavdar Filipov, Polina Mladenova, Svetlin Toshev, Saim Emin, Electron microscopic visualization of complementary labeled DNA with platinum-containing guanine derivative, *Microscopy Research and Technique* **79** (2016) 280-284. ISSN: 1097-0029, Impact Factor: 1.850.
7. Svetla Nikolova, Vasil Yablanski, Evgeni Vlaev, Luben Stokov, Alexey Savov, Ivo Kremenski, **Alexandre Loukanov**, *Spine* **41** (9), (2016) 785-791. Impact Factor: 2.300
8. **Alexandre Loukanov**, Chavdar Filipov, Marta Lecheva, Saim Emin, Immobilization and stretching of 5'-pyrene-terminated DNA on carbon film deposited on electron microscope grid, *Microscopy Research and Technique* **78** (2015) 994-1000. ISSN: 1097-0029, Impact Factor: 1.850.
9. **Alexandre Loukanov**, Chavdar Filipov, Violeta Valcheva, Marta Lecheva, Saim Emin, Growth stimulation of *Bacillus cereus* and *Pseudomonas putida* using nanostructured ZnO thin film as transducer element, *J Nanopart Res* **17** (2015) 196. ISSN: 1572-896X, Impact Factor: 2.278.
10. R. Gegova, Y. Dimitriev, A. Bachvarova-Nedelcheva, R. Iordanova, **A. Loukanov**, Tz. Iliev, Combustion gel method for synthesis of nanosized ZnO/TiO₂ powders, *Journal of Chemical Technology and Metallurgy* **48** (2013) 147-153, ISSN: 1311-7629, Impact Factor: 0.061.
11. Albena D. Bachvarova-Nedelcheva, Reni S. Iordanova, Angelina M. Stoyanova, Radka D. Gegova, Yanko B. Dimitriev, **Alexandre R. Loukanov**, Photocatalytic properties of ZnO/TiO₂ powders obtained via combustion gel method, *Central European Journal of Chemistry* **11** (2013) 364-370, ISSN: 1644-3624, Impact Factor: 1.073.
12. Anatoliy Angelov, Svetlana Bratkova, **Alexandre Loukanov**, Microbial fuel cell based on electroactive sulfate-reducing biofilm, *Energy Conversion and Management* **67**, (2013) 283-286, ISSN: 0196-8904, Impact factor: 2.640.
13. V Blaskov, M Shipochka, I Stambolova, S Vassilev, A Eliyas, P Stefanov and **A Loukanov**, Influence of titanium precursor on the photocatalytic properties of TiO₂ sprayed films under visible light, *Journal of Physics: Conference Series, IOP science*, V **398** (2012), 1-6. ISSN 1742-6588, Impact Factor: 0.718.
14. **Alexandre Loukanov**, Saim Emin, Quantum dots for detection, identification and tracking of single biomolecules in tissue and cells, *Intelligent Nanomaterials, Scrivener Publishing LLC* (2012) 649-677, ISBN: 978-0-470-93879-9
15. I. Stambolova, V. Blaskov, S. Vassilev, M. Shipochka, **A. Loukanov**, Effect of substrate type, dopant and thermal treatment on physicochemical properties of

- TiO₂-SnO₂ sol gel films, *Bull. Mater. Sci.*, Vol. 35 No 4 (2012) 645-649. ISSN: 0973-7669, Impact Factor: 0.880.
16. Irina Stambolova, Maria Shipochka, Vladimir Blaskov, **Alexandre Loukanov**, Sasho Vassilev, Sprayed nanostructured TiO₂ films for efficient photocatalytic degradation of textile azo dye, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2012), 19-26. ISSN: 1011-1344, Impact Factor: 2.814.
 17. Saim Emin, **Alexandre Loukanov**, Surya Singh, Seiichiro Nakabayashi, Liyuan Han, Synthesis, characterization and self-assembly of colloidal quantum dots, *Intelligent Nanomaterials, Scrivener Publishing LLC* (2012) 3-37, ISBN: 978-0-470-93879-9
 18. Irina Stambolova, Vladimir Blaskov, Maria Shipochka, Sasho Vassilev, Vilma Petkova, **Alexandre Loukanov**, Simple way for preparation of ZnO films by surfactant mediated spray pyrolysis, *Materials Science and Engineering: B* (2012), 1029-1037. ISSN: 0921-5107, Impact Factor: 1.518.
 19. **Alexandre Loukanov** and Hristo Gagov, High-resolution subunit detection of glutamate receptor by ultrasmall gold nanoparticles, *Microscopy Research and Technique* (2012) 75(9): 1159-1164. ISSN: 1097-0029, Impact Factor: 1.850.
 20. I. Ivanova, **A. Lukonov**, O. Angelov, R. Popova, H. Nichev, V. Mikli, Doriana Dimova-Malinovska, C. Dushkin, Effect of ZnO nanostructured thin films on *Pseudomonas Putida* cell division, *Nanotechnological Basis for Advanced Sensors, NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics* (2011) Chapter 51, 487-491, ISSN: 1874-6535
 21. Surya P. Singh, Saim Emin, **Alexandre Loukanov**, Synthesis of highly soluble phthalocyanine from a new phthalonitrile under mild conditions, *Adv. Mat. Lett.* **1** (2010) 148-150. ISSN: 0976-3961. Impact Factor: 1.930.
 22. **Alexandre Loukanov**, Saim Emin, Surya P. Singh, Anatoli Angelov, Kuniaki Nagayama, Carboxy-eosin as a marker for correlative light-electron microscopic imaging of newly synthesized in vivo DNA, *Adv. Mat. Lett.* **1** (2010) 114-117. ISSN: 0976-3961. Impact Factor: 1.930.
 23. Saim Emin, **Alexandre Loukanov**, Masanobu Wakasa, Seiichiro Nakabayashi, Yasuko Kaneko, Photostability of water-dispersible CdTe quantum dots: capping ligands and oxygen, *Chem. Lett.* **39** (2010) 654-656. ISSN: 0366-7022, Impact Factor: 1.460.
 24. **Alexandre Loukanov**, Naomi Kamasawa, Radostin Danev, Ryuichi Shigemoto, Kuniaki Nagayama, Immunolocalization of multiple membrane proteins on a carbon replica with STEM and EDX, *Ultramicroscopy* **110** (2010) 366-374. ISSN: 0304-3991, Impact Factor: 2.061.
 25. **Alexandre R. Loukanov**, Ceco D. Dushkin, Karolina I. Papazova, Andrey V. Kirov, Miroslav V. Abrashev, Eiki Adachi, Photoluminescence depending on the ZnS shell thickness of CdS/ZnS core-shell semiconductor nanoparticles,

Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects **245** (2004) 9-14. ISSN: 0927-7757, Impact Factor: 2.130.

Б. Статии в чуждестранни и български реферирани списания без импакт фактор:

26. Polina Mladenova, **Alexandre Loukanov**, Anatoly Angelov, Highly-luminescent carbon nanoparticles as sensors for monitoring of heavy metals, *Annual of the University of Mining and Geology "St. Ivan Rilski"* **59** (2016). ISSN: 1312-1820
27. Ivan Nikolov, **Alexandre Loukanov**, Anatoly Angelov, Photosensitizer-conjugated carbon quantum dots for nanocrystalline titanium dioxide solar cells, *Topical Issues of Rational Use of Natural Resources* **2** (2016). ISBN 978-5-94211-565-4
28. Ivan Nikolov, **Alexandre Loukanov**, Anatoly Angelov, Application of carbon quantum dots for dye-sensitive solar cell, *Annual of the University of Mining and Geology "St. Ivan Rilski"* **59** (2016) Submitted. ISSN: 1312-1820
29. **Alexandre Loukanov**, Milena Georgieva, Anatoly Angelov, Toxicological assessment of photocatalytically destroyed mixed azo dyes by *Chlorella Vulgaris*, *Annual of the University of Mining and Geology "St. Ivan Rilski"* **57** (2014) 140-142. ISSN: 1312-1820
30. **Alexandre Loukanov**, Svetlana Bratkova, Velichka Mitova, Sotir Plochev, Anatoliy Angelov, Photocatalytic decolorization of azo dyes by nanostructured zinc oxide doped with lanthanum, *Sustainable Development* **6** (2013) 91-96, ISSN: 1314-4138.
31. **Alexandre Loukanov**, Krassimir Genov, Svetlana Bratkova, Vlado Blaskov, Irina Stambolova, Maria Shipochka, Sasho Vassilev, Coating of natural glass – perlite with nanostructured copper thin film by spray pyrolysis, *Sustainable Development* **6** (2013) 73-77, ISSN: 1314-4138.
32. **Alexandre Loukanov**, Krassimir Genov, Svetlana Bratkova, Anatoliy Angelov, Dipak Sarker, Aluminium silicates (clinoptilolite, perlite and bentonite) modified with silver as catalyst and antibacterial agent, *Analele Universitatii "Constantin Brancisiu" din Targu Jiu* **3** (2012), 345-355. ISSN: 1842-4856
33. **Alexandre Loukanov**, Toxicity assessment of wastewater polluted with azo dyes after remediation with nanostructured oxides, *Nanoscience & Nanotechnology* **12** (2012), 192-194. ISSN: 1313-8995
34. Svetlana Bratkova, Anatoliy Angelov, **Alexandre Loukanov**, Katerina Nikolova, Sotir Plochev and Rosen Ivanov, Biotechnological removal of heavy metals from mining wastewaters by dissimilative sulphate reduction, *Revista Minelor - Mining Revue* (2012) III. 22-27. ISSN: 2247-8590

35. Anatoliy Angelov, **Alexandre Loukanov**, Svetlana Bratkova and Evgeni Kraichev, Factors affecting of performance of microbial fuel cell for treatment of sulphate pollutants, *Universitaria Simpro* (2012) I. III. 1. ISSN: 1842-4449
36. **Alexandre Loukanov**, Photocatalytic decolorization of reactive black 5 and toxicological evaluation of the end products, *Topical Issues of Rational Use of Natural Resources* 2 (2012) 171-174. ISBN 978-5-94211-565-4
37. **Alexandre Loukanov**, Velichka Mitova, Vladimir Blaskov, Irina Stambolova, Anatoli Angelov, Seiichiro Nakabayashi, Aerobic photocatalytic oxidation of mixed azo dyes by sprayed nanostructured titanium dioxide, *Annual of the University of Mining and Geology "St. Ivan Rilski"* 55 (2012) 175-178. ISSN: 1312-1820
38. **Alexandre Loukanov**, Svetlana Bratkova, Vladimir Blaskov, Irina Stambolova, Polina Mladenova, Sotir Plochev, Bacterial mineralization of azo dye treated by nanostructured titanium dioxide, *Annual of the University of Mining and Geology "St. Ivan Rilski"* 55 (2012) 179-181. ISSN: 1312-1820
39. Svetlana Bratkova, Anatoliy Angelov, Katerina Nikolova, **Alexandre Loukanov**, Treatment of waters polluted with heavy metals with biogenic sulphide, *Analele Universitatii "Constantin Brancisiu" din Targu Jiu* 3 (2011), 288-298. ISSN: 1842-4856
40. K. Genov, V. Blaskov, M. Shipchka, I. Boevski, **A. Loukanov**, I. Stambolova, C. Dushkin, Spray pyrolysis vs ion-exchange methods: decomposition of ozone over Cu coated heu-type zeolite in ambient conditions, *Annuaire de L'Universite de Sofia "St. Kliment Ohridski"* 102 (2011), 285-292. ISSN: 0584-0317
41. Anatoliy Angelov, Evgeni Kraichev, Svetlana Bratkova, **Alexandre Loukanov**, Influence of the rock filter filling on the water flow hydrodynamic at treatment of mine water polluted with manganese, *Analele Universitatii "Constantin Brancisiu" din Targu Jiu* 3 (2011), 279-287. ISSN: 1842-4856
42. **Alexandre Loukanov**, DNA staining with metal nanoparticles by reductive amination, *Analele Universitatii "Constantin Brancisiu" din Targu Jiu* 4 (2011), 152-160. ISSN: 1842-4856
43. **Alexandre Loukanov**, Electron microscopic observation of selectively labeled DNA – toward EM DNA sequencing, *Analele Universitatii "Constantin Brancisiu" din Targu Jiu* 4 (2011), 143-151. ISSN: 1842-4856
44. Vladimir Blaskov, Krassimir Genov, Irina Stambolova, Katya Milenova, Vladimir Georgiev, Todor Batakliiev, **Alexandre Loukanov**, Photocatalytic stability of black dyes on TiO₂ and ZnO films: Bezaktiv Schwarz V-Gra vs Reactive Black 5, *Magazine textile and clothing* 8 (2011) 214-218.

45. I. Stambolova, V. Blaskov, M. Shipochka, S. Vassilev, **A. Loukanov**, Photocatalytic activity of sprayed TiO₂ films deposited on different substrates, *University of Plovdiv "Paisii Hilendarski" Scientific Papers* (2011) 137-147.
46. V. Blaskov, I. Stambolova, M. Shipochka, S. Vassilev, N. Kaneva, **A. Loukanov**, Decolorization of reactive black 5 dye on TiO₂ hybrid films deposited by sol gel method, *University of Plovdiv "Paisii Hilendarski" Scientific Papers* (2011) 149-159.
47. **Alexandre Loukanov**, Nikolay Petrov, Anatoli Angelov, Svetlana Bratkova, Seiichiro Nakabayashi, Iron nanoparticles for decontamination of heavy metals in mining wastewaters, , *Proceedings: ecology problems in mineral raw-material branch* (2011) 296-301. ISBN: 978-954-92738-3-0
48. A. Bojinova, C. Dushkin, M. Kostadinov, **A. Loukanov**, Synthesis, characterization and photocatalytic action of titania composite powders, *Proceedings: ecology problems in mineral raw-material branch* (2011) 302-306. ISBN: 978-954-92738-3-0
49. **Alexandre Loukanov**, Nikolay Petrov, Anatoli Angelov, Seiichiro Nakabayashi, Zero-valent iron nanoparticles for decolorization of azo dyes from textile wastewater, *Analele Universitatii "Constantin Brancisiu" din Targu Jiu 2* (2011), 257-265. ISSN: 1842-4856
50. **Alexandre Loukanov**, Koji Nitta, Hideki Shigematsu, Robert Glaeser, Kuniaki Nagayama, Synthesis of Erythrosine-dUTP as biomarker for DNA visualization in living cells, *Scientific researches of the Union of Scientists in Bulgaria-Plovdiv 13* (2011) 125-129. ISSN: 1311-9192
51. **Alexandre Loukanov**, Todor Rusnakov, Nikolay Petrov, Vladimir Blaskov, Irina Stambolova, Anatoli Angelov, Seiichiro Nakabayashi, Eco-friendly nanophotocatalysts for discoloring of azo dyes in industrial wastewater, *Annual of the University of Mining and Geology "St. Ivan Rilski" 54* (2011) 156-160. ISSN: 1312-1820
52. Svetlana Bratkova, Anatoliy Angelov, Katerina Nikolova, **Alexandre Loukanov**, Sotir Plochev, Removal of Cu, Fe, Ni and Zn ions from waters with microbial produced hydrogen sulfide, *Annual of the University of Mining and Geology "St. Ivan Rilski" 54* (2011) 175-180. ISSN: 1312-1820
53. I. Ivanova, R. Popova, **A. Loukanov**, O. Angelov, L. Krusteva, K. Papazova, E. Naumovska, K. Markovska, C. Dushkin, Interaction between *Bacillus Cereus* and nanostructured thin films of zinc oxide as a transducer element for biosensing application, *Trakia Journal of Science 8* (2010) 159-164. ISSN: 1313-3551
54. **Alexandre Loukanov**, Anatoli Angelov, Sotir Plochev, Svetlana Bratkova, Katerina Nikolova, Seiichiro Nakabayashi, Frontiers of the heavy metals

detection in acid mine water: synergy of the advanced Nano-Bio-Sensor technology, *Universitaria Simpro* (2010) 87-92. ISSN: 1842-4449

55. **Alexandre Loukanov**, Anatoli Angelov, Sotir Plochev, Svetlana Bratkova, Katerina Nikolova, Seiichiro Nakabayashi, Gold nanoparticles as colorimetric sensor for iron ions detection in acid mine waters, *Analele Universitatii "Constantin Brancisiu" din Targu Jiu* **3** (2010), 275-284. ISSN: 1842-4856
56. I. Ivanova, **A. Lukanov**, O. Angelov, R. Popova, H. Nichev, V. Mikli, D. Dimova-Malinovska, C. Dushkin, Effect of ZnO nanostructured thin films on the Pseudomonas Putida cells division, *Nanoscience & Nanotechnology* **10** (2010), 166-188. ISSN: 1313-8995
57. **Alexandre Loukanov**, Iliana Ivanova, Anatoli Angelov, Raina Popova, Svetlana Bratkova, Sotir Plochev, Ceko Dushkin, Nanostructured zinc oxide as a transducer for biosensing of sulphate-reducing bacteria, *Annual of the University of Mining and Geology "St. Ivan Rilski"* **53** (2010) 173-175. ISSN: 1312-1820

В. Учебници за студенти бакалаври и магистри

58. **Александър Луканов**, Експериментална биохимия (2013). *Издателска къща "Св. Иван Рилски"* – София, ISBN: 978-954-353-298-8.
59. **Александър Луканов**, Химия на околната среда (2015). *Издателска къща "Св. Иван Рилски"* – София, ISBN: 978-954-353-264-3.
60. **Александър Луканов**, Биосензори и биоиндикатори (2016). *Издателска къща "Св. Иван Рилски"* – София, ISBN: 978-954-353-230-8.

Научно-изследователски проекти по дисертационния труд

1. Проект: "Multi-electron transfer in supramolecular nanosystems", International joint research project between Japanese Society for Promotion of Science – JAPAN and Hungarian Academy of Sciences 2016-2017.
2. Наименование на проекта: "Carbon quantum dots for photodynamic therapy", project funded by Matsumae Foundation, JAPAN. 2016.
3. Проект: "Photosensitizer -conjugated carbon nanodots as diagnostic and therapeutic multifunctional agents", project funded by Kakenhi, Japan Society for the Promotion of Science Foundation, JAPAN. 2016-2017.
4. Проект № ДДВУ 02/36 – 20.12.2010, Проект ДВУ_10_0334 2010, Наименование на проекта: "Пречистване на отпадни води от текстилната индустрия чрез наноструктурирани оксиди и биотехнологии", Финансиран от Фонд научни изследвания, БЪЛГАРИЯ.
5. Проект № Д02-503/18.04.2013, Индекс МУ-0-08/2013, Проект BG051PO001-3.3.05-0001, Проект: *Microbial fuel cell for xenobiotic transformation from wastewater by introducing catalytic nanomaterials*.