



МИННО-ГЕОЛОЖКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. ИВАН РИЛСКИ"

ГЕОЛОГОПРОУЧВАТЕЛЕН ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА "ИНЖЕНЕРНА ГЕОЕКОЛОГИЯ"

маг. Светлин Антонов Тошев

**ИЗКУСТВЕНИ НАНОМАШИНИ ЗА МОНИТОРИНГ И
ИЗВЛИЧАНЕ НА ЗАМЪРСИТЕЛИ В ОКОЛНАТА СРЕДА**

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
Професионално направление 4.4. Науки за земята
Научна специалност: „Системи и устройства за опазване на околната среда“

София
2022

Дисертационният труд съдържа 150 страници, 31 фигури и 3 таблици. В библиографската справка са включени 146 заглавия, всичките на латиница. Експерименталната работа е извършена в лабораториите на катедра Инженерна геоекология и частично в Университета Сайтама, Япония.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на катедра Инженерна геоекология към Геологопроучвателния факултет на Минно-геоложкия университет “Св. Иван Рилски” – София.

Официални рецензенти:

1. Проф. дбн. Искра Витанова Иванова
2. Доц.д-р Илияна Атанасова Иванова

☺☺☺

Защитата на дисертационния труд ще се състои на07.10.2022..... г. от13,30..... часа взала 204Б..... в сградата на Минно-технологичния факултет към Минно-геоложкия университет “Св. Иван Рилски”, гр. София - 1700, ул. “Проф. Боян Каменов”. Материалите по защитата се намират на разположение в сектор “Следдипломна квалификация”.

Дисертационният труд е обсъден на разширен учебно-научен съвет, при катедра Инженерна геоекология, Минно-геоложкия университет “Св. Иван Рилски”, на заседание състояло се на02.06.2022..... г. и е насочен за разкриване на процедура за защита пред научно жури, сформирани със Заповед №380/25.05.2022г. на Ректора на Минно-геоложкия университет “Св. Иван Рилски” – София.



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

маг. Светлин Антонов Тошев

**ИЗКУСТВЕНИ НАНОМАШИНИ ЗА МОНИТОРИНГ И
ИЗВЛИЧАНЕ НА ЗАМЪРСИТЕЛИ В ОКОЛНАТА СРЕДА**

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
Професионално направление 4.4. Науки за земята
Научна специалност: „Системи и устройства за опазване на околната среда“

Научен ръководител: проф. дн Александър Луканов

София
2018

Използвани съкращения

In situ – на място

Ex situ- извън първоначалното местоположение

ConA - биорецептора на лектин Concanavalin A

pРНК – рибозомна РНК

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

SAMs – самостоятелно сглобени монослое

MIP - молекулно отпечатаните полимери

ОФ - органофосфорни агенти

DMF – диметилформаид

SDS/PSf - додецил сулфат / полисулфон

СТАВ - цетилтриметиламониев бромид

EDTA - етилендиаминтетраоцетна киселина

PEDOT (ПЕДОТ) - 3,4-етилендиокситиофен

DMF-диметилформаид

Tween 20- полиетилен гликол монолауреат

ТЕМ- трансмисионен електронен микроскоп

DTT- дитиотреитол

DTE- дитиоеритриол

BSA- говежди серумен албумин

PEG- полиетилен гликол

TBE-буфер за електрофореза

ROS- реактивни кислородни видове

ОТМ-произведение от дължина на опашката с частта от общата ДНК в опашката

HPLC-обратнофазова високефективна течна хроматография

DMSO- диметил сулфооксид

PBS- фосфатно буфериран физиологичен разтвор

HDC-контрастно фазова плоча

MSN-мезопорести силициеви наночастици

TEOS- тетраетил ортосиликат

DAPI-4',6-диамидино-2-фенилиндол

EPR-електронен парамагнитен резонанс

DLS-динамично разсейване на светлината

SPR-повърхностен плазмонен резонанс

HEPES-буфериращ агент на цветерионна сулфонова киселина

TEOS-тетраетил ортосиликат

TMB-3,3',5,5'-тетраметилбензидин

DMSO-диметилсулфоксид

OD-оптична плътност

BSE-обратно разпръснати електрони

SE-вторични електрони

MPA-меркаптопропонова киселина

ICP-индуктивно свързана плазма

WEEE- отпадъци от електрическо и електронно оборудване

PCB-печатни платки

NPs- наночастици

ORP-окислително редукиционен потенциал

PLS-излужени разтвори или концентрати

PNA-пептидни нуклеинови киселини

Изкуствени наномашини за мониторинг и извличане на замърсители в околната среда

маг. Светлин Антонов Тошев

АНОТАЦИЯ

В настоящата дисертация са разработени изкуствени наномашини, изградени от различни материали, но програмирани да изпълняват конкретни практически задачи, отнасящи се до анализа, мониторинга и извличането на замърсители от околната среда. Освен към замърсители, наномашините се оказват ефективни и при взаимодействие с някои патогенни микроорганизми. Потенциалните им възможности и приложения са представени в шест направления. В първото са демонстрирани способностите на наномашините, базирани на ДНК или РНК олигонуклеотидите, конюгирани с метални или полупроводникови наночастици. Акцентът е поставен върху предизвикателствата, пред които са изправени тези наномашини при решаване на практически задачи в природни условия, т.е. когато са в непосредствен контакт с разрушителните хидролитични ензими DNase. С цел запазване на цялостта и функционалността на тези наномашини е предложен метод за пакетиране им в двуслойна везикула и по този начин за запазване на непокътната структура на ДНК или РНК линкерите, от които са изградени. Този подход позволяват практическото приложение на наномашините и нанороботите базирани на ДНК или РНК олигонуклеотиден дизайн, както в биологични системи, така и при разнообразни задачи свързани с откриване и мониторинг на замърсители в околната среда. Такива замърсители могат да бъдат специфични тежки метали, органични съединения или биомолекули, които взаимодействат с наномашината на базата на биоразпознавателна реакция, наподобяваща принципа на биосензорните технологии. Във второто направление е демонстриран самоходен Янус наноимпелер, който може да се използва за тераностика на патогенната Ешерихия коли, т.е. едновременно като наносензор за нейното идентифициране и мониторинг в пробата, и като наноустройство за фототермичното разрушаване на бактерията при облъчване с инфрачервена светлина. Разработеният Янус наноимпелер може с успех да се използва, като наносензор за детекция и на други видове патогенни микроорганизми или токсини (на базата на разпознавателната реакция антиген-антитяло) в замърсени проби, взети директно от околната среда без да е необходима стъпка на консервиране или обработване на пробата. Дизайна на наномашината позволява да се прикрепва селективно само към целевите бактерии, благодарение на протичащата биоразпознавателна реакция между нейния биоелемент (органични лиганди или биологичен материал конюгиран върху повърхността на наноимпелера) и експресираните мембранни протеини върху клетъчната стена на

бактериите. Концентрацията на бактериите в суспензията може да бъде количествено установена в зависимост от спектрофотометричните промени на повърхностния плазмонен резонанс на наночастиците (т.е. интензивността и/или изместването на абсорбционния пик в червената област на спектъра). Използването на Янус наноимпелер със златно нанопокритие върху мезопорести силициеви ядра дава допълнително възможности за транспортиране и освобождаване на множество органични съединения, както и за термично разрушаване на микроорганизмите (бактерициден ефект), при облъчване с инфрачервена светлина с подходяща дължина на вълната. В третото направление са представени сребърни наночастици, покрити с цитратни лиганди, като колориметрични наносензори за детекция и мониторинг на разтворен арсен (III) в замърсени води с граница на откриване около 5-6 ppm. Разработен е химичен метод за лесен синтез на сребърни наночастици, които са покрити с цитрат (лимонена киселина). Те са тествани като колориметричен наносензор за бързо, качествено и количествено откриване на разтворен арсен (III) в питейни или подпочвени води при концентрация над 6 ppm. Анализът е чувствителен и възпроизводим. Съществуват множество конвенционални аналитични техники за ефективното откриване на арсен дори и при пониски концентрации, но разработените наносензори се отличават със своята ниска себестойност и практическата лекота при изпълнение на анализа. В допълнение, методът не изисква наличието на скъпо струваща апаратура (необходим е колориметър или абсорбционен спектрофотометър) и процедурата по изпълнение не отнема време. Протичането на качествена сензорната реакция може да се наблюдава и с невъоръжено око, защото е свързана с промяната на цвета от жълто в синьо. Тези детайли са важни за комерсиалното приложение на сребърния наносензор, защото арсенът е един от основните замърсители на почви и води в редица страни и хроничната му токсичност причинява сериозни заболявания. Четвъртото направление е представено с биомиметичен наноробот, който може да бъде задвижван чрез ултразвук и неговите функции са демонстрирани при улавяне и премахване на патогенни микроорганизми от проби, взети от околната среда. Разработения биомиметичен наноробот, задвижван, чрез ултразвук е способен да плува във водните среди и да улавя бактерии при осъществяване на физичен контакт с тях. По този начин при преминаване през множество разнообразни траектории наноробота премахва патогенните микроорганизми (благодарение на биоразпознавателна реакция) от средата с останалата микрофлора. Подобно на Янус наноимпелера, биометичния наноробот може да се използва и за количествен анализ или мониторинг на целевите (детектираните) патогенни микроорганизми. При този анализ се измерва отместването на повърхностния плазмонен резонанс, произхождащ от прилепналите бактерии към златното нанопокритие в червената част на спектъра. Друг нов елемент в представената разработка е че задвижването на наноробота се извършва посредством прилагане на ултразвук, за който е характерно, че има много по-голяма

способност да прониква дълбочинно в пробата, отколкото инфрачервената или видимата светлина. Потенциалните му възможности за практическо приложение все още са обект на обсъждане и допълнителни изследвания, но въпреки това наноробота може да се използва, като платформа за развитие на нови наноразмерни устройства, които да се използват при решаване на разнообразни екологични предизвикателства (например улавяне на бактерии, токсини и замърсители, т.е. детоксификация). Петото направление е демонстрирано, чрез приложението на нанозими (изкуствени ензими) за наносензорна детекция и мониторинг на манган в замърсени води. Синтезираните ултра-малки въглеродни наноточки са доказани, като ефективни нанозими за фото-каталитично окисление на манган (II) до манган (III) и по този начин за осъществяване на неговия качествен и количествен анализ, чрез оцветяване на индикаторно органично багрило. Методът е подходящ за мониторинг на разтворен манган в замърсени питейни води, но може да се използва и с бъдеща комерсиална цел за множество други видове анализи. Например, представената сензорна реакция има потенциал да се приложи и при мониторинга на манган в проби, взети от околната среда, например киселинни руднични дренажни води. В последното, шесто направление са представени ензимни системи и клетъчни ултраструктури, като природни наномашини за преработка и извличане на метали от електронни отпадъци под формата на наноматериали. Демонстриран е еколого-целесъобразен биотехнологичен подход за рециклиране на важни метали (мед, злато, кадмий и др.) от вторични отпадъци. Този подход може да намери своето потенциално приложение в различни технологични схеми и инсталации за рециклиране на отпадъци, съдържащи метали. Той се отличава със своята ниска себестойност и минимизиран негативен ефект върху околната среда.

I. УВОД

Разработването на задвижващи се наномасштабни устройства (наноматериали, молекули, супрамолекулни структури и др.) представлява голямо предизвикателство, но същевременно създава нова научно-изследователска област. Освен това се създават и нови възможности за разработване на ново поколение „интелигентни“ материали с уникални свойства и приложения. Поради тази причина изследователските усилия през последното десетилетие са фокусирани към развитие на т. нар. нано-устройства и машини, които са способни да превръщат различни видове енергия (оптична, магнитна, ултразвук, радиочестотна и др.) в механично задвижване или химически реактивоспособни частици. Наномашините са програмируеми наномасштабни устройства, които могат да улавят и превръщат химичната, светлинната, магнитната и други видове енергия в механично движение или подобно на ензимите да катализират химични реакции и по този начин да изпълняват множество разнообразни функции или да имитират биомолекули или природни системи. През последните години е постигнат значителен пробив в

разработването на дизайни и синтети на микро и нано двигатели, които са задвижвани, чрез прилагане на различни външни енергийни източници, например електрофореза, химични реакции на хетерогенна повърхност и отделяне на микромехурчета, дифузиофореза, и чрез използване на външни стимули като светлина, магнитно поле или ултразвуково въздействие. Въдъхновени от филма „Фантастично пътуване“, първите усилия в разработването на синтетични наномашини са мотивирани и фокусирани предимно върху потенциалните им биомедицински приложения. Тези приложения включват насочено доставяне на лекарствени препарати в организма, манипулиране и изолиране на клетки, биоизображения на тъкани или единични клетки, нанохирургия и наносондиране, а съвсем наскоро и вътреклетъчно задвижване. Всички тези изследвания са безспорно много интересни, но последните постижения в тази област откриват нови хоризонти на микро/наномашините да намерят потенциално приложение в екологията и по-специално, при опазване, пречистване и възстановяване на околната среда. Възможностите за екологичните приложения на наномашините непрекъснато се увеличават с всяка изминала година, поради нарастване на видовете и безбройните приложения на тези нови материали. В допълнение, уникалните физикохимични и химичните свойства на наноустройствата, базирани на способността им да превръщат светлинната или химичната енергия в механично движение, да катализират реакции или управляват процеси, създават и нови методи за ремедиация и мониторинг на замърсени площи. Това ново развитие е от особено значение за екологията, тъй като акумулирането на замърсители в околната среда непрекъснато нараства със застрашителни размери и решението на този проблем със съществуващите конвенционални методи представлява огромно предизвикателство за еколозите. Нарастването на антропогенната дейност и модернизиранието на индустриализацията водят със себе си до използването на все повече нови, синтетични материали и тяхното прекомерно изхвърляне, като емисии от резистентни и опасни ксенобиотици в природата. По този начин се причинява трайно замърсяване на водните ресурси, почвата и атмосферата. Водните екосистеми, които са от жизнено значение за устойчивото развитие на всяка икономика, са сериозно застрашени по целия свят. Продължаващото влошаване на здравословното състояние на околната среда, наред с бързия растеж на населението и нарастващите нужди от чиста питейна вода, поставят спешна нужда от необходимост за въвеждане на нови технологии и ефективни иновативни технологични решения, насочени преди всичко към опазване на водните и въздушните ресурси. Също така нуждата от осигуряване на широк достъп до чиста и достъпна питейна вода непрекъснато се увеличава, особено в страните в развиващия се свят или страните с малки водни запаси. В това отношение нанотехнологиите предоставят значителни нови възможности и широк спектър от потенциални екологични приложения. Вече са известни множество патентовани продукти на базата на нанотехнологии, които се използват успешно, при реализирането на

мощабни дейности, свързани с пречистването и/или опазването на околната среда. Например, търговско налични са усъвършенствани и свръхчувствителни наносензорни технологии (в т.ч. и нанобиосензори), както и други реактивоспособни наноматериали, които улесняват откриването на множество сериозни замърсители при ниски или особено ниски концентрации. Нанотехнологиите доказано може да се използват и за саниране на замърсени обекти. Причината за тези екологични приложения се базира на атрактивните, нови и уникални свойства на наноматериалите, включващи тяхната висока повърхност, каталитична и антимикробна активност, както и оптични им свойства, които могат да се регулират както от размера на частиците, така и от химичния им състав или повърхностните свойства. Докато в продължение на близо две десетилетия новите наноматериали и нанотехнологиите се доказаха, като изключително полезен инструмент за справяне с разнообразни проблеми при опазване на околната среда, произхождащите тях наномашини и техните приложения са реализирани едва през последните няколко години. Въпреки това, скорошните усилия от няколко изследователски групи доказват убедително, че синтетичните наномашини могат да отворят вратата за още нови приложения, свързани с опазването на околната среда, вариращи от ускорени процеси за обеззаразяване, скрининг на качеството на водата, до отстраняване на нефтени или петролни разливи.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основната цел на настоящия дисертационен труд е да се демонстрират потенциалните екологични приложения на наномашините, чрез разработване на наномощабни устройства, посредством външни енергийни източници и да се използват, като ефективни средства за мониторинг и извличане на замърсители в околната среда.

За постигането на тази цел е необходимо да бъдат решени следните **задачи**:

- 1. Пакетиране на наномашините, изградени от олигонуклеотиди и наночастици, в двуслойни везикули за защита при контакт с хидролитични ензими в околната среда.***
- 2. Да се разработи самоходен Янус наноимпелер за селективно улавяне и унищожаване на патогенни микроорганизми.***
- 3. Да се използва колориметричен метод за качествен и количествен анализ на замърсители, базиран на повърхностния плазмонен резонанс на използваното наносензорно устройство.***

4. *Да бъде приложено използването на биометичен наноробот, задвижван от ултразвуково поле за да се изследват патогенните бактерии в суспензии.*
5. *Да се демонстрира сензорната способност на имитиращи ензими наноустройства (нанозими) за детекция на замърсители във водни среди.*
6. *Утилизиране на клетъчни ултраструктури и ензимни системи, като природни наномашини за биотехнологично извличане и рециклиране на ценни метали от електронни отпадъци, чрез биогенен синтез на наноматериали.*

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Използвани апарати

За осъществяване на горе-посочените задачи са използвани следните апарати: UV-VIS спектроскопичен анализ, посредством UV-VIS аналитичен спектрофотометър Jasco (модел № V 570), използвайки стандартна 1 cm кварцова кювета. Дзета потенциалът на наночастиците (Zeta-potential) е измерен с помощта на ZetaPALS Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instrument Corporation). Разпределението на наночастиците по размер се определя с помощта на динамично светлоразсейване (Dynamic Light Scattering, DLS, Zetasizer Nano ZS) и трансмисионен електрон микроскоп (ТЕМ). ТЕМ микрографските снимки на наномашините и бактериите са получени посредством JEOL JEM-3100FFC ТЕМ при 300 kV ускорително напрежение. Микроскопа е оборудван с контрастна (HDC) фазова пластинка, работеща на принципа на диференциал на Хилберт. Получените белязани бактериални клетки са адсорбирани върху медна микро-решетка, покрита с аморфен въглероден филм (дебелина на филма между 15 – 20 nm). Течната бактериална суспензията се отстранява от въглеродния филм, чрез попиване с филтърна хартия. След това бактериалните клетки се замразяват бързо в течен етан, чрез използване на устройство за бързо замразяване (Leica Microsystems, Германия). Замразените клетки се съхраняват за продължителен период от време в течен азот, в дюаров съд. По този начин, замразените белязани микроорганизми може да бъдат приготвени и наблюдавани в биологичния трансмисионен електрон микроскоп. При всички наблюдения е използвана крио-трансферна система за постоянно подържане на клетките в замразено състояние.

2. Материали

Всички химикали бяха използвани без предварителна подготовка или пречистване. За получаване на въглеродни квантови точки, използвани като нанозим е приложена

микровълнова пиролиза за която са необходими следните вещества: лимонена киселина (Wako), 1,2- етилендиамин (Wako), флуоресцентните багрила флуоресцин (Sigma-Aldrich), флуоресцеинизотиоцианат (Sigma-Aldrich), DAPI и други. Солна киселина (Wako), натриева основа (Wako), натриев карбонат (Wako), етилен гликол (Wako) и други. Използвани са още бактериални хранителни среди, реактиви за олигонуклеотиден синтез, сребърен нитрат (AgNO_3 , 99,9 %), 3-меркаптопропионовата киселина ($\text{HS-CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), метиленхлорид, етанол и изопропанол (закупени от WAKO) за приготвянето на представените наномашини. PC мембранният шаблон е закупен от Whatman Nuclepore (каталожен № 110407). Той съдържа 400 nm в диаметър кухи нанотръби с диаметър на нанопорите между 20-100 nm, соли на различни катиони (KCl , NaCl , CaCl_2 , MgCl_2 , FeCl_3 , ZnCl_2). Те бяха закупени от фирмите Нису и Вако, Япония (Wako Pure Chemical Corporation). Стандартния разтвор на арсен (III), т.е. арсенова киселина (H_3AsO_3) е закупен от Merck (САЩ).

3. Методи

Конюгиране на магнитните наночастици с олигонуклеотиди.

В проведения експеримент за конюгиране ~ 20 pmol/ml олигонуклеотид (фиг. 2.2), модифициран с терминален алкин (1, 5' алкин-A10-ATT-ATC-ACT 3'; 2, 5' алкин-A10-AGT-GATAAT 3') се добавя към DMSO разтвор на CuSO_4 , THPTA (трис-хидроксилпропил триазолиламин) и аскорбинова киселина (AA). THPTA лигандът е необходимо допълнение към реакцията за предотвратяване на добре известния ефект на разграждане на Cu(I) върху олигонуклеотиди (както е представено на фиг. 2.2). Тази смес се приготвя в съотношение 1:4:10 на съответните компоненти, което води до крайни реакционни концентрации от 200 μM CuSO_4 , 800 μM THPTA и 2 mM AA. След това, 100 pmol от 10 nm азид-функционализирани наночастици в буфера се добавят към този разтвор до получаването на краен обем от 500 μL . Реакцията се блокира, чрез центрофугиране в множество времеви точки и наночастиците се изолират и ресуспендират посредством 0.15 M PBS. Този процес се повтаря до три пъти. Съотношението на каталитичните елементи един към друг е от решаващо значение за синтезата на стабилни конюгати, тъй като големия излишък от лиганд повишава стабилността на Cu(I) йон в разтвора.

Функционализация на повърхността на наномашината с цистеиново покритие върху златното полукълбо и детекция на E. coli.

Исходният разтвор на цистеин се приготвя в буфер CH_3COONa (0.01 M натриев ацетат, pH 10). Имобилизирането на цистеиновата аминокиселина върху повърхността на покритата със злато полусфера се извършва чрез смесване на разтвора на аминокиселините, използвани като органични лиганди с Янус наночастиците в

съотношение 1:1. След това получената суспензия се съхранява при стайна температура за 24 часа (едно денонощие) с цел да протече хетерогенната реакция между твърдата повърхност и водния разтвор. По време на реакцията се регистрира видима промяна на цвета на суспензията. Получената суспензия се подлага на ултрацентрифугиране, за да се отделят наночастиците с нереагиралия цистеин или другата органика в суспензията. Културата на *E. coli* O157:H7 (закупена от Remel™ Wellcolex™) се приготвя, както следва: 50 µl от анабиотичната бактериална суспензия се инокулира в 5 ml хранителна среда M9 [139] (състава е описан по-долу) при 37 °C в продължение на 4 часа, за да се достигне фазата на експоненциален растеж ($OD_{280} = 0.449$ а.у., време = 270 min). След достигане на тази фаза бактериите биват подлагани на третиране с наномашината на Янус. Хранителната среда M9 съдържа 0.5 % глюкоза, 0.4 % казаминова киселина, 50 µg/ml триптофан и соли със следната концентрация: 6.40 g Na_2HPO_4 , 1.50 g KH_2PO_4 , 0.25 g NaCl, 0.50 g NH_4Cl , 2.0 ml 1.0 M $MgSO_4$ и 0.1 ml 1.0 M $CaCl_2$ разтворени в 500 ml MilliQ вода.

Изработка на биомиметичния наноробот

Златните нанопроводници са приготвени чрез конвенционален метод на електроотлагане. За тази цел тънък нанопилм от елементарно злато се разпръсква върху пореста PC мембрана. След това мембраната се сглобява в клетка за покритие (тефлон) с алуминиево фолио. Златото се покрива и полученият разпръснат слой се отстранява чрез механично полиране. Така е създадена платформата на наноробота, която е изградена от позлатени наножички притежава вдлъбната форма и средно разпределение на размера между 2 – 7 µm. Остатъците от PC мембраната се разтварят в метиленхлорид и нанороботите се отделят от смесения разтвор чрез центрофугиране и промиване с изопропанол и етанол. Получената утайка се съхранява в ултрачиста вода при температура около 4 °C (в хладилник). Функционализацията на наноробота с моноклонално анти тяло (анти-*E. coli* O157:H7) се извършва във фосфатно-буфериран физиологичен разтвор (PBS). Златните нанопроводници първо се покриват с 0.20 mM 3-меркаптопропионова киселина (MPA) за една нощ и след това реагират с моноклонално анти тяло в буфериран разтвор, чрез реакция на конюгиране (реакцията е описна по-долу). Произведеният биомиметичен наноробот се смесва с бактериална суспензия (взета в средата на логаритмична фаза) и се активира чрез прилагане на външно ултразвуково поле. Честота на апарата за генериране на ултразвук работи в диапазона над 2,60 MHz и амплитуда около 2.0 V.

Колориметрично откриване и мониторинг на манган в проби, получени от замърсени питейни и подземни води посредством нанозим

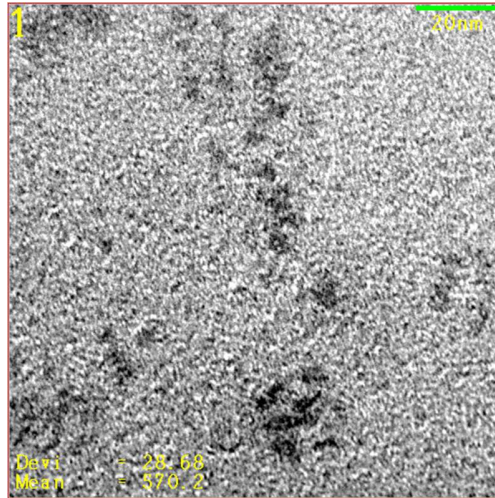
Бяха приготвени два основни разтвора за експеримента с колориметричен анализ. Разтвор I съдържа TMB в EDTA. За тази цел 11,5 mg EDTA (0,001 M, 0,0116 g) се разтварят в 40 ml ddH₂O (MilliQ вода). 7.7 mg TMB се разтварят предварително в DMSO и се добавят

към 40 ml изходен разтвор I. Разтвор II съдържа С-точки с концентрация 33 mg/ml. За анализа на реакцията на фотоокисление 20 μ L С-точки (разтвор II) се добавят в 1,5 mL TMB в EDTA (разтвор I) в Eppendorf. След това, аликвотна част от 20 μ L воден разтвор на метален хлорид (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+}) беше добавена към анализа на Eppendorf, за да се постигне крайната концентрация от 0,001 M. Анализът се извършва, чрез облъчване с UV лампа (LED светлина с дължина на вълната 365 nm) за 1 минута и промяната на интензитета на синия цвят (полученият абсорционен пик е с максимална дължина на вълната 645 nm) се измерва с UV-VIS Jasco аналитичен спектрофотометър.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

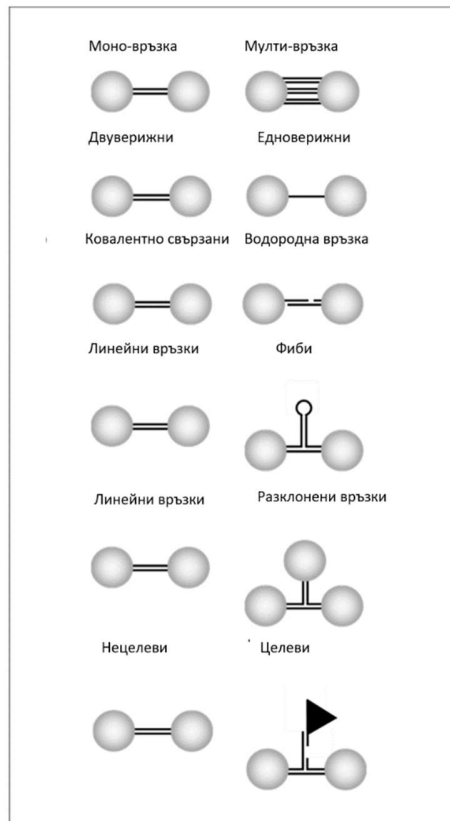
Проектиране на ДНК линкери в изкуствени наномашини, целящи да засилят резистентността на най-слабото звено в наноразмерното устройство спрямо наличните хидролитични ензими в околната среда

Всяко проникване на чужда ДНК в дадена клетка, организъм или навсякъде в околната среда е изправено пред предизвикателството на разрушителното действие на наличните хидролитични ензими, които често с право се наричат „разрушители на ДНК“. Нуклеазите дезоксирибонуклеаза (ДНКаза, за кратко) е ензим, който катализира хидролитичното разцепване на фосфодиестерните връзки в ДНК веригата, като по този начин я разгражда или разрушава, и крайният наблюдаван ефект е фрагментация. Трансмисионно-електронна снимка на този ензим е представена на фиг. 4.1. Известно е голямо разнообразие от хидролитични дезоксирибонуклеази, които се различават по своите субстратни специфики, химични механизми и биологични функции. Механизмът на хидролитична ДНК фрагментация обаче е универсален, независимо от естеството, конфигурацията или секвенцията на ДНК, в това число и ДНК линкерите, които изграждат наномашините. Този механизъм със сигурност включва свободно плаваща ДНК в околната среда или биологични телесните течности (например кръв, урина, лимфа и слюнка) на организми преносители. Проектираните линкерите могат да се състоят от линейни и кръгови ДНК, дълги ДНК фрагменти или олигонуклеотиди, както и от едноверижни или двуверижни ДНК. Естествената роля на ензимите наречени нуклеази-разрушители е защита на клетката или тялото на организма срещу заплахата от чужда ДНК, която може да бъде инфекциозна вирусна, бактериална или външен генетичен материал, пристигащ от мъртви клетки.



Фигура 4.1. Визуализация на дезоксирибонуклеаза, чрез 120 eV трансмисионен електронен микроскоп. Скала = 20 nm.

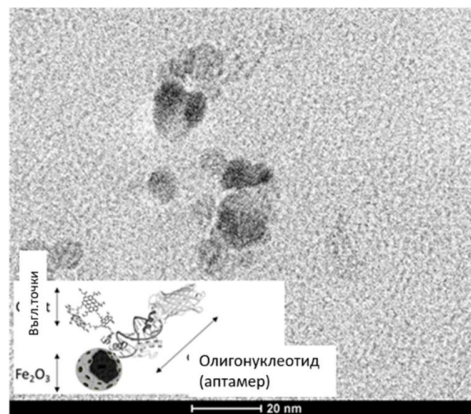
ДНК линкерите варират по дължина от няколко нуклеотида до няколкокостотин базови двойки. Нуклеотидната последователност на линкера може да бъде различна в зависимост от неговата роля и функция, особено в случаите в които е проектиран в дизайна на функционална наномашина. Този дизайн може да включва нуклеотидни последователности, които да участват в специфични биологични реакции за разпознаване на специфични органични молекули, епитопи на протеини, ензими, молекули на клетъчната повърхност (например мембранни протеини), белтъчни клъстери или други хомоложни ДНКи. Както е показано на Фигура 4.2, линкерът може да бъде едноверижен или двуверижен, единичен линкер спрямо една наночастица, или поли/мулти-линкер.



Фигура 4.2. Видове ДНК линкери при проектирането на изкуствени наномашини.

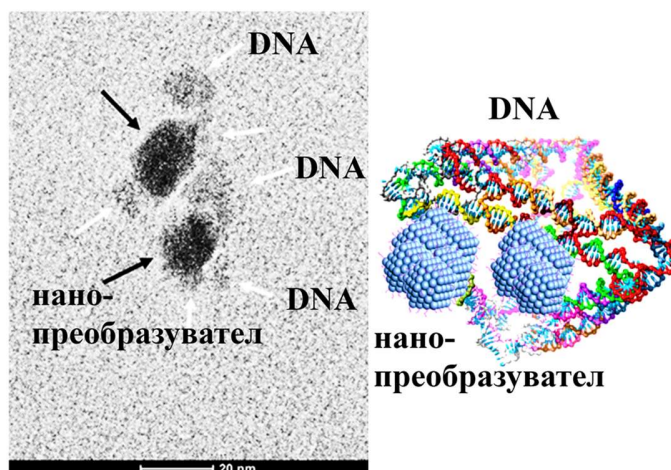
Проведените експерименти установиха, че наномашините получени на базата на ДНК оригамни структури могат лесно да взаимодействат (т. е. да конюгира) с функционализирани метални (злато, сребро или платина) или полупроводникови наночастици (цинков сулфид, железни оксиди и др.). На фигура 4.3 са представени електронно-микроскопски снимки на наномашини, получени при конюгиране на краищата на ДНК линкер с магнитни наночастици от хематит (Fe_2O_3). Хематитните наночастици са покрити с лиганди от флуоресцентни въглеродни квантови точки. По този начин те могат да улавят енергията на видимата светлина (в диапазона 360 nm – 500 nm) и да я превръщат в химическа енергия (например, синглетен кислород $^1\text{O}_2$). Отделните компоненти (различни наночастици, нуклеинови киселини и др.) в представената наномашина работят на наномасщабно ниво. По този начин се създават самостоятелно сглобени наноустройства с уникални наномеханични, оптични, каталитични, и наноелектронни свойства. Те притежават потенциално приложение в сензорната технология (за детекция на замърсители) и могат да бъдат разработени в насока биомониторинг на околната среда. Много от тези приложения са базирани върху използването на олигонуклеотидни вериги, свързани с метални (например златни) или други биосъвместими наночастици (например въглеродни квантови точки, фулерени,

полимерни наноматериали, полупроводникови наночастици като и железни оксиди, магнитни наномотори и др.). Олигонуклеотидните нишки могат допълнително да се хибридизират един с друг и така да се образуват по-сложни нанокомпозиции или програмирани наноустройства, наречени функционални наномашини и дори наноробот. Въпреки уникалните им потенциални приложения, тяхното използване в реални условия (при *in situ* проби взети от околната среда), както и при *in vivo* условия, например в клетъчни, тъканни среди или бактериални суспензии остава голямо предизвикателство във всички проведени експерименти, поради нестабилността от разграждане на олигонуклеотидните вериги от ензимите дезоксирибонуклеази (ДНКази). За да се защити цялостта и функцията на тези наномасщабни структури, ДНК линкерите трябва да бъдат модифицирани или пакетирани, което е една от целите на настоящото дисертационно изследване. Друг алтернативен подход, който е демонстриран в експериментите е да се запази функционалността на наномашината в пробите, чрез просто инхибиране на ензимите на ДНКазите. Този подход обаче изисква доста голям ресурс и на практика остава трудно приложим.



Фигура 4.3. Електронно-микроскопска снимка на наномашини, получена при свързването на наночастици от железен оксид с ДНК линкер (аптамер за разпознаване на мембранны белтъци), който е нестабилен при контакт с дезоксирибонуклеази.

Електронно микроскопското изображение на фиг. 4.4. представя захранвана от светлина ДНК наномашина. Представена е нейната вътрешна структура, тоест две наночастици (наноконвертори), свързани с ДНК аптамер. Аптамерите се използват за реакция на биоразпознаване вместо антитяло. При облъчване на наномашината с ултравиолетова, видима или близко инфрачервена светлина наноконвертора преобразува лъчението в реактивни кислород съдържащи съединения, т.е. в химическа енергия и по този начин може да индуцира апоптоза или програмирана клетъчна смърт в клетките, които са погълнали тази наномашина.



Фигура 4.4. Светлинно-задвижвана наномашина изградена от нанопреобразуватели (наноконвентор) и ДНК олигонуклеотиди, използвани за линкери между наноматериалите.

Както беше установено експериментално, основния проблем който при наномашините получени от олигонуклеотиди е, че в реален експеримент с проба получена от околната среда, т. нар. наномашината изградена от олигонуклеотидна верига е незащитена и лесно уязвима на хидролитично разкъсване от нуклеазите. При всички експерименти се регистрира фрагментиране или унищожаване на наномашината, следствие на което връзката между наночастиците се разкъсва и така устройството губи първоначално зададената му функционалност. В настоящото изследване на ДНКазите, бяха разгледани само ендонуклеазните ензими. В клетките на бозайници (в това число и в човека) са известни най-общо девет ДНК ендонуклеази (представени в Таблица 4.1). Всички те с изключение на ендонуклеаза G (EndoG) са типични представители на ДНКази, докато EndoG е нуклеазата която може да разгражда също и рибонуклеинови киселини (т.е. DNase/RNase).

Име	Човешки гени	Молекулно тегло (kDa)	Субстрат	Продукт краен резултат
Дезоксирибонуклеаза (DNase I)	1 16p13.3	34	ДНК	3'ОН / 5'P
Дезоксирибонуклеаза (DNase X)	X Xq28	35	ДНК	3'ОН / 5'P

Дезоксирибонуклеаза 1-like 2 (DNase1L2)	16p13.3	36	ДНК	3'ОН / 5'Р
Дезоксирибонуклеаза gamma (DNase γ)	3p14.3-p21.1	32-36	ДНК	3'ОН / 5'Р
Дезоксирибонуклеаза 2 alpha (DNase 2 α)	19p13.2	35-45	ДНК	5'ОН / 3'Р
Дезоксирибонуклеаза 2 beta (DNase 2 β)	1p22.3	35	ДНК	5'ОН / 3'Р
L-Дезоксирибонуклеаза 2 (L-DNase 2)	6p25.2	35-42	ДНК	5'ОН / 3'Р
Дезоксирибонуклеаза G (EndoG)	9q34.1	27-32	ДНК, РНК	3'ОН / 5'Р
Активиран с каспаза DNase (CAD)	1p36.3	40	ДНК	3'ОН / 5'Р

Таблица 4.1. Видове ДНК ендонуклеази.

Известно е че ДНКазите обикновено се насочват към преференциални базови последователности за разцепване на олигонуклеотидната верига в началото на хидролитичната реакция. Например, DNase I обикновено разрязва ДНК при богати на АТ последователности, докато EndoG инициира разграждането на ДНК, чрез разцепване първо на богатите на G последователности (заради което ензимът е получил името си). Въпреки това, настъпващите по-нататъшни разцепвания продължават привидно без значение на специфичността на олигонуклеотида или последователността на азотните бази във веригата.

За целите на дезактивирането на тези ензими, наличието на модифицирани ДНК линкери в наномашина с единична или двойноверижна верига може да е необходимо условие. Това може да се постигне и чрез съвпадащи едноверижни ДНК скъсвания на противоположните вериги, които са в състояние да инхибират ендонуклеазната активност, или при еднократно разкъсване на двойноспиралната ДНК, което е характерно за ензимите ДНКаз II алфа. Поради активността на ДНКазата, стабилността на ДНК линкера свързан с наноматериали в буферен разтвор или в суспензии, бързо може да придобие по-висока стабилност и резистентност към разграждане. Това е доказано при излагане с клетъчни култури или инжектиране *in vivo* в експериментални животни. Разграждането на

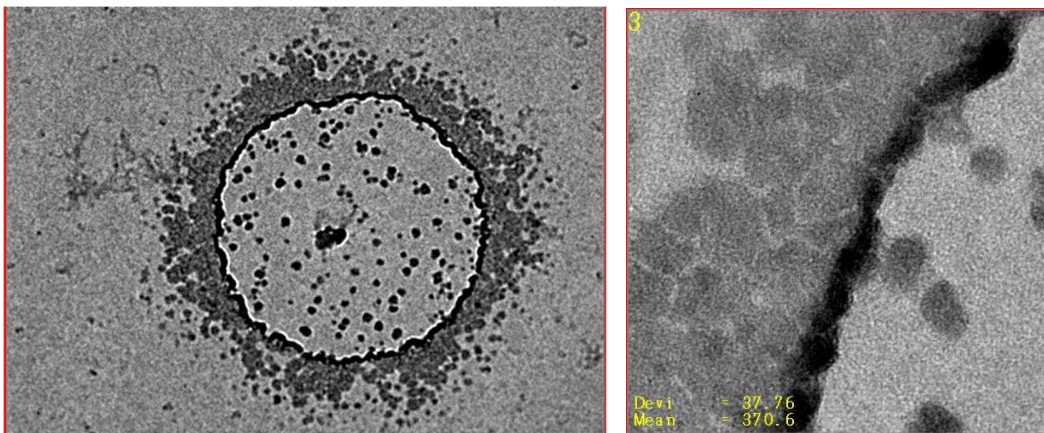
ДНК, свързана с наночастици, зависи от няколко фактора. Единия от тях е дължината на ДНК линкера. Колкото повече на брой въглеродни атоми съдържа линкера, толкова по-устойчив е на разграждане, медирано от ДНКаза. Проведените изследвания установиха също, че при дадена дължина на ДНК или олигонуклеотид, свързването на линкери с наночастиците в димери също оказва силно влияние върху плътността на ДНК и по този начин на броя на звената, които може да бъдат изложени на атака от страна на ензимите.

4.1.2. Защита на ДНК линкери, чрез модификация или опаковане на наномашината

По-горе бяха представени накратко два от възможните начини за защита на ДНК линкери – (а) чрез химична модификация или (б) чрез промяна на дължината или секвенцията на олигонуклеотидния линкер. Тези подходи обаче не са практични за поставените цели в дисертационния труд, защото те променят дизайна на наномашината и по този начин и нейната функционалност. Съществува и друг подход, чрез инхибиране на ензимите ДНКаза, например при промяна на кофакторите им като се приложат двувалентни катиони. Този подход обаче също не е практичен, особено когато наномашините се използват в реални условия в проби, взети от околната среда и се изложени на непосредствен *in vivo* с разнообразни клетки, микроорганизми, в това число и с по-сложни организми. Фосфорилирането, което също беше изследвано в дисертационния труд за модификация на олигонуклеотидите, също се оказва непрактично. Причината е че то защитава наномашината от екзонуклеази само тогава, когато е изградена от нуклеотиди с определени последователности и дължини (т.е. в много ограничени случаи). На практика, защитата на ДНК линкерите в наномашината от ензимно разграждане не се различава съществено от защитата на която и да е ДНК, използвана за целите на трансфекция в култивирани клетки или *in vivo* доставки. Експериментално е установено, че при тези случаи е традиционна употребата на липофилни вещества, както и пептиди, които предпазват олигонуклеотидите, като образуват хибридни комплекси с тях. Така получените пептидни нуклеинови киселини (PNA) наподобяват природните структури на ДНК и РНК, при които е образувано комплементарни дуплексни водородни връзки след сдвояване, подобно на фундаменталните базовите връзки, известни като Уотсън и Крик.

Базирайки се на представените данни усилията бяха насочени към изучаване на устойчивостта на наномашината при контакт с ензимите, когато е опакована в двуслойна липозомна капсула. В проведените експерименти се установи, че опаковането на ДНК в мицели от полиетиленгликол (PEG) с ниска молекулна маса осигурява частична защита срещу каталитичното хидролизиране на ДНКаза I. Този подход може с успех да се използва и при различни генетични манипулации, целящи запазване на структурата на олигонуклеотида. В тази насока експериментите доказаха, че защитата на ДНК линкери,

които са свързани в краищата си с наночастици зависи от количеството използван полиетилен гликол. Това е свързано с дебелината на капсулата, в която са пакетирани наномашините. Различната дебелина е свързана с получаването на повече слоеве, които обгръщат олигонуклеотидите. Получените резултатите разкриват още, че опакованите наномашини в двуслойни или многослойни везикули, чрез използване на повърхностно активното вещество (ПАВ) SPAN 80 могат да запазят наноустройството непокътнато от разрушителните ендонуклеази за много дълъг период от време. Получените микроструктури са представени на електронно-микроскопската снимка, представена на фигура 4.5. Интересен е фактът, че дори и да се инжектират интравенозно в тялото на експериментални мишки тези опаковани наномашини запазват своята функционалност.



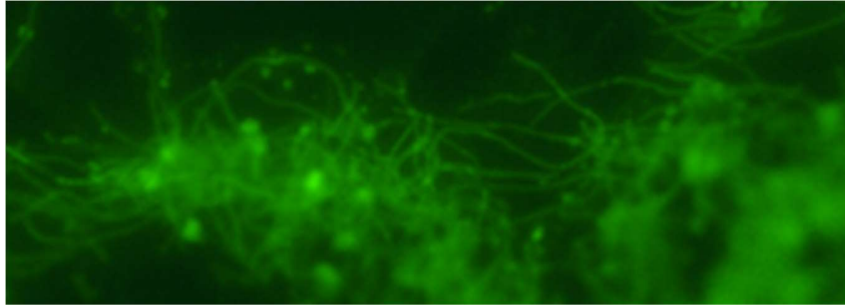
Фигура 4.5. Защита на ДНК наномашини, чрез опаковането им в двуслойни или многослойни везикули. За проява на изображението е използвано негативно оцветяване с уранил ацетат, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{UO}_2$.

Друг подход за защита на ДНК, който беше изследван в дисертационния труд, е посредством покритие на базата на олиголизин. Този подход се оказва приложим за ДНК наноструктури в някои случаи, като осигурява стабилност на наномашината срещу денатурация при физиологични концентрации на Mg^{2+} без да се наблюдават странични реакции. Това покритие обаче не винаги може да предпази ДНК-наномашината от повечето нуклеазни ензими, които са представени на таблица 4.1.

4.1.3. Защита на ДНК линкери и наномашини, чрез използване на инхибитори на ДНКазата

Направената литературна справка показва, че използването на инхибитори на ДНКазата за защита на линкери е много ограничено. На практика не разполагаме с данни, че такива подходи са използвани при приложение на ДНК-наномашини за целите

свързани с мониторинга и опазване на околната среда. Това се дължи и на факта, че специфичните и високоактивни инхибитори на ДНКазата са все още в процес на разработване. Някои ДНКази имат много специфични клетъчни протеинови инхибитори, които ги свързват и инактивират. В нашия експеримент беше използван G-актинът, който е добре познат инхибитор на ДНКаза I. Двата протеина се свързват необратимо и си кооперират един с друг при инхибиторната реакция. Известно е че апоптотичната каспаза-активирана ДНКаза (CAD) има своя инхибитор ICAD, която може да модулира активността на CAD. Въпреки това, не всички ДНКази имат такива инхибитори и, още по-важно, практическата употреба на тези протеиновите инхибитори все още не е доказана. Оказва се че много по-реалистични са подходите, базирани на RNAi или химически инхибитори. В проведените експерименти бяха получени данни, показващи силна активност за заглушаване на ДНКазата при определени продукти, използвани например, при култивирането на клетъчни култури или бактериални суспензии. Въпреки това, експериментите с култивирани клетки са лесен модел за изследване, тъй като те обикновено имат ниска активност на ДНКаза. В някои случаи е възможно и значително заглушаване на ензимите, чрез *in vivo* използване на siRNAs, което може да се окаже по-практично, отколкото използването на химически инхибитори. Експериментално доказаните инхибитори на ДНКазата, са както следва: инхибитор на ДНКаза гама, DR396 (4-(4,6-дихлоро-[1,3,5]-триазин-2-иламино)-2-(6-хидрокси-3-оксо-3H-ксантен-9-ил)-бензоена киселина); инхибитори на ДНКаза I/DNase II/EndoG JR-132 (1,4-фенилен- бис-аминогуанидин хидрохлорид) и IG-17 (1,3-фенилен-бис-аминогуанидин хидрохлорид). Силно мощен инхибитор на EndoG е PNR-3-80 (5-((1-(2-нафтоил)-5-хлоро-1H-индол-3-ил)метил)-2-тиоксодихидропиримидин-4,6(1H,5H)-дион) и PNR-3-82 (5-((1-(2-нафтоил)-5-метокси-1H-индол-3-ил)метил)-2-тиоксодихидропиримидин-4,6 (1H,5H)-дион). Тези инхибитори са в състояние да действат дори и в микромолярни концентрации. Тези данини могат да окажат допълнително предимство за запазване на функционалността на наномашините в пробата и дори за доставката на наноматериали до определени клетки. Както беше отбелязано по-горе при липса на специфични химични инхибитори на ДНКаза, може да се използват и някои двувалентни катиони. Експериментално беше установено, че най-добрите кандидати от тях са Zn²⁺ соли и Zn-хелати. Zn-хелатът от Zn-DIPS предпазва от фрагментация или хидролитично увреждане на наномашините, базирани на ДНК при *in vivo* условия. Предпазената структура нуклеинови киселини може да се наблюдава, при оцветяване с флуоресцентни багрила, като агрегати при наблюдение с флуоресцентен микроскоп, както е представено на фиг. 4.6.

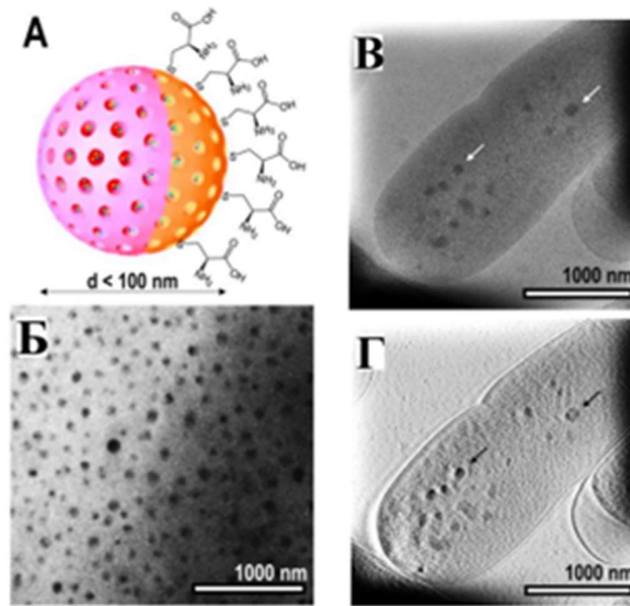


Фигура 4.6. Олигонуклеотиди, които остават непокътнати след химично инхибиране на нуклеазните ДНКаза с Zn^{2+} соли и Zn-хелати. Те могат да се наблюдават, като агрегати след обработка с флуоресцентно багрило и наблюдение посредством светлинен микроскоп.

4.2. Самоходен Янус наноимпелер, като наномашина за насочване и унищожаване на патогенни микроорганизми

4.2.1. Характеризиране на дизайна на Янус наноимпелер, като функционализирана наномашина за самозадвижване и система за доставяне на товари (хим. вещества)

Дизайнът на произведен двулицев наноимпелер Janus е показан на фиг. 4.7.А. Тази самоходна наномашина е функционализирана с лиганди от аминокиселина цистеин върху златното полукълбо с цел насочване към патогенната бактерия в микросуспензията. Получените връзки между повърхността на наноимпелера, покрита със златен нанослой, и обвивката на цистеиновите лиганди са здрави ковалентни (сигма) посредством тиоловите групи от аминокиселинния остатък. Фотопрозрачната мезопореста сърцевина на силициевия диоксид може да бъде заредена с различни материали, т.е. полезен товар (в нашия експеримент с Rhodamine 6G). Изходите на порите са затворени с органични съединения производни на азобензена. Произведените частици на наноимпелер притежават сферични геометрични форми (фиг. 4.7.Б.) със среден диаметър от около 90 ± 8 nm, както е потвърдено с ТЕМ наблюдение и измерването с динамично разсейване на светлина. Порите във вътрешността на ядрото на наночастиците имат много по-малък диаметър със среден диаметър между 2 и 5 nm, което позволява да бъдат наситени като система за доставяне на вещества, т.е. различни органични съединения (в настоящия експеримент, както е споменато по-горе с фотосенсибилизатора Rhodamine 6G).



Фигура 4.7. Самодвижещ се наноимпелер на Янус. (А) Схематична илюстрация на дизайна на наномашината. (Б) TEM микроснимка на наноимпелери Янус върху графитен въглероден филм с дебелина 20 nm. (В) TEM микрография на вградена в лед *E. coli*, белязани с наноимпелери Янус (както е показано със стрелките). (Г) Същият обект, наблюдаван с TEM с диференциален контраст на Хилберт и фазова пластина, с цел да се получи изображение с по-висок контраст; скалата за Б, В и Г = 1000 nm.

В експеримента се установи, че максимумът на пика на повърхностния плазмонен резонанс (SPR) на покритото със злато полукълбо е изместен към червената област на спектъра, поради конюгирането с цистеинови аминокиселинни остатъци. При възбуждане със син лазерен диод (InGaN) при дължина на вълната 475 nm (за около 10 минути) и енергийна доза 9 mW, азобензеновите връзки на изхода се възбуждат. Органичното багрило Родамин 6G се отделя в анализирания разтвор и неговото количество се измерва като функция на графика на абсорбционния максимум и концентрация. Като контролен експеримент частиците на наноимпелера бяха облъчени с еднаква мощност, но при дължина на вълната от 650 nm, при която не се отчита абсорбция на азобензеновата група. В контролния експеримент не се регистрира отделяне на органично багрило. Тези данни доказват безспорно, че наноимпелерът Янус реагира само на дължината на вълната, която задвижва фотоиндуцираната цис-транс изомеризация и възбуждането на азобензеновата група, която е свързана с вътрешността на мезоперите на наномашините. Освобождането на молекули на багрилото във вътрешността на мезопорите на наномашините при непрекъснато възбуждане е заложения подход в дизайна на наномашината. Той може да се използва, като механизъм за отделяне на товара.

Процесът зависи от облъчването, както е демонстрирано. Механизмът е известен, като "работното колело" на работа на наноимпелера Янус. Причината за протичането на светлинно-активирана реакция е, че възбуждането на азобензола върху повърхността на наночастиците индуцира молекулите на багрилата Rhodamine 6G, вследствие на което те повишат трептението си „напред-назад“ и по този начин ефективно придвижат движението на уловените органични съединения в системата за доставяне на товара. Този физикохимичен процес им позволява да преминават през вътрешността на порите, докато не излязат в разтвора на бактериална суспензия. Получените данни доказват способността на наномашината да освобождава органични товари и процесите да бъдат контролирани от дозата на приложеното външно лазерно облъчване, както и от дължината на вълната. Това означава, че абсорбираното количество светлинна енергия е квантувано.

4.2.2. Биооткриваща способност на наномашината, насочване и унищожаване на грам-отрицателни патогенни микроорганизми

За да се демонстрира способността на наноимпелера Янус за биологично откриване, като функционализирана наномашина, е изследвано и определено дали имобилизираните лиганди от аминокиселинната цистеин върху повърхността на златното полукълбо улесняват насочването и закрепването на наномашината върху заредената повърхност на бактериалната клетъчна мембрана. Когато функционализираната с лиганди наномашина на Янус се добави към бактериална суспензия на *E. coli* 0157:H7 при рН около 4.6, може да се измери локацията на пика на абсорбция на плазмона. Установява се, че той се измества към област с по-голяма дължина на вълната, т.е. наблюдава се т.нар. ефект на червено изместване. Причината за възникналия SPR оптичен ефект е, че наномашината може лесно да се насочи и да се закачи специфично към бактериите *E. coli* в суспензията. Процесът протича благодарение на биологичното разпознаване между наномашината и клетките, поради електростатичното взаимодействие между положително заредените аминокиселини на наноимпелера и отрицателните заряди на протеините върху бактериалната мембрана. Експериментът разкрива също, че степента на получената агрегация върху клетъчната мембрана е напълно зависима от концентрацията на наночастиците. За потвърждение на получените резултати и хипотези е извършен независим експеримент с биологичен крио-ТЕМ електронен микроскоп. Данните от микроскопичния анализ доказват хипотезата за поява на биологично разпознаване и закотвяне на функционализирания Янус наноимпелер върху грам-отрицателните бактерии *E. coli* (както е представено на фиг. 4.7.В). Както е показано на микроснимките на ТЕМ, наномашините са се доближили една до друга върху клетъчната мембрана, което е ясна индикация за възникналите електростатични сили на взаимодействията и биоразпознаване. За да се получи по-високо контрастно изображение на обектите,

микроорганизмите са вградени в лед и маркираните клетки са наблюдавани при ускорително движение на електроните от 300 kV, в присъствие на фазова пластинка и използване на Хилберт-диференциален контраст трансмисионен електронен микроскоп (фиг. 4.7.Г). При това силно-увеличено контрастирано изображение може да се наблюдава дискретна ултраструктура на бактериите, включваща клетъчната им стена без да е необходима предварителна химическа подготовка на пробата. Микроскопският анализ разкрива, че наномашините са прикрепени към клетъчната мембрана, но не са проникнали в клетъчната цитоплазма. При фотоконтролирани условия с лазерно облъчване наномашините могат да освободят полезния си товар и да генерират реактивни кислородни видове, които имат деструктивен и бактерициден (летален) ефект върху третираните патогенни бактерии.

4.3. Колориметричен наносензор от цитратно покрити сребърни наночастици за откриване на следи от арсен в подпочвени води.

Замърсяването на подпочвените и някои повърхностни води с арсен (III) е сериозен екологичен проблем, поради причиняването на остра токсичност. При неутрално рН арсен (III) се среща обикновено в околната среда, като слаба арсениста киселина (H_3AsO_3). В настоящия дисертационен труд е разработен лесен и ефективен колориметричен подход за откриване на следи от арсен (III), на базата на локализираната промяна на повърхностния плазмонен резонанс на сребърните наночастици.

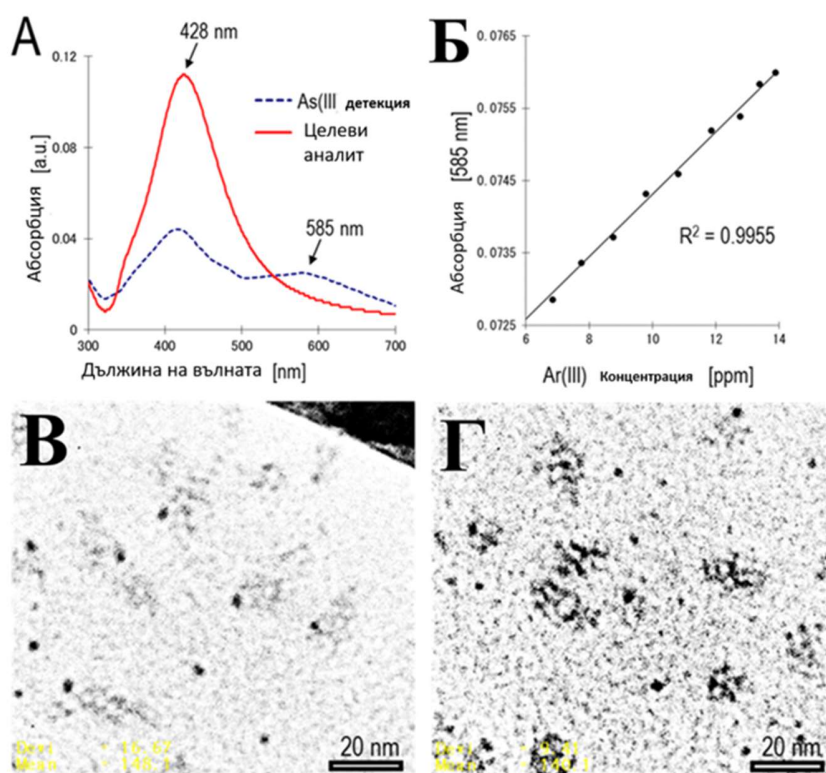
4.3.1. Замърсявания на природни обекти с арсен и мотив за изследването

Замърсяването на подземни и някои повърхностни води с разтворимата форма на арсен (III) е основен проблем в множество страни, главно в Азия, Африка и Южна Америка. Тази форма на арсена причинява остра токсичност и може да се акумулира в хранителните вериги. Като цяло, разтворимата неорганична форма на тривалентен арсен е по-разпространена и по-токсична от органичната му форма. Допустимото ниво на арсен в подземните води трябва да е над 10 ppb.

4.3.2. Оптична характеристика на сребърните наночастици, като наносензори във водна суспензия

Наличието на сребърни наночастици във водния разтвор (суспензия) след химична редукция на сол на AgNO_3 с лимонена киселина се доказва, чрез проявата на интензивен абсорбционен пик във видимата област на спектъра. Този пик води до качествени промени на цвета на суспензията от прозрачно светло-жълт до тъмен, който е съпроводен

с повишена мътност на разтвора (заради създавания оптичен ефект на опалесценция от получените наночастиците). Наблюдавания абсорбционен пик във видимата област се дължи на възбуждането на повърхностния плазмон. Това свойство е представено на фигура 4.8.А., където с плътна червена линия е показан спектъра на сребърните наночастици преди реакцията им с арсен. Характерното за сребърните наночастиците е, че притежават свободни електрони в проводимата им област на електронните им слоеве, благодарение на които се получава оптичният ефект, известен като така наречения повърхностно плазмонен резонанс. На него се дължи наблюдавания абсорбционен пик във видимата област на спектъра. От гледна точка на квантовата механика този ефект на наночастиците във водна суспензия се дължи на комбинираната вибрация на електроните на наночастиците в резонанс със светлинната вълна.



Фигура 4.8. Сребърни наночастици като колориметричен наносензор за откриване на ниски концентрации от арсен (III) при pH = 7.6. (А) Спектри на абсорбция на сребърни наночастици, покрити с лиганди от цитрат (червена плътна линия) и наночастици, реагирани с йони на As (III) (синя пунктирана линия). (Б) Граница на откриване на цитратно покритите сребърни наносензори при количествен анализ на разтворен арсен. Изображение с трансмисионен електронен микроскоп на (В) монодисперсни сребърни наночастици, покрити с цитратни лиганди и (Г) агрегирани наночастици, вследствие на протичането на сензорна реакция с As (III). Скала за В и Г = 20 nm.

Наблюдавания локализиран повърхностен плазмонен резонанс (SPR) е характерно явление за много метални наночастици (особено на златните и сребърните). Този ефект силно се влияе от диелектричната константа и йонната сила на заобикалящата ги среда. Пика на абсорбцията между 350 nm и 500 nm във видимия обхват на светлината е типичен за сребърните наночастици. С увеличаване на диаметъра на наночастиците, абсорбцията на плазмона се измества към по-ниска енергийна дължина на вълната, т.е. към червената или инфрачервената област на спектъра. Синтезираните сребърни наночастици, покрити с органични лиганди демонстрират висока стабилност в колоиден разтвор. Тази стабилност продължава дори и седмици след приготвянето им. Въпреки това, с течение на времето се установява, че пикът на абсорбцията се измества леко към червената област на спектъра (в рамките на 10-15 nm). Изместването е съпроводено и с намаляване на стойностите на интензитета на абсорбция. В същото време пикът на абсорбцията става по-широк. Всички тези показатели са индикация за протичане на масообмен и растеж на наночастиците в суспензията. Възможно е също и възникването на странични процеси на агрегация. Когато наносензорите взаимодействат с арсена се наблюдава възникването на втори пик (представен със пунктираната сина линия на фиг. 4.8 А), който може да променя своята интензивност в зависимост от концентрацията на анализа. Тъй като диелектричната константа се променя поради наличието на разтворен арсен (III) в разтвора на пробата, се наблюдава и червено изместване на локализирания пик на повърхностния плазмонен резонанс.

4.3.3. Колориметрично откриване на As (III)

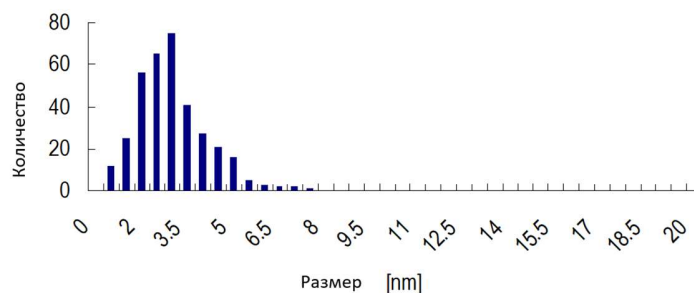
Функционализираните с цитрат сребърни наночастици са характерни с възникването на отрицателни заряди върху повърхността им, вследствие на карбоксилните групи на лигандите. Когато йони на As (III) са в непосредствен контакт с тези функционализирани наночастици, тогава в аналитичния разтвор възниква специфична реакция между йоните на арсена и органична обвивка на наночастиците. След протичане на реакцията на детекция се наблюдава промяна на автентичния абсорбционен спектър. Както е показано на фигура 4.8, UV-VIS спектрите на абсорбция разкриват, че сребърните наночастици, съдържащи арсен, проявяват два пика на абсорбция – един при 420 nm и втори около 585 nm (представен със синя пунктирана линия). По този начин, тъй като състава на пробата се променя с присъствието на As (III), се измерва червено изместване в SPR на наночастиците и това води до последваща промяна на цвета от жълтеникаво до синкаво. Такъв пик, който се измества в червената област и води до появата на вторична абсорбция не се наблюдава в тестовите експерименти с другите метални йони. Този резултат предполага, че постигнатият наносензорен ефект има селективна способност само за арсена в замърсени проби, получени от повърхностни или подземни води.

Границата на откриване е измерена в линейно закономерен диапазон, както е показано на Фигура 4.8.Б. Установено е, че границата на откриване на цитратно покритите сребърни наночастици е около 6 ppm. Наблюдава се също и линейна корелация ($R^2 \sim 0,995$) между абсорбцията при дължина на вълната 585 и концентрацията на As (III) в диапазона между 5 и 14 ppm. Наносензорната реакция на функционализираните сребърни наночастици за откриване на As(III) се дължи на специфичната реакция между хидроксилните (-OH) и карбоксилните групи (-COOH), адсорбирани на повърхността на наночастиците (както е споменато по-горе Ag NPs са функционализирани с лиганди от лимонена киселина), които действат като свързващи групи или комплексообразователи с разтворимите арсенови йони в замърсената проба. Поради това специфично взаимодействие се осъществява вторична реакция на агрегация между наночастиците, както е представено на трансмисионните електронно-микроскопски изображения на фигурите 4.8. В и Г.

За да се определи сензорната селективност на сребърните наночастици спрямо други разтворени метални йони, бяха приготвени аликвотни разтвори с обем от 1.5 ml в епруветки с pH = 7,5. Аликвотите съдържат хлориди на следните метали Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} и Ni^{2+} . Функционализирани наносензори бяха добавени към епруветките, разбъркани и оставени, докато се наблюдава качествена промяна на цвета. Експериментите доказаха, че само пробата, съдържаща арсен, води до видима промяна на цвета от жълто до тъмно сиво-зелено. При другите тестове не са наблюдават промени в цвета във видимия диапазон на светлинния спектър.

4.3.4. Електронно-микроскопски анализ на наночастиците.

Диаметърът и разпределението по размер на сребърните наночастици, като контролен експеримент и сребърните наночастици адсорбирани с As(III) йони, са определени с помощта на 120 kV трансмисионен електронен микроскоп (TEM). Хистограмата на отделните измерени размери на наночастиците е представена на фиг. 4.9. Те е получена чрез измерване на най-малко 350 наночастици върху микрографските изображения.



Фигура 4.9. Хистограма на разпределението по размер на сребърните наночастици, покрити с лимонена киселина.

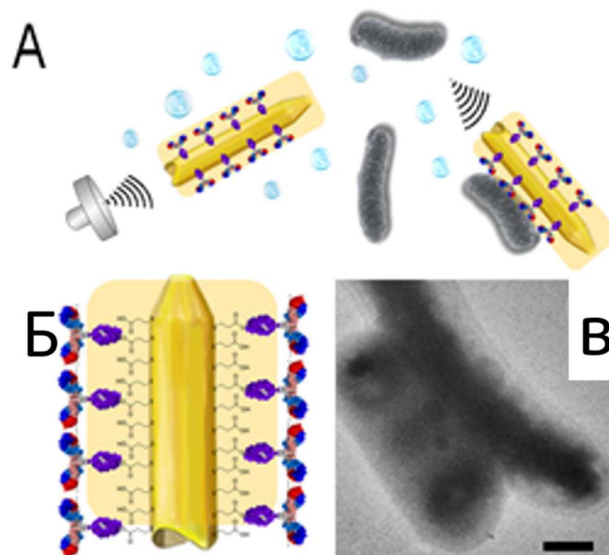
Наночастици са характеризирани с различни размери и хомогенни сферични форми (както е показано на фиг. 4.8.Б.). Те са получени чрез синтеза, описан в експерименталната част на дисертацията, като се използва редукция посредством натриев цитрат. Въпреки това, използването на единичен реагент като натриев цитрат за синтеза на сребърни наночастици води до метални частици в широк диапазон от размери между 1,5 nm до 8 nm. Изненадващо, по-големи наночастици с диаметър над 10 nm не са открити в пробата по време на ТЕМ наблюдение. Дори да се приложи промяна на условията в които протича реакцията, например повишаване на температурата, това не води до получаването на еднородни по размер сребърни наночастици. След взаимодействие с арсен се получават агрегати, съдържащи десетки или стотици наночастици. Както е показано на снимката, получена от трансмисионен електронен микроскоп (Фигура 4.8.Г.), образуваните агрегати също са хетерогенни, но с различни размери. Агрегатите не са стабилни в суспензията и след известен период от време се утаяване на дъното на епруветката. Това води до избледняване на цвета на пробата, което се наблюдава с невъоръжено око.

4.4. Ултразвуков биомиметичен наноробот за насочване и улавяне на патогенни бактерии от разнообразни природни среди

Изкуствените наномашини са демонстрирани с техните полезни свойства в области, като биоаналитична диагностика, екологично възстановяване и др. В настоящия дисертационен труд е проектиран биомиметичен наноробот, задвижван от ултразвук, който е функционализиран с клетъчна мембрана, съдържаща антитела за насочване и улавяне на патогенни бактерии (например *Escherichia coli*). Функциите на нанотобота са тествани, както в комплексни среди, съдържащи филтърни пори, така и в разнообразни природни среди. Тъй като конструираното наномасщабно устройство с външно завдижване е покрито с клетъчна стена, т.е. мембранните рецептори са имобилизирани на повърхността му, то е в състояние да улавя бактериите. Протича реакция на биоразпознаване ммежду мембранните протеини на Ешерихия коли и антителата, имобилизирани върху повърхността на робота, посредством ковалентни химични връзки. Поради тази причина полученото функционално наноустройство с право може да се наименува биомиметичен наноробот. Той показва способност за бърза детекция на микроорганизми при продължително акустично задвижване във воден разтвор. Както беше споменато освен разтвор, може да се приложи и при разнообразни природни среди, например бактериални суспензии. Предложеният дизайн дава нови възможности за създаване на широкоспектърни роботизирани платформи за детоксикация и ремедиация.

4.4.1. Свойства на биомиметичния робот

Биомиметичният наноробот е произведен лабораторно, чрез използване на протокол за електрохимично отлагане върху златни нанопроводи. Процесите са подпомогани от подходящ шаблон, както е описано в експерименталната част. Хидрофобната му повърхност е модифицирана първоначално с меркаптопропанова киселина (МРА), като органичен лиганд преди да бъде покрита след това с моноклонални антитела. Така получената биометичен наноробот е характеризирани посредством наблюдение с 120 eV трансмисионен електронен микроскоп. Както е представено на микроскопската снимката (фиг. 4.10), диаметърът на наноробота е около 400-500 nm и дължината му достига до 6000-7000 nm. Формата му в единия край е асиметрична, което е важно и необходимо условие за изпълнение на ултразвуковото задвижване. Представената геометрична асиметрия позволява на златните нанопроводници да преобразуват приложената акустичната енергия в аксиално движение с независима траектория, както е показано на фиг. 4.10.А. Друг ключов фактор, който влияе върху преобразуването на акустичната енергия в механично задвижване, е плътността на материала от който е изграден робота, както и неговия размер. Използваното в експеримента на елементно злато е много подходящо, защото златото е относително плътен материал. Следователно проектираният размер на наноробота е достатъчно голям, за да се постигне необходимото автономно задвижване в съответствие със закономерностите, свързани с ниското число на Рейнолдс. По този начин биомиметичният наноробот с акустично задвижване демонстрира синергичен ефект от засилване както на масовия транспорт, така и на насочените сблъсъци с целевите бактерии в средата или пробата.



Фигура 4.10. Илюстрация на дизайна, принципите и начина на работа на биомиметичния наноробот, задвижван от външен източник на ултразвук (А). Схема на наноробота, модифициран с меркаптопропанова киселина, който е покрит и с тънък слой от

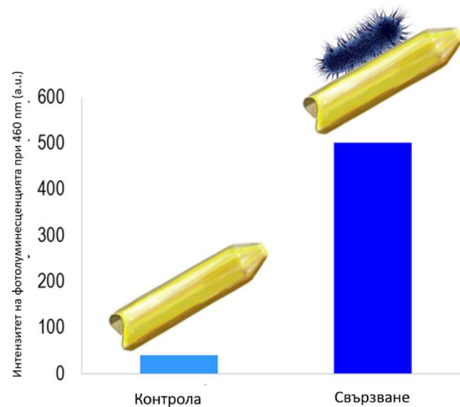
моноклонално антитяло (Б). TEM изображения на патогенна *E. coli* O157:H7, прикрепена към повърхността на наноробота (В).

Тънкото биопокритие на наноробота с моноклонални антитяла (както е показано на схемата на фигура 4.10.Б) се наблюдава, чрез негативно изобразяване в TEM наблюдението посредством уранил ацетат (фиг. 4.10.В). Съдържащият се протеин слой, покрит върху златната повърхност, се вижда ясно поради отрицателното оцветяване на обекта с редуцираните йони на $UO_2(CH_3COO)_2$. Наличието на протеиново съдържание е доказано още и качествено, чрез прилагане на нинхидринов тест. При този качествен анализ се наблюдава характерно лилаво оцветяване, което е в резултат на реакцията между реагента и аминокрупите на аминокиселинните остатъци. Протеиновото покритие може да остане конюгирано върху наноробота за относително дълъг период от време (най-малко 5-6 месеца), ако се съхранява в хладилник при 4 °С.

4.4.2. Демонстриране на ефекта на насочване и улавяне на патогенни бактерии в микробна суспензия

Както е показано по-долу, представеният мобилен биометичен наноробот позволява както засилено свързване към патогена в бульонната проба, така и ефективното му извличане от средата. Наличието на имобилизирано моноклонално антитяло позволява на наноробота селективно разпознаване на целевата бактерия в присъствие на други бактерии или вещества. Осъществяването на ефективно прилепване или свързване на бактерията към наноробота и последващото му изолиране от микробната среда се осъществява успешно в експериментите. Целият процес протича за значително кратко време на контакт (т.е. в рамките на 5-10 минути инкубация) при задвижване с 2,60 MHz ултразвук (2,0 V). Ако нанороботът е приложен без покритие от имобилизирани антитела, т.е. като немодифицирана златна повърхност или контролен експеримент, е налице липса на процеса на бактериална адхезия в суспензията. Това може да бъде лесно демонстрирано, чрез флуоресцентно оцветяване (например при използване на багрилото DAPI) на бактериалните клетки и по-нататъшно измерване на общия нормализиран интензитет на фотолуминесценция на уловените и екстрахирани клетки от суспензия, чрез измерване в спектрофотометър. Както е показано на Фиг. 4.11, отсъствието на бактерии върху т. нар. немодифициран наноробот (като контролен експеримент) се проявява с незначителен флуоресцентен интензитет. В случай на наноробот с покритие от антитела измерения интензитет на фотолуминесценция е забележително висок, което е индикация за успешно протичащи процеси на биоразпознаване и свързване. Получените експериментални резултати демонстрират уникалната характеристика на проектирания биомиметичен наноробот. Той се задвижва ефективно, чрез прилагане на външен

источник на ултразвук, и е в състояние да постигне селективно и бързо улавяне и извличане на патогенните микроорганизми. Въпреки това, покритието с моноклонални антитела дава възможност и за множество други разнообразни приложения на биологичните функции на наноробота. Те могат да бъдат демонстрирани, например чрез свързване и извличане на разтворени токсини в бактериалната среда. Изследванията върху способността на биомиметични нанороботи да абсорбират и неутрализират токсините все още са в начален етап. Съществуват някои експериментални трудности, например способността на моноклоналното антитяло да взаимодейства и свързва молекулите на токсините. Оказва се че тези биологични реакции на разпознаване протичат в по-малка степен и това затруднява ефективното отстраняване на токсина от средата по начина, който протича при бактериалните клетки. Независимо от това, потенциалните възможности за бъдеща ускорена детоксикация на различни замърсители или произведени токсини в реална проба биха могли да бъдат второ възможно приложение на проектираните биомиметични нанороботи, задвижвани чрез ултразвук.



Фигура 4.11. Нормализиран интензитет на фотолуминесценцията при 460 nm, съответстваща на DAPI-оцветените бактерии *E. coli* O157:H7. От лявата страна е представена невъзможността на немодифициран наноробот да улавя бактерии на повърхността си (контролен експеримент). От дясната страна е представен имобилизиран с антитела биомиметичен наноробот, който може да свърже бактерии към повърхността си. Поради тази причина интензитета на фотолуминесценцията е много висок.

4.5. Детекция и мониторинг на манган в замърсени питейни и подземни води, посредством сензорна реакция на фотоокисление с нанозим

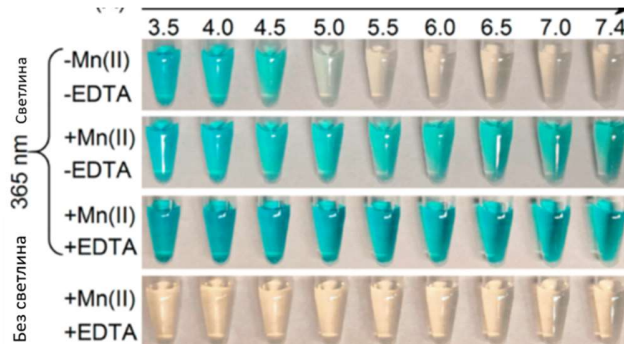
В това изследване са разработени ултра малки въглеродни квантови точки, като нанозим имитиращ природните ензими оксидази и пероксидази. Те се оказват чувствителни наносензори за откриване и мониторинг на манган в замърсени питейни и

подземни води. Замърсяването на околната среда с манган е често срещан проблем в резултат на множество антропогенни или промишлени дейности, като минното дело и селското стопанство. Разтворимите манганови йони са токсични за много организми и дори могат да причинят сериозни човешки заболявания. Използваната стратегия за сензорно откриване се основава на ензимно-имитирана реакция на фотоокисляване, при която въглеродните наноточки се разтварят в кисел разтвор и се осветяват с UV лъчение (дължината на прилаганата ултравиолетова светлина е $\lambda = 365 \text{ nm}$). При тези условия наночастиците действат, като фотосенсибилизатор и имитират функциите на природните оксидазни и пероксидазни ензими. Те са в състояние да произвеждат синглетен кислород, който може да бъде регистриран, посредством реакция на окисление с органичното багило-индикатор 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

4.5.1. Проби замърсени с манган

Манганът (Mn) е един от най-разпространените метали, намиращи се в земната кора. Подземните води, проникващи през скалите и почвата, могат да разтворят различни минерали, съдържащи Mn. В природата мангана съществува главно в неговите окислени химични форми, като Mn^{2+} и Mn^{3+} . Например, във водоносните хоризонти, където количеството разтворен кислород е ниско, могат да се открият по-високи нива на разтворен Mn^{2+} . Така най-високите концентрации на манган се срещат предимно в подземните води, и по-рядко в повърхностните или питейни води. Целта на настоящото изследване в дисертационен труд е да се разработят въглеродните квантови точки, като нанозими (имитиращи природните оксидази и пероксидази). Тези нанозими могат да участват в наносензорна реакция за откриване и мониторинг на разтворен Mn в питейни и подземни води. За тази цел фотоокислителните свойства на въглеродните наночастици са изследвани и анализирани, при облъчване с ултравиолетова светлина (дължина на вълната 365 nm). При тези условия наночастиците действат, като ефективни фотосенсибилизатори и генерират синглетен кислород ($^1\text{O}_2$). Процесът зависи от pH на разтвора (реакцията протича при кисели условия) и наличието на синглетен кислород може да се установи, чрез окисляване на органичен индикатор като 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ). Въпреки това, във воден разтвор миграцията на $^1\text{O}_2$ е много кратка и дезактивирането до неговото триплетно състояние става много бързо. Така че, за да се ускори процесът на фотоокисление, е необходимо използването на катализатор-медиатор, който може да подобри ефективността на преноса на електрони. При селекцията на медиатор се оказва, че манганът притежава много добри свойства и е най-подходящ кандидат, тъй като Mn^{3+} (във висшата си степен на окисление) притежава силна окислителна способност. Това свойство е ключовата стъпка в настоящото изследване към разработването на нанозим за сензорно откриване за манган. Добавянето на Mn^{2+} към

водния разтвор значително засилва окисляването на багрилото TMB. Този процес протича с много висока ефективност особено при ниски стойности на рН (т.е. в кисела среда) на реакционната смес. Това е илюстрирано подробно, чрез механизма на реакцията, който е представен на фигура 4.12. При другите метални соли не се наблюдава подобен сензорен ефект. Оказа се, че само манганът може да демонстрира такова засилване на реакцията на фотоокисление и затова вложените усилия бяха концентрирани за развитие на тази реакция като сензорен процес.

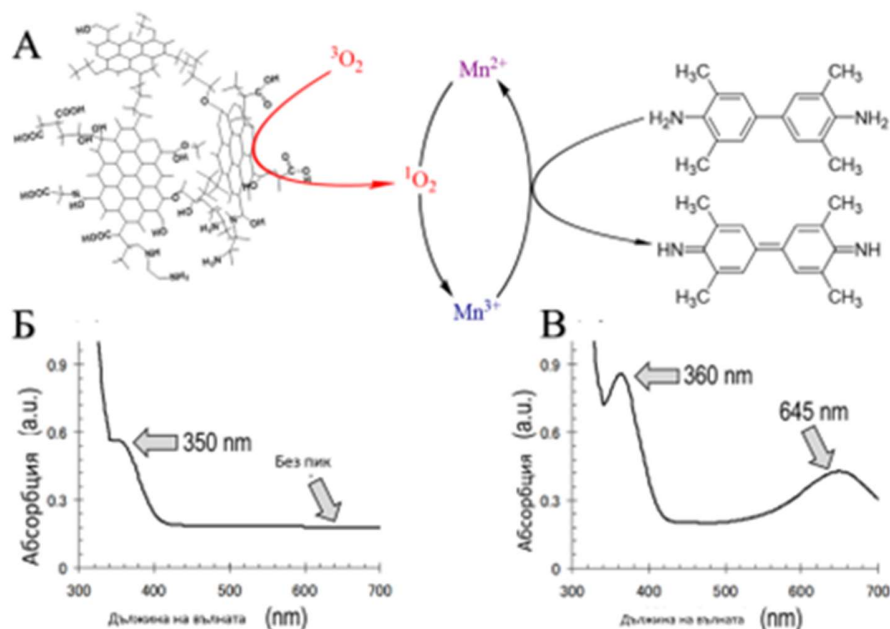


Фигура 4.12. Наносензорна реакция на въглеродни квантови точки за откриване на манган. Реакцията протича най-ефективно при кисело рН на разтвора и наличие на комплексообразовател, като етилендиаминтетраоцетна киселина (EDTA).

4.5.2. Механизъм на наносензорната реакция

Облъчените с UV светлина ($\lambda = 365 \text{ nm}$) въглеродни квантови точки са в състояние да преобразуват кислородната молекула от триплетно енергийно състояние ($^3\text{O}_2$) в синглетно състояние ($^1\text{O}_2$) на валентните електрони, както е показано на фотохимична реакция (фигура 4.13.A). Поради разликите в енергийните състояния на електроните във валентния слой, синглетният кислород е много по-реактивен в сравнение с неговия триплетен аналог. Генерирането на синглетен кислород е процес, зависим от рН на средата (обикновено при $\text{pH} < 4.5$). В резултат на това органичното багрило TMB се окислява по-лесно в кисела среда и цветът на реакционния разтвор става син. Без използване на манган като катализатор, UV облъчването само по себе си не може да окисли TMB. Манганът е добър кандидат за медиатор на електрони, тъй като двойката редокс потенциал на Mn(II)/Mn(III) има силна окислителна способност, стабилност и значително повишава ефективността на преноса на електрони в реакционния разтвор. Протичащата окислително-редукционната реакция може да бъде значително ускорена в присъствието на EDTA, който се използва като комплексообразовател на мангана. Предполагаме, че водният Mn(II) може да бъде стабилизирани при комплексообразуване с тези лиганди, т.е. образуване на Mn(III) EDTA хелатен комплекс. Без EDTA реакцията на фотоокисляване протича само при кисело рН на разтвора. В случаите когато се добави EDTA, TMB може да се окисли дори при неутрално

pH. Причината, поради която тази реакция протича при UV осветление, е, че пикът на абсорбция на C-точките е разположен около 350 – 360 nm (фиг. 4.13.Б). След осветяване с 365 nm светлина, се появява пик на абсорбция при 645 nm (фиг. 4.13.В) и реакционният разтвор се оцветява в характерния син цвят. Реакцията протича макар и по-бавно при облъчване със естествена слънчева светлина. Стабилността на комплекса полученият Mn(III)/EDTA позволява подробно изследване на сензорната реакция на фотоокисление. Например, етапът на осветяване може да бъде отделен от реакцията на окисление. Това се постига при добавяне на TMB 5 минути след изключване на UV лампата. Тъй като разтворът все още съдържа Mn(III)/EDTA комплекс по това време, окисляването на TMB може да настъпи моментално. Въпреки това, без наличието на EDTA или UV тази забавена реакция на постокисляване не може да протече.

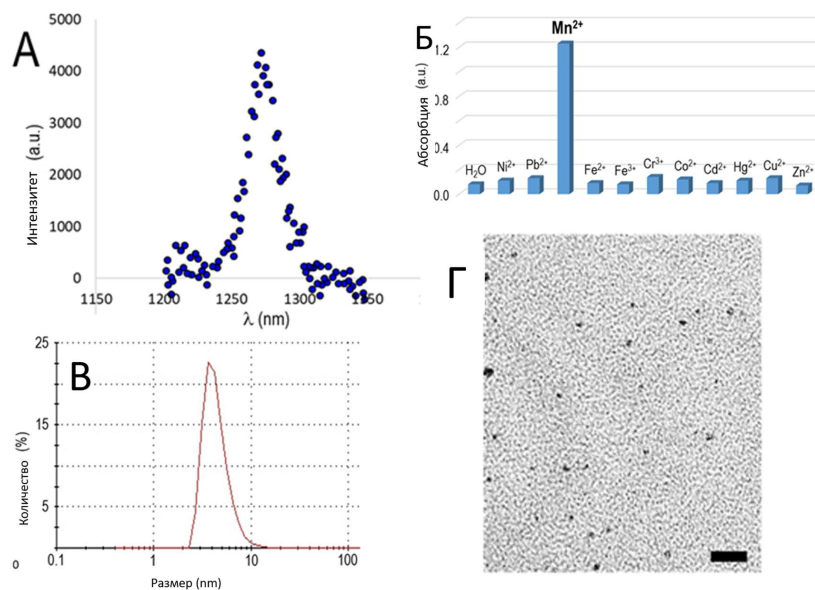


Фигура 4.13. Схематична илюстрация на фотохимичната реакция за генериране на синглетен кислород, както и окисляване на багрилото TMB, чрез медирана с манган катализа (А). Спектри на абсорбция на: (Б) смес от C-точки и редуцирана форма на TMB и (В) смес от C-точки, EDTA, манганови йони (1 mM) и окислена форма на TMB след осветяване с UV облъчване.

4.5.3. Характеризиране на нанозима

Както бе споменато по-горе, ултра-малките въглеродни квантови точки реагират, като фотосенсибилизатор наносензор за откриване и наблюдение на реакциите на манган. Реакцията протича успешно само в случаите при облъчване със светлина.

Разпределението им по размер се установява, чрез комбиниран анализ, включващ измерване, посредством динамично разсейване на светлината (DLS) и наблюдение с трансмисионен електронен микроскоп (120 kV TEM). DLS анализът (представен на фигура 4.14.В) показва, че хидродинамичният диаметър на наночастиците е разпределен в диапазона между 2 – 6 nm със средна стойност от 3 nm. Тези данни са независимо подкрепени от снимковия материал, получен чрез TEM наблюдение (фигура 4.14.Г). При електронно-микроскопското измерване въглеродните квантови точки се появяват на микрографската снимката, като наночастици, които са еднакви по размер. Формата им винаги е сферична. От TEM изображението може да се видят ясно (или разграничат) само по-големите наночастици (с диаметър > 3 nm). Причината за това е, че те се характеризират с по-висок контраст от фоновата грануларност на въглеродния филм, който е използван като подложка за микроскопското наблюдение. И въпреки това, понякога е предизвикателство да се разграничи ясно точното местоположение и очертанията на ниско контрастните наночастици. Това е така, защото изобразяването на въглеродни наноструктури върху въглеродни решетки не позволява точното определяне на обектите.



Фигура 4.14. (А) Фосфоресцентни спектри на синглетен кислород ($^1\text{O}_2$), получен чрез индуциране на облъчените въглеродни квантови точки в смесен разтворител $\text{CD}_3\text{CN} - \text{D}_2\text{O}$ (смес от деутериев ацетонитрил и деутериева вода). (В) Тест на метални катиони с концентрация 1 mM за окисление на TMB в присъствието на EDTA (1 mM). Анализите са извършени при осветяване с UV светлина, с дължина на вълната $\lambda = 365$ nm. Интензитетът на абсорбция на окисленото багрило се измерва при 645 nm. Сред изследваните метали само манганът има способност за засилено окисляване. Скала = 10 nm.

За да се реализира напълно потенциалът на въглеродните наноточки, като нанозими трябва да се посочат и техните ключови предимства. Те притежават отлична водоразтворимост, химическа стабилност и ниска токсичност. Недостатъците на разработения нанозим са свързани предимно с трудностите, съпътствани при пречистването на тези наноматериали (необходимо е високоефективна течна хроматография).

4.6. Използване на клетъчни структури и ензими за биотехнологично рециклиране и извличане на целеви метали от вторични отпадъци

Отпадъчните електронни устройства и оборудване са важен вторичен източник за възобновяем добив на ценни метали и суровини. Минералните биотехнологии са обещаваща алтернатива на настоящите промишлени химически технологии за третиране на отпадъци, които често са придружени с отрицателно въздействие върху околната среда.

4.6.1 Видове електронни отпадъци, които могат да бъдат подложени на биотехнологично рециклиране

Отпадъците от електрическо и електронно оборудване (WEEE), които често се наричат още електронни отпадъци (или E-waste), са изхвърлени устройства, които са в края на експлоатационния си живот и не могат да се използват повече от потребителите. WEEE отпадъците са особено опасни за околната среда, по-специално отпадъците получени от печатните платки. От друга страна, E-отпадъците могат да се разглеждат още и като важен вторичен източник на ценни и благородни метали. Елементният състав на изхвърлените устройства често може да бъде силно променлив и сложен (в зависимост от търговската марка).

В настоящия дисертационен труд е разработена биотехнологична стратегия за рециклиране, възстановяване и извличане на критични и конвенционални метали, като наночастици от електронни отпадъци. Акцентът в изследванията е поставен върху елементите мед и злато, но освен тях са изучени наличието и на други елементарни метални съдържания, получени след рециклиране на платките. Първо, металите бяха биоизлугвани в двуетапна стратегия съдържаща автотрофни и хетеротрофни микроорганизми за рециклиране, чрез биохимични механизми включващи редоксолиза, ацидолиза и комплексолиза. За целта биологичната микросуспензия среда, съдържаща електронни отпадъци, се инокулира с култури от хемолитотрофни ацидофилни желязо- и сяроокисляващи микроорганизми. В този случай биогенно получената сярна киселина (H_2SO_4) и наличието на разтворимо желязо (от пирита, FeS) действат като окисляващи и

реагиращи химични агенти съответно, чрез механизми на ацидолиза и редоксолиза на биоизлугване. Металите съдържащи се в платките се мобилизират (т.е. разтварят) до тяхното йонно-дисоциирано състояние в средата, чрез бактериалните процеси на ацидолиза или редоксолиза. Медта се намира предимно в печатните платки (използвани за принтери) и се третира в суспензия, съдържаща автотрофни микроорганизми, които реагират като окислителни на желязо и сяра (при прилагане на бактерии от рода *Acidithiobacillus ferrivorans* и *Acidithiobacillus thiooxidans*). Златото може да бъде ефективно отстранено от WEEE чрез използване на бактерии от рода *Pseudomonas putida* при стайна температура. Второ, осъществена е биосинтеза на наноматериали (нано-машабни частици с различна форма и големина) и по този начин е извършено извличане на тези метали от концентратите. Бактериите и гъбичните (фунги) микроорганизми са подходящи за производство на метални наночастици чрез секреция на NADH зависими ензими, необходими за извънклетъчните процеси. Механизмът за образуване на наночастици в разработената стратегия е базиран на използване на клетъчни мембранни ултраструктури и участие на редуциращи ензимни системи, имитиращи природни наномашини както следва:

А) Металните йони са уловени на повърхността или в мембранните образувания на микробните клетки. Златните, сребърните и паладиеви йони се привличат поради електростатичните взаимодействия с наличните ензимните карбоксилатни групи на отрицателно заредената клетъчна стена. Възможно е образуването на хирални комплексни съединения.

Б) Катионите се редуцират метаболитно, чрез използване на множество редуциращи агенти (например, редуктазни ензими и протеини, екзополisahарид и хинони на електронни совалки), Също така те може да се утаяват като наночастици с различен размер и форма (предимно сулфиди или метални наночастици). В резултат на това остатъците от неорганични метали се отлагат върху повърхността на клетките, чрез адсорбция или съвместно утаяване. Тези процеси бяха успешно документирани, посредством използването на биологичен електронен микроскоп.

4.6.2. Химичен анализ на използваните за рециклиране вторични отпадъци (смлени електронни платки)

Химическият анализ на отпадъците от печатни платки или други електронни отпадъци (описани в раздел Материали и методи) показва разнообразие от метали, както е представено в Таблица 4.2. Концентрацията на мед (Cu) е най-висока (около 20 %) във всички различни типове платки. След Cu, желязото (Fe) и алуминият (Al) са другите най-често срещани елементи сред анализираните метали с концентрации съответно около 3% и 4%. Мобилните телефони показват по-висока концентрация на мед и злато в сравнение

с другите електронни отпадъци. Една от причините са микроплатките използвани в техния дизайн за получаване на компактни размери. Определено е също така установеното изменение в концентрациите на алуминий (Al), никел (Ni), цинк (Zn) и кадмий (Cd).

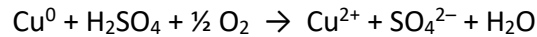
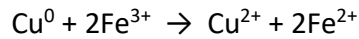
елемент	компютърни части десктопи		мобилни устройства
Cu	102.3 ± 5.1	201.8 ± 9.7	229.8 ± 8.5
Al	16.3 ± 3.9	34.8 ± 2.1	9.8 ± 3.7
Fe	3.3 ± 0.1	48.8 ± 7.3	39.7 ± 2.4
Zn	0.27 ± 0.01	4.9 ± 1.1	3.7 ± 0.1
Ni	0.88 ± 0.02	2.5 ± 0.2	10.4 ± 0.8
Cd	0.11 ± 0.01	0.18 ± 0.01	1.1 ± 0.1
Au	0.034 ± 0.002	0.023 ± 0.001	0.335 ± 0.002

Таблица 4.2. Концентрации на установените метали (в концентрации mg/g) в рециклираните електронни отпадъци.

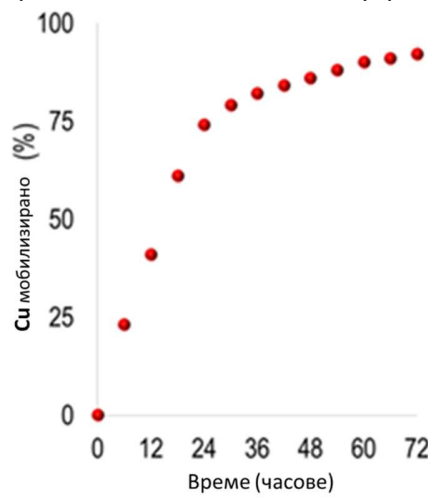
4.6.3. Биологично излугване на металите в две стъпки

Както беше споменато по-горе, процесите на рециклиране се извършват в две стъпки. Първата стъпка е известна, като биоизлугване и тя се осъществява посредством ацидофилни микроорганизми. По този начин медта е биоизлугвана от отпадъците, получени от смлени платки с много висока ефективност. В много от проведените експерименти полученият добив е над 90 % (както е показано на фигура 4.15). Контролните експерименти доказват, че ацидофилните микроорганизми, като *A. thiooxidans* и *A. ferrivorans* са отговорни за мобилизирането на мед от отпадъците и преминаването ѝ под формата на разтворима сол във фазата на водната суспензия. По време на процеса рН, на отпадъчните води, може леко да се понижи. Смлените електронни отпадъци често могат да оказват инхибиторен ефект върху дейността на микроорганизмите. За да се смекчи инхибиторният ефект на електронните отпадъци ацидофилните бактерии първо се инкубират в биоизлугващата среда, докато се установи бактериална суспензия с висока оптична плътност. Впоследствие към системата се добавят смлени електронни отпадъци с фиксиран размер и количество. Бактериалната активност се проследява чрез измерване на рН на средата и окислително-редукционния потенциал (ORP). Тези два параметъра показват протичането на ензимни реакции и наличието на метаболитни механизми, като ацидолиза и редоксолиза, които са в основата на биоизвличането. През първите 24 часа на биоизлугването на мед, концентрацията на разтворени Cu(II) йони в концентрата показва тенденция към логаритмично увеличение. След това скоростта се намалява, което обикновено се

наблюдава при процесите на биоизлугване. Ролята на ацидофилните микроорганизми е да катализират окисляването на Fe^{2+} до Fe^{3+} и по този начин да генерират сярна киселина (H_2SO_4). Тогава биогенно произведените Fe^{3+} и H_2SO_4 извличат съдържанието на Cu^0 при ниско рН и високо ORP, в съответствие с химичните реакции:



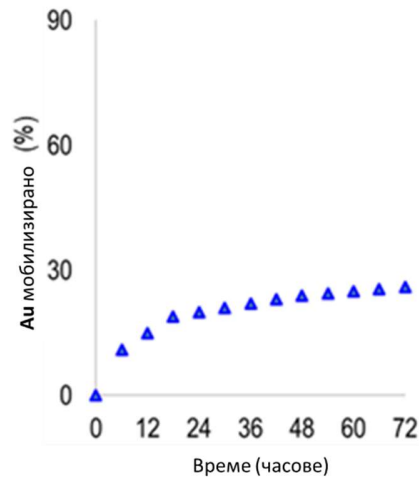
Първата реакция протича при по-бавна, отколкото окислението посредством сярна киселина и разтворения в реакционната смес кислород. Интересното е че при взаимодействие на мед със сярна киселина не се отделя водород, вместо това като краен продукт се получава вода, т.е. реакцията наподобява неутрализация на амфотерен оксид.



Фигура 4.15. Профил на биоизлугване на разтворими Cu(II) йони от електронни отпадъци, посредством ацидофилни микроорганизми.

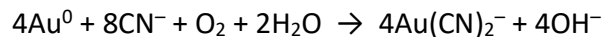
Реакцията на окисление води до повишаване на рН и намаляване на ORP. Това е първата причина за намалена скорост на биоизлугване след наблюдаваната логаритмична тенденция. Втората причина е инхибирането на микробната активност от освободените токсични съединения (това са предимно ароматни съединения, като феноли, полибромирани дифенилови етери, тежки метали и други, съдържащи се в смлените електронни отпадъци, които са представени в таблица 4.2).

Втора стъпка – биоизлугване чрез цианиди, произвеждащи хетеротрофни микроорганизми. След излугването на медта, проведения химичен анализ доказва, че в остатъка, съдържащ отпадъчни материали, все още остава значително количество, както злато, така и някои други благородни метали. За извличане предимно на златния компонент, останалият материал се третира с цианид. Цианида обичайно се произвежда от щамовете на *P. putida*. Кинетиката на извличането на злато, чрез биогенно получения цианид е представено на фиг. 4.16.



Фигура 4.16. Биоизлугване на златния компонент от остатъчния отпадъчен материал в пробата, чрез използване на биогенен цианид, получен от *Pseudomonas putida*.

Чрез този подход е постигнато най-високо извличане на златото в представените експеримент, което е около 30 %. Известно количество обаче от неразтворено злато (около 15-20 %) е мобилизирано по време на биоизлугването с ацидофили в предишната стъпка. Експериментите за подобряване на ефективността на микробното излугване на златото все още са в ход. Експериментите също така демонстрират корелация между концентрацията на биогенен цианид и ефективността на мобилизирането на златния компонент. Стехиометрично, това е показано на химическата реакция по-долу:



Консумацията на цианид може да е индикация, че освен златния компонент има и други благородни метали или мед, които не са били излужени в предишната стъпка. Освен това цинка, никела и желязото също могат да образуват стабилни комплекси с циано групата (например фероцианати). При висока концентрация тези метални соли може да се консумира по-голямо съдържанието на цианид и процесът на биоизлугване на златото да бъде блокиран. Реакцията на блокиране продължава, докато се изчерпи съдържанието на металите, които реагират с цианида преди златото в електронните отпадъци. Процесът на цианиране зависи, както от температурата, така и от рН на средата. Оптимално установените условия в експериментите за излугване на златото обикновено са в интервала на алкална среда при рН > 10,5. Следователно, по-високото рН благоприятства ефективността на химическата реакция за мобилизиране на метала и преминаването му в течна фаза. Независимо от това, при проведените биотехнологични експерименти трябва да се използва оптимално рН (което е близо до неутралното) по отношение на физиологичните изисквания на бактериите.

Биосинтезата на наночастици е извършена върху двуетапните биоизлужени и по този начин рециклирани разтворими форми на металните соли. Установено е, че по време на биосинтезата цветът на третираната суспензия постепенно потъмнява, докато се промени изцяло в черен. Това е видима е качествена индикация за края на успешния биогенен синтез на наночастици (или за получените наноразмерни материали). От микробната суспензия се получава утаена проба (пелета) с помощта на центрофуга. След промиване и пречистване на утайката може да се анализират размера, формата и елементния състав на наночастиците. Получените експериментални данни са представени върху микрографските изображения, получени от сканиращ електронен микроскоп. Микроскопският анализ разкрива, че наночастиците са с различни размери, но повечето от тях притежават диаметър по-малък от 10 nm. Те се характеризират и с различни геометрични форми. Преобладават кръглите наночастици, но могат да се открият и други форми - триъгълни или сложни. Освен това повечето наночастици са склонни да образуват агрегати. Вероятната причина е хидрофобната повърхност на металните наночастици и склонността да се доближават една друга. Процесите на агрегация са особено изразени, когато в разтвора преобладават различни соли на буфера или метаболитни съединения, получени от микроорганизмите.

ИЗВОДИ И ЗАКЛЮЧЕНИЯ

1. ДНК линкери като важна част от наномашините.

Установено е, чрез различни методи, че защитата на ДНК линкерите се осъществява чрез модифициране на линкерите или чрез инхибиране на ДНКазите.

2. Функционален наноимпелер на Янус.

Предложеният дизайн, на наноимпелер на Янус, отваря ново поле за разработване на многофункционални наномашини за инхибиране на патогенни микроорганизми.

3. Колориметрично откриване на арсен.

Разработен е метод за откриване на арсен (III) във водна среда, чрез реакция с функционализирани с цитрат сребърни наночастици.

4. Биометичен наноробот, задвижван от ултразвук.

Разработен е биометичен наноробот, с цел да се откриват и изолират патогенни бактерии.

5. Фотооксидаза, имитираща нанозим.

Разработени са ултра-малки въглеродни наноточки като нанозим за откриване и мониторинг на манган.

6. Биотехнологично рециклиране, чрез извличане на наноматериали.

Разработен е нов биотехнологичен метод за рециклиране, възстановяване и извличане на метали като биосинтезирани наночастици от електронни отпадъци

НАУЧНО ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

1. За първи е предложен метод за запазване на цялостта и функционалността на наномашини базирани на ДНК или РНК олигонуклеотиди в околната среда, чрез пакетирането им в двуслойна везикула посредством нейонното повърхностно активно вещество Span® 80.
2. Създадения самоходен Янус наноимпелер е важен с използването си в множество приложения в областта на биосензорната технология, минералната биотехнология и опазването на околната среда.
3. Направените изследвания потвърждават, че сребърните наночастци могат да се използват като колометрични наносензори за детекция и мониторинг на замърсени води.
4. Потвърдено е, че патогени микроорганизми могат да бъдат уловени и премахнати чрез създадения биометичен наноробот, задвижван чрез ултразвук.
5. За първи път са получени нанозими използващи се за детекция и мониторинг на манган в замърсени води.
6. Важен приложен принос е предложението еколого-целесъобразен биотехнологичен подход за рециклиране на важни метали (мед, злато, кадмий и др.) от вторични отпадъци. Този подход може да намери своето потенциално приложение в различни технологични схеми и инсталации за рециклиране на отпадъци, съдържащи метали. Той се отличава със своята ниска себестойност и минимизиран негативен ефект върху околната среда.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ КЪМ ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **S. A. Toshev**, A. R. Loukanov, S. Nakabayashi, DNA Linkers: the weakest link in the artificial nanomachines, *Topical Issues of Rational Use of Natural Resources* (2019) 570–575. Taylor & Francis Group, CRC Press, London. ISBN: 978-0-367-85720-2 (SCOPUS)
2. **Svetlin Toshev**, Alexandre Loukanov, Saim Emin, Seiichiro Nakabayashi, Biotechnological recycling and recovery of metals from secondary raw materials through biogenic synthesis of nanoparticles. *Sustainable Extraction and Processing of Raw Materials Journal* **2** (2021) 68–73. ISSN: 2738-7151, DOI: 10.5281/zenodo.5594998 (Peer Review)
3. **Svetlin Toshev**, Alexandre Loukanov, Detection and monitoring of manganese in drinking and groundwater through photo-oxidation sensory reaction with ultra-small carbon nanodots, *Sustainable Extraction and Processing of Raw*

- Materials Journal*, Vol. 1(1) (2020) 90–93. ISSN: 2738-7100, DOI: 10.5281/zenodo.4270156 (Peer Review)
4. **Svetlin Toshev**, Alexandre Loukanov, Seiichiro Nakabayashi, Colorimetric sensor from citrate capped silver nanoparticles for trace detection of arsenic (III) in groundwater, *Journal of Mining and Geological Sciences*, Vol 62, Part II (2019) 170–173. ISSN: 2682-9525
 5. **Svetlin Toshev**, Alexandre Loukanov, Seiichiro Nakabayashi, Design of propelling Janus nanoimpeller as a nanomachine for targeting and destruction of pathogenic microorganisms, *Journal of Mining and Geological Sciences*, Vol 62, Part II (2019) 174–178. ISSN: 2682-9525
 6. **Svetlin Toshev**, Alexandre Loukanov, Ultrasound-propelled biomimetic nanorobot for targeting and isolation of pathogenic bacteria from diverse environmental media, *Journal of Mining and Geological Sciences*, Vol 63 (2020) 105–107.

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. XV- International Forum Contest of students and young researchers "Topical Issues of Rational Use of Natural Resources" (May 13-17, 2019, St. Petersburg, Russia).
2. 62-ра Международна научна конференция в МГУ „Св.Иван Рилски“, 2019
3. 63-та Международна научна конференция в МГУ „Св.Иван Рилски“, 2020
4. 64-та Международна научна конференция в МГУ „Св.Иван Рилски“, 2021

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам своята благодарност на научния си ръководител проф. дн Александър Луканов за оказаната подкрепа, насърчаване и помощ през целия период на изготвяне на настоящия дисертационен труд.