



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΡΓΥΡΟΥ
ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ
ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ *Haematococcus pluvialis***

Διπλωματική Εργασία

Ευγενία Κόνταρη

Επιβλέπουσα:

Διομή Μαμμά, Επικ. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2023

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2021-2022 και 2022-2023 στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (Ε.Μ.Π.), υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας κα. Διομής Μαμμά.

Με την εκπόνηση της Διπλωματικής Εργασίας μου δόθηκε η ευκαιρία να αποκτήσω τόσο μία πληθώρα επιστημονικών γνώσεων όσο και σημαντική εργαστηριακή εμπειρία. Ολοκληρώνοντας αυτό το κεφάλαιο της ακαδημαϊκής μου πορείας, θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά την κα. Διομή Μαμμά για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα και που από την αρχή έδειξε εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου αλλά και για την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Ένα ιδιαίτερα μεγάλο «ευχαριστώ» στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια στο τμήμα Biomedical Engineering του πανεπιστημίου Tufts στη Βοστώνη κα. Μαρία Σαββίδου για την εξαιρετική συνεργασία μας. Αν και σχεδόν οχτώ χιλιάδες χιλιόμετρα μακριά και με μεγάλη διαφορά ώρας, ήταν πάντα διαθέσιμη, μου προσέφερε πολύτιμες γνώσεις, με καθοδηγούσε σε κάθε βήμα έστω και εξ' αποστάσεως και έδειξε εξαιρετική εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου και στις δυνατότητές μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια κα. Στέλλα Καλαντζή καθώς και κάθε ένα μέλος ξεχωριστά από την υπόλοιπη ομάδα του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές που μου προσέφεραν κυρίως σε τεχνικά κομμάτια ανά πάσα στιγμή και το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου Τεχνολογίας Ανόργανων Υλικών, του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας και του Εργαστηρίου Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., καθώς και τον κ. Πέτρο Τσακιρίδη από το Εργαστήριο Μεταλλογνωσίας της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων Μεταλλουργών του Ε.Μ.Π. για τη συνεργασία τους και τη σημαντική βοήθειά τους.

Να ευχαριστήσω και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την Καθηγήτρια κα. Ευαγγελία Παυλάτου και τον Καθηγητή κ. Θεόδωρο Θεοδώρου, για τον χρόνο που διέθεσαν και την ενδιαφέρουσα συζήτηση.

Τέλος, το πιο μεγάλο «ευχαριστώ» θέλω να το αφιερώσω στους κοντινούς μου ανθρώπους, την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την υποστήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόηση που έδειξαν όλο αυτό το διάστημα.

Ευγενία Κόνταρη

Αθήνα, Φεβρουάριος 2023

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο τη σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) χρησιμοποιώντας το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *Haematococcus pluvialis* και τη μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραγόντων και της αντιβακτηριακής δράσης των AgNPs.

Τα νανοσωματίδια αργύρου διαθέτουν εξαιρετικές φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες, όπως αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση, με εφαρμογή σε ένα ευρύ φάσμα κλάδων, όπως τα τρόφιμα, το περιβάλλον, την επιστήμη των υλικών και τη βιοϊατρική. Οι φυσικές και χημικές μέθοδοι σύνθεσης χρησιμοποιούνται ευρέως αλλά οι πράσινες μέθοδοι αναπτύσσονται διαρκώς λόγω της μη χρήσης τοξικών χημικών και της σύνθεσης πιο βιοσυμβατών και βιοασφαλών AgNPs. Τα μικροφύκη αποτελούν πλούσια πηγή βιομορίων, όπως πρωτεϊνών, πολυσακχαριτών και δευτερογενών μεταβολιτών, που μπορούν να λειτουργήσουν ως αναγωγικοί και σταθεροποιητικοί παράγοντες δημιουργώντας ένα «περίβλημα» γύρω από τα AgNPs, το *carrying*. Επιπλέον, έχουν γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης και την ικανότητα να υπερσυσσωρεύουν μέταλλα και να τα μετατρέπουν σε νανοσωματίδια, καθιστώντας τα ιδανικούς υποψήφιους για την πράσινη σύνθεση.

Ο σχηματισμός των AgNPs από το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας των κυττάρων του μικροφύκου *H. pluvialis* μελετήθηκε υπό διάφορες συνθήκες, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν τη σύνθεση. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν η μέθοδος "ένας-παράγοντας-τη-φορά" και οι παράγοντες που εξετάστηκαν ήταν το φως, το pH του υδατικού διαλύματος νιτρικού αργύρου, η θερμοκρασία σύνθεσης, η συγκέντρωση του νιτρικού αργύρου στο υδατικό διάλυμα, η κατ' όγκο αναλογία του διαλύματος νιτρικού αργύρου με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας και η ανάδευση. Ο χαρακτηρισμός των AgNPs πραγματοποιήθηκε με τις μεθόδους φασματοφωτομετρίας υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS), ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (TEM) και περιθλασιομετρίας ακτίνων-Χ (XRD), ενώ η μελέτη της αντιβακτηριακής τους δράσης έγινε ποιοτικά με τη μέθοδο διάχυσης δίσκου έναντι βακτηριακών κυττάρων *E. coli*.

Από τη μελέτη προέκυψε ότι οι βέλτιστες συνθήκες για τη σύνθεση των AgNPs ήταν οι εξής: συνεχής φωτισμός, pH ίσο με 9, θερμοκρασία 45°C, συγκέντρωση νιτρικού αργύρου 2 mM, 90/10 v/v αναλογία διαλύματος νιτρικού αργύρου προς εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας και συνθήκη ανάδευσης 180 rpm/15 min & 0 rpm. Τα νανοσωματίδια είχαν αρνητικό επιφανειακό φορτίο και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ήταν πολύ σταθερά (τιμές ζ-δυναμικού από $-18,2 \pm 5,15$ μέχρι $-40,4 \pm 8,41$) με ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους (τιμές του δείκτη πολυδιασποράς από 0,177 έως 0,418). Το σχήμα τους προσδιορίστηκε ως σφαιρικό ή ελλειψοειδές και το μέγεθός τους περίπου στα 30 – 50 nm με μικρού βαθμού συσσωμάτωση. Η κρυσταλλική δομή τους ήταν εδροκεντρωμένη κυβική (FCC). Η σταθερότητα των νανοσωματιδίων διερευνήθηκε σε δύο θερμοκρασίες (4°C και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος) για χρονικό διάστημα δύο μηνών, μετά το πέρας του οποίου παρατηρήθηκε μείωση της μέγιστης

απορρόφησής τους κατά 15,9% και 23,5%, αντίστοιχα, αλλά η σταθερότητά τους διατηρήθηκε. Όσον αφορά τις αντιβακτηριακές ιδιότητες των AgNPs που συντέθηκαν υπό τις διάφορες συνθήκες σύνθεσης, όλα τα δείγματα εμφάνισαν ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του βακτηρίου *E. coli* και είχαν τουλάχιστον την ίδια ή και μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση συγκριτικά με τον άργυρο. Τέλος, αποδείχτηκε ότι η σύνθεση AgNPs είναι δυνατή και με τη χρήση αλκοολικού εκχυλίσματος των κυττάρων του μικροφύκου. Επομένως, συμπεραίνεται ότι το μικροφύκος *H. pluvialis* αποτελεί έναν υποσχόμενο υποψήφιο για τη πράσινη σύνθεση AgNPs με εξαιρετικές αντιβακτηριακές ιδιότητες έναντι βακτηριακών κυττάρων *E. coli*.

Λέξεις-Κλειδιά: Νανοσωματίδια αργύρου, πράσινη σύνθεση, μικροφύκη, *H. pluvialis*, εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας, αντιβακτηριακές ιδιότητες

ABSTRACT

The aim of the present thesis was the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using the extracellular liquid of the microalga *Haematococcus pluvialis* and the study of the effect of various factors and the antibacterial activity of AgNPs.

AgNPs have excellent physicochemical and biological properties, such as antimicrobial and anticancer activity, with application in a wide range of fields, such as food, environment, materials science and biomedicine. Physical and chemical synthesis methods are widely used but green methods have gained increased interest due to the non-use of toxic chemicals and the synthesis of more biocompatible and biosafe AgNPs. Microalgae are a rich source of biomolecules, such as proteins, polysaccharides and secondary metabolites, which can act as reducing and stabilizing agents by creating a capping around AgNPs. In addition, they have a fast growth rate and the ability to hyper-accumulate metals and transform them into nanoparticles, making them promising candidates for the green synthesis.

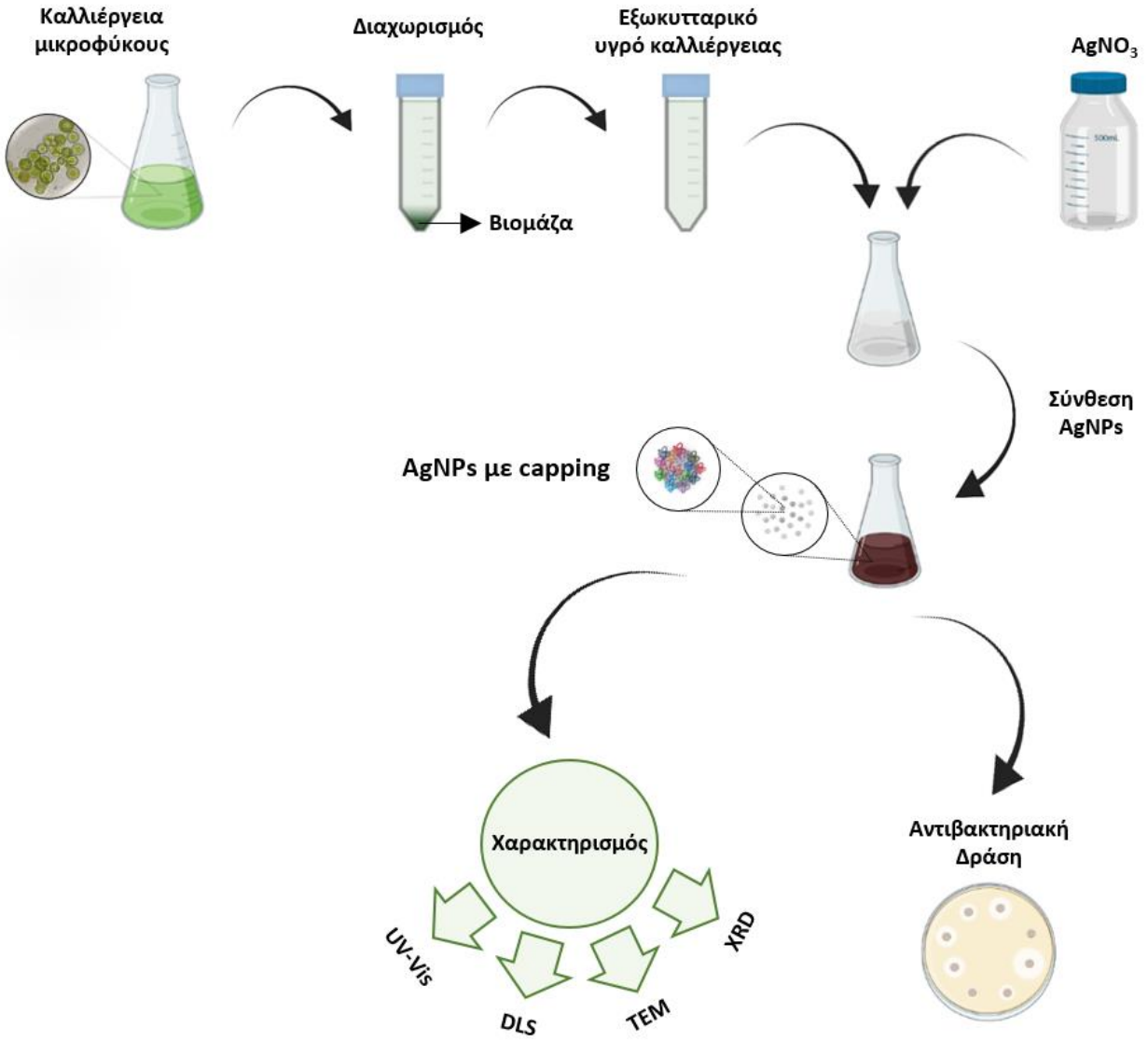
The formation of the AgNPs by the extracellular liquid of the microalga *H. pluvialis* cells was examined under various parameters, which may affect their synthesis. The "one-factor-at-a-time" method was followed and the factors of light, pH of the aqueous silver nitrate solution, synthesis temperature, concentration of silver nitrate in the aqueous solution, volume ratio of the silver nitrate solution to the extracellular liquid and stirring conditions were examined. The synthesized nanoparticles were being characterized via ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM) and X-ray diffraction (XRD), while their antibacterial activity was being examined qualitatively by the disc diffusion method against *E. coli* bacterial cells.

The study revealed that the optimal conditions for AgNPs synthesis were as follows: continuous illumination, $pH = 9$, temperature of $45^{\circ}C$, silver nitrate concentration 2 mM , $90/10\text{ v/v}$ ratio of silver nitrate solution to extracellular liquid and stirring condition $180\text{ rpm}/15\text{ min}$ & 0 rpm . Nanoparticles had negative surface charge and the most of them were very stable (z-potential values from -18.2 ± 5.15 to -40.4 ± 8.41) with a uniform size distribution (polydispersity index values from 0.177 to 0.418). Their shape was determined as spherical or ellipsoidal and their size approximately $30 - 50\text{ nm}$ with semi-significant agglomeration. Their crystal structure was face-centered cubic (FCC). The stability of the nanoparticles was assessed at two temperatures ($4^{\circ}C$ and at ambient temperature) for a period of two months, after which a decrease in their maximum absorption was observed by 15.9% and 23.5%, respectively, but their stability was maintained. Regarding the antibacterial properties of AgNPs, all samples had a zone of inhibition of *E. coli* growth and had the same or greater antibacterial activity compared to silver. This study also showed that the synthesis of AgNPs is possible using an alcoholic extract of the microalgae cells.

Overall, microalga *H. pluvialis* is a promising candidate for the green synthesis of AgNPs with great antibacterial properties against *E. coli* cells.

Key words: silver nanoparticles, green synthesis, microalgae, *H. pluvialis*, extracellular liquid, antibacterial properties

ΓΡΑΦΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	v
ABSTRACT	vii
ΓΡΑΦΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ	ix
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Θεωρητικό Υπόβαθρο	2
1.1. Εισαγωγή	2
1.2. Νανοτεχνολογία	3
1.3. Νανοσωματίδια	5
1.4. Φυσικοχημικές ιδιότητες νανοσωματιδίων	7
1.4.1. Οπτοηλεκτρονικές ιδιότητες	7
1.4.2. Μηχανικές ιδιότητες	8
1.4.3. Θερμικές ιδιότητες	9
1.4.4. Μαγνητικές ιδιότητες	10
1.4.5. Καταλυτικές ιδιότητες	10
1.5. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων	11
1.5.1. Χαρακτηρισμός οπτοηλεκτρονικών ιδιοτήτων	13
1.5.2. Μορφολογικός και τοπογραφικός χαρακτηρισμός	14
1.5.3. Δομικός και χημικός χαρακτηρισμός	16
1.6. Νανοσωματίδια αργύρου	18
1.6.1. Άργυρος και νιτρικός άργυρος	18
1.6.2. Ιδιότητες και εφαρμογές	20
1.6.3. Αντιβακτηριακή δράση	23
1.6.4. Τοξικότητα	24
1.7. Μέθοδοι σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου	25
1.7.1. Φυσικές μέθοδοι	25
1.7.2. Χημικές μέθοδοι	27
1.7.3. Πράσινες μέθοδοι	30
1.7.4. Βιολογικές μέθοδοι	31
1.7.5. Σύγκριση	33
1.8. Μικροφύκη	33
1.8.1. Μικροφύκος <i>Haematococcus pluvialis</i>	36
1.8.2. Μικροφύκος <i>Nannochloropsis oceanica</i>	38

1.8.3. Μικροφύκος <i>Chlorella vulgaris</i>	38
1.8.4. Μικροφύκος <i>Scenedesmus almeriensis</i>	39
1.9. Σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου με τη χρήση μικροφυκών	40
1.9.1. Με τη χρήση εκχυλίσματος κυττάρων	41
1.9.2. Με τη χρήση εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας	42
1.9.3. Με τη χρήση ολόκληρων των κυττάρων	42
1.9.4. Με τη χρήση καλλιέργειας ζωντανών μικροφυκών	42
1.10. Σκοπός μελέτης.....	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υλικά και Μέθοδοι	45
2.1. Μικροοργανισμοί.....	45
2.2. Χημικά αντιδραστήρια – Αναλώσιμα Υλικά	45
2.3. Όργανα και Συσκευές.....	45
2.4. Θρεπτικά Μέσα	46
2.5. Καλλιέργεια μικροοργανισμών	50
2.5.1. Διατήρηση μικροφυκών/Ανακαλλιέργεια	50
2.5.2. Έλεγχος αξενικότητας και ανάπτυξης μικροφυκών	50
2.5.3. Καλλιέργεια μικροφυκών	51
2.5.4. Καλλιέργεια <i>E. coli</i>	51
2.6. Σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου με εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας.....	52
2.7. Μελέτη συνθηκών σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου	53
2.7.1. Επιλογή μικροφύκου (Screening)	54
2.7.2. Επίδραση φωτός	54
2.7.3. Επίδραση pH του διαλύματος $AgNO_3$	55
2.7.4. Επίδραση θερμοκρασίας	55
2.7.5. Επίδραση συγκέντρωσης του $AgNO_3$ στο υδατικό διάλυμα	56
2.7.6. Επίδραση αναλογίας διαλύματος $AgNO_3$ /εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας.....	56
2.7.7. Επίδραση ανάδευσης	57
2.8. Σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου με αλκοολικό εκχύλισμα κυττάρων.....	58
2.9. Μελέτη σταθερότητας νανοσωματιδίων αργύρου	59
2.10. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων αργύρου	59
2.10.1. Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)	60
2.10.2. Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)	60
2.10.3. Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM)	60

2.10.4. Περιθλασιομετρία ακτίνων-Χ (XRD).....	60
2.11. Έλεγχος αντιβακτηριακών ιδιοτήτων νανοσωματιδίων αργύρου.....	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	63
3.1. Σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου και ανάλυση UV-Vis φασματοφωτομετρίας.....	63
3.1.1. Επιλογή μικροφύκους	64
3.1.2. Επίδραση φωτός	67
3.1.3. Επίδραση pH του διαλύματος AgNO ₃	69
3.1.4. Επίδραση θερμοκρασίας	72
3.1.5. Επίδραση συγκέντρωσης του AgNO ₃ στο υδατικό διάλυμα	75
3.1.6. Επίδραση αναλογίας διαλύματος AgNO ₃ /εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας.....	77
3.1.7. Επίδραση ανάδευσης.....	80
3.1.8. Χρήση αιθανολικού εκχυλίσματος κυττάρων.....	83
3.2. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων αργύρου με DLS	83
3.3. Ανάλυση TEM	88
3.4. Ανάλυση XRD.....	89
3.5. Σταθερότητα νανοσωματιδίων αργύρου.....	90
3.6. Αντιβακτηριακές ιδιότητες νανοσωματιδίων αργύρου.....	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Συμπεράσματα και Μελλοντικές Προκλήσεις.....	96
4.1. Συμπεράσματα	96
4.2. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	99
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	102
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: Φάσματα απορρόφησης UV-Vis	113
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: Αποτελέσματα DLS	120

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Σύγκριση υλικών διαφορετικού μεγέθους	4
Εικόνα 1.2. Ταξινόμηση των νανοϋλικών με βάση τις διαστάσεις τους	5
Εικόνα 1.3. Δομή ενός νανοσωματιδίου.....	5
Εικόνα 1.4. Ταξινόμηση των NPs με βάση την προέλευση και τη σύνθεσή τους.....	6
Εικόνα 1.5. Φαινόμενο συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR)	7
Εικόνα 1.6. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis και το χρώμα υδατικών διαλυμάτων νανοσφαιρών αργύρου διαμέτρου μεταξύ 10 και 100 nm (πάνω) και νανοπλακών αργύρου μεταξύ 50 και 150 nm (κάτω)	8
Εικόνα 1.7. (a) Εικόνα φωτεινού πεδίου TEM (b) SAED	15
Εικόνα 1.8. Περίθλαση των ακτίνων-Χ από έναν κρύσταλλο	16
Εικόνα 1.9. Η συγκέντρωση των ιόντων και η διαφορά δυναμικού σε συνάρτηση με την απόσταση από την φορτισμένη επιφάνεια ενός σωματιδίου σε ένα μέσο διασποράς	17
Εικόνα 1.10. Εφαρμογές των AgNPs	20
Εικόνα 1.11. Οι εφαρμογές των AgNPs στη βιοϊατρική.....	22
Εικόνα 1.12. Μηχανισμοί αντιβακτηριακής δράσης των AgNPs.....	24
Εικόνα 1.13. Μέθοδοι σύνθεσης AgNPs	26
Εικόνα 1.14. Ταξινόμηση φυκών με βάση το χρώμα.....	34
Εικόνα 1.15. Φωτοβιοαντιδραστήρες (PBRs) που χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη μικροφυκών: (α) επιμήκεις λεκάνες (b) τύπου επίπεδης πλάκας (c) κεκλιμένου σωληνοειδούς τύπου και (d) οριζόντιου συνεχούς σωληνοειδούς τύπου	35
Εικόνα 1.16. Αναπαράσταση των κυττάρων των μικροφυκών (A) <i>H. pluvialis</i> (B) <i>N. oceanica</i> (C) <i>C. vulgaris</i> (D) <i>S. almeriensis</i>	37
Εικόνα 1.17. Μηχανισμός σύνθεσης AgNPs με τη χρήση μικροφυκών.....	40
Εικόνα 1.18. Διαφορετικοί τρόποι σύνθεσης AgNPs με τη χρήση μικροφυκών.....	41
Εικόνα 2.1. Καλλιέργειες μικροφυκών <i>N. oceanica</i> , <i>H. pluvialis</i> , <i>C. vulgaris</i> και <i>S. almeriensis</i> (από αριστερά προς τα δεξιά) ηλικίας 10 ημερών.....	50
Εικόνα 2.2. Γραφική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας σύνθεσης AgNPs με εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας μικροφύκους.....	52
Εικόνα 2.3. Μέθοδοι χαρακτηρισμού AgNPs.....	59
Εικόνα 2.4. Μέθοδος διάχυσης δίσκου	61
Εικόνα 3.1. Σταδιακή μεταβολή του χρώματος του διαλύματος από διάφανο σε χάλκινο και τελικά σε σκούρο καφέ μετά από 24 h που πιστοποιεί τη σύνθεση των AgNPs	63

Εικόνα 3.2. Εικόνες φωτεινού πεδίου TEM των AgNPs (A) στα 200 nm (B) στα 200 nm (C) στα 100 nm (D) στα 100 nm (E) Περίθλαση ηλεκτρονίων επιλεγμένης περιοχής (SAED) των AgNPs.....	88
Εικόνα 3.3. Τα σταθεροποιημένα AgNPs μετά από 7 και 60 ημέρες αποθηκευμένα σε συνθήκες (A) δωματίου και (B) ψύξης.....	91
Εικόνα 3.4. Αντιμικροβιακή δράση των AgNPs συντεθειμένων σε (A) διαφορετικά pH (5, 7, 8, 9 & 11) (B) διαφορετικές θερμοκρασίες (25°C, 35°C, 45°C & 55°C) (C) διαφορετικές συγκεντρώσεις δ/τος AgNO ₃ (1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM & 5 mM) (D) διαφορετικές κατ' όγκο αναλογίες διαλύματος AgNO ₃ /εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας (95/5, 90/10, 85/15, 80/20 & 70/30) και (E) διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης (A: 180 rpm/15 min & 80 rpm, B: 180 rpm/15 min & 0 rpm, C: 0 rpm & D: 180 rpm) έναντι του βακτηρίου <i>E. coli</i> με τη μέθοδο της διάχυσης δίσκου.....	93

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Τεχνικές και μέθοδοι χαρακτηρισμού NPs	11
Πίνακας 1.2. Σύγκριση μεθόδων σύνθεσης AgNPs	33
Πίνακας 1.3. Ταξινόμηση μικροφυκών	36
Πίνακας 2.1. Όργανα και συσκευές για τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό των AgNPs.....	46
Πίνακας 2.2. Σύσταση θρεπτικού μέσου μικροφύκους <i>H. pluvialis</i>	47
Πίνακας 2.3. Σύσταση θρεπτικού μέσου F/2 μικροφύκους <i>N. oceanica</i>	47
Πίνακας 2.4. Σύσταση θρεπτικού μέσου μικροφύκους <i>C. vulgaris</i>	48
Πίνακας 2.5. Σύσταση θρεπτικού μέσου μικροφύκους <i>S. almeriensis</i>	49
Πίνακας 2.6. Σύσταση θρεπτικού μέσου LB βακτηρίου <i>E. coli</i>	49
Πίνακας 2.7. Σταθερές συνθήκες σύνθεσης AgNPs.....	54
Πίνακας 2.8. Συνθήκες σύνθεσης AgNPs για screening.....	54
Πίνακας 2.9. Συνθήκες σύνθεσης AgNPs για τη μελέτη επίδρασης φωτός.....	55
Πίνακας 2.10. Συνθήκες σύνθεσης AgNPs για τη μελέτη επίδρασης pH.....	55
Πίνακας 2.11. Συνθήκες σύνθεσης AgNPs για τη μελέτη επίδρασης θερμοκρασίας	56
Πίνακας 2.12. Συνθήκες σύνθεσης AgNPs για τη μελέτη επίδρασης συγκέντρωσης διαλύματος AgNO ₃	56
Πίνακας 2.13. Συνθήκες σύνθεσης AgNPs για τη μελέτη επίδρασης αναλογίας διαλύματος AgNO ₃ / εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας	57
Πίνακας 2.14. Συνθήκες σύνθεσης AgNPs για τη μελέτη επίδρασης ανάδευσης	57
Πίνακας 2.15. Συνθήκες σύνθεσης AgNPs για τη μελέτη σύνθεσης AgNPs με αλκοολικό εκχύλισμα κυττάρων	58
Πίνακας 3.1. Αποτελέσματα DLS υδατικής διασποράς AgNPs για όλες τις συνθήκες μετά από 24 h σύνθεσης	85

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 3.1. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των AgNPs συντεθειμένων με τα διαφορετικά μικροφύκη μετά από χρόνο σύνθεσης (A) 15 min (B) 1 h (C) 3 h (D) 6 h και (E) 24 h	65
Διάγραμμα 3.2. Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των συντεθειμένων AgNPs σε συνάρτηση με τον χρόνο για τα διαφορετικά μικροφύκη	66
Διάγραμμα 3.3. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των AgNPs συντεθειμένων σε συνθήκες φωτός και σκοταδιού μετά από χρόνο σύνθεσης (A) 15 min (B) 1 h (C) 3 h (D) 6 h και (E) 24 h	68
Διάγραμμα 3.4. Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των συντεθειμένων AgNPs σε συνάρτηση με τον χρόνο για τη συνθήκη του φωτός	69
Διάγραμμα 3.5. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των AgNPs συντεθειμένων σε διαφορετικά pH μετά από χρόνο σύνθεσης (A) 15 min (B) 1 h (C) 3 h (D) 6 h και (E) 24 h	70
Διάγραμμα 3.6. Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των συντεθειμένων AgNPs σε συνάρτηση με τον χρόνο για τα διαφορετικά pH	71
Διάγραμμα 3.7. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των AgNPs συντεθειμένων σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά από χρόνο σύνθεσης (A) 15 min (B) 1 h (C) 3 h (D) 6 h και (E) 24 h	73
Διάγραμμα 3.8. Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των συντεθειμένων AgNPs σε συνάρτηση με τον χρόνο για τις διαφορετικές θερμοκρασίες	74
Διάγραμμα 3.9. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των AgNPs συντεθειμένων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις δ/τος AgNO ₃ μετά από χρόνο σύνθεσης (A) 15 min (B) 1 h (C) 3 h (D) 6 h και (E) 24 h ...	76
Διάγραμμα 3.10. Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των συντεθειμένων AgNPs σε συνάρτηση με τον χρόνο για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις	77
Διάγραμμα 3.11. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των AgNPs συντεθειμένων σε διαφορετικές κατ' όγκο αναλογίες διαλύματος AgNO ₃ /εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας μετά από χρόνο σύνθεσης (A) 15 min (B) 1 h (C) 3 h (D) 6 h και (E) 24 h	78
Διάγραμμα 3.12. Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των συντεθειμένων AgNPs σε συνάρτηση με τον χρόνο για τις διαφορετικές αναλογίες διαλύματος AgNO ₃ /εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας.....	79
Διάγραμμα 3.13. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των AgNPs συντεθειμένων σε διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης μετά από χρόνο σύνθεσης (A) 15 min (B) 1 h (C) 3 h (D) 6 h και (E) 24 h	81
Διάγραμμα 3.14. Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των συντεθειμένων AgNPs σε συνάρτηση με τον χρόνο για τις διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης	82
Διάγραμμα 3.15. Φάσμα απορρόφησης UV-Vis των AgNPs συντεθειμένων με το αιθανολικό εκχύλισμα κυττάρων του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> μετά από 24 h σύνθεσης	83
Διάγραμμα 3.16. Φάσμα XRD των συντεθειμένων AgNPs	90

Διάγραμμα 3.17. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τη σταθερότητα των AgNPs μετά από 7, 21, 35 και 60 ημέρες αποθηκευμένων σε συνθήκες (A) δωματίου και (B) ψύξης.....	91
Διάγραμμα Π.Α.1. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε συνάρτηση με το χρόνο των AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου (A) <i>H. pluvialis</i> (B) <i>C. vulgaris</i> (C) <i>N. oceanica</i> και (D) <i>S. almeriensis</i> σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm.....	113
Διάγραμμα Π.Α.2. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε συνάρτηση με το χρόνο των AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> (A) στο φως και (B) στο σκοτάδι σε συνθήκες pH=8, T=25°C, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm.....	114
Διάγραμμα Π.Α.3. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε συνάρτηση με το χρόνο των AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> σε συνθήκες φωτός, T=25°C, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και (A) pH=5 (B) pH=7 (C) pH=8 (D) pH=9 (E) pH=11.....	115
Διάγραμμα Π.Α.4. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε συνάρτηση με το χρόνο των AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> σε συνθήκες φωτός, pH=8, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και θερμοκρασίας (A) 25°C (B) 35°C (C) 45°C (D) 55°C.....	116
Διάγραμμα Π.Α.5. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε συνάρτηση με το χρόνο των AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και συγκέντρωσης δ/τος AgNO ₃ (A) 1 mM (B) 2 mM (C) 3 mM (D) 4 mM (E) 5 mM.....	117
Διάγραμμα Π.Α.6. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε συνάρτηση με το χρόνο των AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 1 mM, 180 rpm/15 min & 80 rpm και κατ' όγκο αναλογίας δ/τος AgNO ₃ /εξ. υγρού καλλιέργειας (A) 95/5 (B) 90/10 (C) 85/15 (D) 80/20 (E) 70/30.....	118
Διάγραμμα Π.Α.7. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε συνάρτηση με το χρόνο των AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 1 mM, 90/10 και ανάδευσης (A) 180 rpm/15 min & 80 rpm (B) 180 rpm/15 min & 0 rpm (C) 0 rpm (D) 180 rpm.....	119
Διάγραμμα Π.Β.1. Κατανομή μεγέθους AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> (A) στο φως και (B) στο σκοτάδι σε συνθήκες pH=8, T=25°C, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm μετά από 24 h σύνθεσης.....	120
Διάγραμμα Π.Β.2. Κατανομή ζ-δυναμικού AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> (A) στο φως και (B) στο σκοτάδι σε συνθήκες pH=8, T=25°C, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm μετά από 24 h σύνθεσης.....	120

Διάγραμμα Π.Β.3. Κατανομή μεγέθους AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> σε συνθήκες φωτός, T=25°C, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και (A) pH=5 (B) pH=7 (C) pH=8 (D) pH=9 (E) pH=11 μετά από 24 h σύνθεσης	121
Διάγραμμα Π.Β.4. Κατανομή ζ-δυναμικού AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> σε συνθήκες φωτός, T=25°C, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και (A) pH=5 (B) pH=7 (C) pH=8 (D) pH=9 (E) pH=11 μετά από 24 h σύνθεσης	121
Διάγραμμα Π.Β.5. Κατανομή μεγέθους AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> σε συνθήκες φωτός, pH=8, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και θερμοκρασίας (A) 25°C (B) 35°C (C) 45°C (D) 55°C μετά από 24 h σύνθεσης	121
Διάγραμμα Π.Β.6. Κατανομή ζ-δυναμικού AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> σε συνθήκες φωτός, pH=8, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και θερμοκρασίας (A) 25°C (B) 35°C (C) 45°C (D) 55°C μετά από 24 h σύνθεσης	121
Διάγραμμα Π.Β.7. Κατανομή μεγέθους AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και συγκέντρωσης δ/τος AgNO ₃ (A) 1 mM (B) 2 mM (C) 3 mM (D) 4 mM (E) 5 mM μετά από 24 h σύνθεσης	121
Διάγραμμα Π.Β.8. Κατανομή ζ-δυναμικού AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και συγκέντρωσης δ/τος AgNO ₃ (A) 1 mM (B) 2 mM (C) 3 mM (D) 4 mM (E) 5 mM μετά από 24 h σύνθεσης	121
Διάγραμμα Π.Β.9. Κατανομή μεγέθους AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 1 mM, 180 rpm/15 min & 80 rpm και κατ' όγκο αναλογίας δ/τος AgNO ₃ /εξ. υγρού καλλιέργειας (A) 95/5 (B) 90/10 (C) 85/15 (D) 80/20 (E) 70/30 μετά από 24 h σύνθεσης	121
Διάγραμμα Π.Β.10. Κατανομή ζ-δυναμικού AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 1 mM, 180 rpm/15 min & 80 rpm και κατ' όγκο αναλογίας δ/τος AgNO ₃ /εξ. υγρού καλλιέργειας (A) 95/5 (B) 90/10 (C) 85/15 (D) 80/20 (E) 70/30 μετά από 24 h σύνθεσης	121
Διάγραμμα Π.Β.11. Κατανομή μεγέθους AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 1 mM, 90/10 και ανάδευσης (A) 180 rpm/15 min & 80 rpm (B) 180 rpm/15 min & 0 rpm (C) 0 rpm (D) 180 rpm μετά από 24 h σύνθεσης...	121
Διάγραμμα Π.Β.12. Κατανομή ζ-δυναμικού AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου <i>H. pluvialis</i> σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 1 mM, 90/10 και ανάδευσης (A) 180 rpm/15 min & 80 rpm (B) 180 rpm/15 min & 0 rpm (C) 0 rpm (D) 180 rpm μετά από 24 h σύνθεσης.....	121



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:
Θεωρητικό Υπόβαθρο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Θεωρητικό Υπόβαθρο

1.1. Εισαγωγή

Η νανοτεχνολογία είναι ένας σχετικά νέος αλλά ταχέως αναπτυσσόμενος κλάδος της επιστήμης. Ιδιαίτερα τα νανοσωματίδια έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών και αποτελούν σημαντικό τομέα της επιστημονικής έρευνας λόγω του εύρους των πιθανών εφαρμογών τους, όπως στην ιατρική, τη φαρμακευτική, τα καλλυντικά, τα τρόφιμα, τη γεωργία, το περιβάλλον, την επιστήμη των υλικών, την οπτικοηλεκτρονική, τις χημικές διεργασίες και τη διαστημική. Τα μεταλλικά νανοσωματίδια εμφανίζουν μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως οπτικές, ηλεκτρικές και θερμικές, λόγω της υψηλής αναλογίας επιφάνειας προς τον όγκο. Παράλληλα, ξεχωρίζουν λόγω των εξαιρετικών βιολογικών ιδιοτήτων τους. Μάλιστα, τα νανοσωματίδια αργύρου είναι μεταξύ των σπουδαιότερων ανάμεσα στα πολλά μεταλλικά νανοσωματίδια για τη χρήση τους στη βιοϊατρική [1], [2], [3].

Στον τομέα των βιοεπιστημών τα νανοσωματίδια αργύρου μπορούν να βρουν εφαρμογή στα πεδία της διάγνωσης, της απεικόνισης, των νανο-θεραπευτικών συστημάτων και της αναγεννητικής ιατρικής βελτιώνοντας ή και αντικαθιστώντας παλαιότερες προσεγγίσεις. Αποτελούν εξαιρετικά εργαλεία για τα συστήματα απεικόνισης λόγω των οπτικών ιδιοτήτων τους αλλά και για την έγκαιρη *in vivo* και *in vitro* διάγνωση με τη χρήση τους ως ιχνηθέτες ή ως παράγοντες αντίθεσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση τους σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων και στη στοχευμένη θεραπεία είναι ελπιδοφόρα, ιδιαίτερα για ασθένειες που η θεραπεία τους δεν είναι ακόμα εφικτή ή συνοδεύεται από ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως ο καρκίνος. Επιπλέον, βρίσκουν εφαρμογή για παράδειγμα στην επούλωση πληγών, την ορθοπεδική με την αναδόμηση των οστών και στην οδοντιατρική στα πληρωτικά υλικά. Όλες αυτές οι δυνατότητες εφαρμογής των νανοσωματιδίων αργύρου οφείλονται στην εξαιρετική αντιβακτηριακή, αντιμυκητιασική, αντική, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, αντιαγγειογενετική και αντικαρκινική δράση τους [1], [4], [5].

Είναι γνωστό ότι υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί μικροοργανισμοί, όπως τα βακτήρια και οι μύκητες, που προκαλούν λοίμωξη σε ανθρώπους και άλλους ζωντανούς οργανισμούς. Για την αντιμετώπισή τους έχουν αναπτυχθεί αρκετά αντιβιοτικά. Ωστόσο, η κατάχρηση και η αλόγιστη χρήση τους έχει αυξήσει τη μικροβιακή αντοχή δυσχεραίνοντας τη θεραπεία μικροβιακών ασθενειών, το οποίο αποτελεί πλέον ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της δημόσιας υγείας σε παγκόσμιο επίπεδο. Για τον λόγο αυτό η επιστημονική κοινότητα έχει επικεντρώσει τις έρευνές της σε εναλλακτικές θεραπείες ή μεθόδους που μπορούν να υπερβούν αυτή την ανθεκτικότητα των βακτηρίων και ταυτόχρονα να είναι οικονομικά αποδοτικές. Τα νανοσωματίδια αργύρου αποτελούν έναν καλό εναλλακτικό υποψήφιο σε πολλές περιπτώσεις. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του αργύρου είναι γνωστές εδώ και 2.000 χρόνια αν και ο μηχανισμός δράσης του δεν είναι πλήρως σαφής, καθώς υπάρχουν πολλές διαφορετικές λειτουργίες με

τις οποίες εκδηλώνει την ανασταλτική του δράση. Τα προϊόντα με βάση τον άργυρο, όπως τα νανοσωματίδια αργύρου, έχουν μικρότερη τάση να προκαλούν μικροβιακή ανθεκτικότητα και είναι οικονομικά αποδοτικά. Είναι χαρακτηριστικό ότι η αξία τους στην αγορά ως αντιμικροβιακοί παράγοντες έχει αυξηθεί από τα 0,79 δισεκατομμύρια δολάρια το 2014 στα 2,54 δισεκατομμύρια δολάρια το 2022 [6], [7].

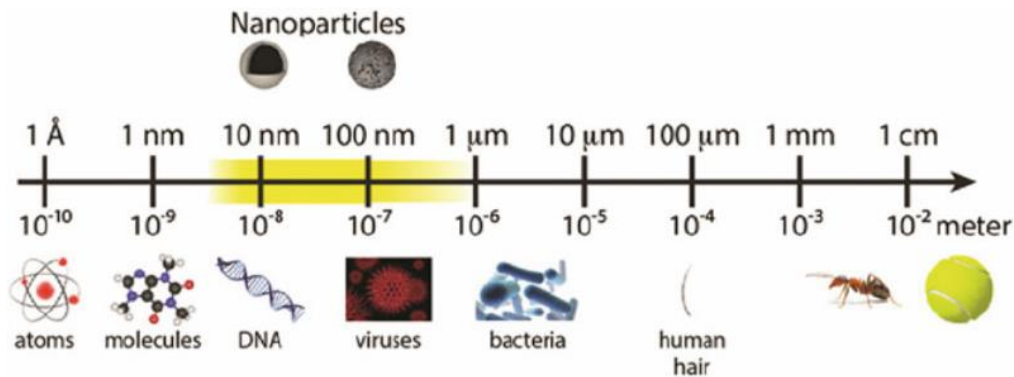
Η πληθώρα εφαρμογών των νανοσωματιδίων αργύρου δημιούργησε την απαίτηση για εκτενέστερη παραγωγή τους. Για την ικανοποίηση των αυξημένων απαιτήσεων έχουν υιοθετηθεί πολλοί μέθοδοι σύνθεσης. Με τις φυσικές μεθόδους, όπως η συμπύκνωση ατμών, τα σχηματιζόμενα νανοσωματίδια είναι υψηλής καθαρότητας και η σύνθεσή τους μπορεί να γίνει σε μεγάλη κλίμακα αλλά μειονεκτούν στην υψηλή ενεργειακή κατανάλωση, τον πολύπλοκο εξοπλισμό και την τάση για συσσωμάτωση. Οι χημικές μέθοδοι, όπως η χημική αναγωγή, είναι γρήγορες, έχουν υψηλή απόδοση και οι συνθήκες σύνθεσης μπορούν να ελεγχθούν για την επίτευξη ομοιογένειας των νανοσωματιδίων. Ωστόσο, τα χημικά που συχνά χρησιμοποιούνται είναι τοξικά και επικίνδυνα για τον άνθρωπο και το περιβάλλον, καθώς και δύσκολο να απομακρυνθούν πλήρως από τα νανοσωματίδια. Η μέθοδος και οι συνθήκες σύνθεσης αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, όπως το μέγεθος, το σχήμα και τη σταθερότητα, τα οποία καθορίζουν τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες [1], [6].

Οι προκλήσεις αυτές οδηγούν σε μία προσπάθεια ενσωμάτωσης των αρχών της πράσινης προσέγγισης στη σύνθεσή τους με την αναζήτηση εναλλακτικών, φιλικών προς το περιβάλλον, οικονομικά αποδοτικών και μη τοξικών μεθόδων. Ειδικά για εφαρμογές στη βιοϊατρική η μετακίνηση προς αυτήν την κατεύθυνση γίνεται ακόμη πιο επιτακτική και οι προδιαγραφές αυστηρότερες, καθώς υπεισέρχονται επιπλέον κριτήρια, όπως η βιοσυμβατότητα. Οι βιολογικές μέθοδοι φαίνεται να πληρούν αυτές τις απαιτήσεις κερδίζοντας όλο και μεγαλύτερη προσοχή. Μικροοργανισμοί, όπως βακτήρια, μύκητες και φύκη, μελετώνται για τη δυνατότητα χρήσης τους στη σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου. Τα φύκη αποτελούν πλούσια πηγή βιομορίων, όπως πρωτεϊνών και δευτερογενών μεταβολιτών, που μπορούν να συμβάλλουν στη σύνθεση. Ακόμη, ο ρυθμός ανάπτυξής τους είναι γρήγορος, καλλιεργούνται εύκολα και η παραγωγή τους μπορεί να κλιμακωθεί οικονομικά και αποδοτικά καθιστώντας τα εξαιρετικούς υποψήφιους για τη σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου [2], [4], [6].

1.2. Νανοτεχνολογία

Η νανοτεχνολογία αναφέρεται στον κλάδο της επιστήμης, της μηχανικής και της τεχνολογίας που διενεργείται στη νανοκλίμακα και είναι περίπου από 1 έως 100 *nm* (Εικόνα 1.1). Η νανοεπιστήμη και η νανοτεχνολογία σχετίζονται με τη μελέτη και την εφαρμογή εξαιρετικά μικρών αντικειμένων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε όλα τα υπόλοιπα επιστημονικά πεδία, όπως είναι η χημεία, η βιολογία,

η φυσική, η επιστήμη των υλικών και η μηχανική [8]. Παρέχουν τη δυνατότητα κατανόησης νέων φαινομένων και ανάδειξης νέων δομών, συσκευών και συστημάτων. Οι φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες των νανοϋλικών διαφέρουν σημαντικά από εκείνες των αντίστοιχων μακροσκοπικών υλικών. Η θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητα, η χημική δραστηριότητα, η μηχανική αντοχή, οι οπτικές και μαγνητικές ιδιότητες είναι μερικές μόνο από τις εξαιρετικές ιδιότητές τους και είναι συνάρτηση των διαστάσεών τους. Αυτές οφείλονται στην υψηλή αναλογία επιφάνειας προς τον όγκο και στα κβαντικά φαινόμενα που αρχίζουν να παίζουν ρόλο σε αυτές τις διαστάσεις. Ουσιαστικά τα νανοϋλικά γεφυρώνουν το χάσμα μεταξύ των μακροσκοπικών υλικών και των ατομικών ή μοριακών δομών [9], [2].



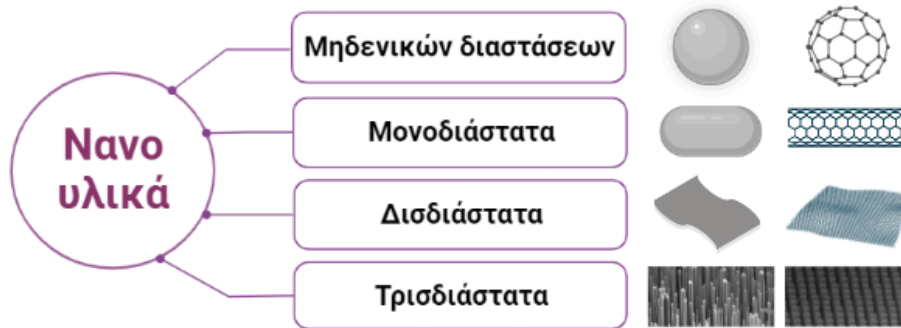
Εικόνα 1.1. Σύγκριση υλικών διαφορετικού μεγέθους [10]

Τα νανοϋλικά μπορούν να διακριθούν με βάση τον αριθμό των διαστάσεών τους σε τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες [3] (Εικόνα 1.2):

- ❖ Μηδενικών διαστάσεων (zero-dimensional, $0 - D$): Αυτά τα νανοϋλικά έχουν και τις τρεις διαστάσεις τους στη νανοκλίμακα, όπως οι κβαντικές τελείες, τα φουλερένια και οι νανοσφαίρες.
- ❖ Μονοδιάστατα (one-dimensional, $1 - D$): Αυτά τα νανοϋλικά έχουν μία διάσταση εκτός της νανοκλίμακας, όπως οι νανοσωλήνες, οι νανοράβδοι και τα νανοκαλώδια.
- ❖ Δισδιάστατα (two-dimensional, $2 - D$): Αυτά τα νανοϋλικά έχουν δύο διαστάσεις εκτός της νανοκλίμακας, όπως τα νανοφύλλα, τα νανοφίλμ και οι νανοεπικαλύψεις.
- ❖ Τρισδιάστατα (three-dimensional, $3 - D$): Αυτά τα νανοϋλικά δεν έχουν καμία διάσταση στη νανοκλίμακα, όπως οι σκόνες, οι διασπορές νανοσωματιδίων και οι δέσμες νανοσωλήνων και νανοκαλωδίων.

Οι μοναδικές ιδιότητες που διαθέτουν τα νανοϋλικά και ο διεπιστημονικός χαρακτήρας της νανοτεχνολογίας την καθιστά έναν ταχύτατα αναπτυσσόμενο κλάδο της επιστήμης με εφαρμογές σε τομείς, όπως η ενέργεια, οι επικοινωνίες, το περιβάλλον, η γεωργία, τα τρόφιμα, τα καλλυντικά, η ιατρική, η φαρμακευτική και η βιοτεχνολογία. Πιο συγκεκριμένα στον τομέα των βιοεπιστημών, τα νανοϋλικά έχουν τη δυνατότητα να δώσουν λύσεις σε προβλήματα των πεδίων της διάγνωσης, της απεικόνισης, των νανο-θεραπευτικών συστημάτων, των εμβολίων και της αναγεννητικής ιατρικής. Η

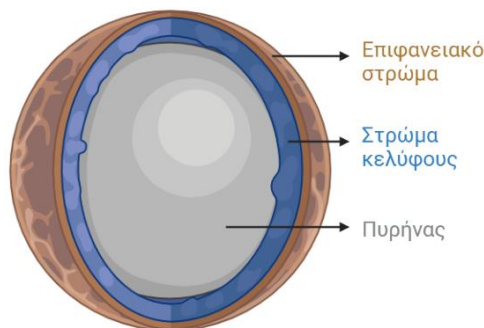
ευρεία χρήση τους σε βιοϊατρικές εφαρμογές δημιουργεί την ανάγκη να μη θέτουν σε κίνδυνο την υγεία του ανθρώπου και το περιβάλλον. Λαμβάνοντας υπόψη και παράγοντες, όπως η βιοκατανομή, η βιοσυμβατότητα, η βιοδιαθεσιμότητα και το πιο σημαντικό η βιοασφάλεια των νανοϋλικών, η τρέχουσα τάση σύνθεσής τους κινείται προς την ασφαλέστερη πλευρά, τις πράσινες μεθόδους [2], [3], [11].



Εικόνα 1.2. Ταξινόμηση των νανοϋλικών με βάση τις διαστάσεις τους (δημιουργήθηκε με BioRender.com)

1.3. Νανοσωματίδια

Τα νανοσωματίδια (nanoparticles, NPs) είναι τα βασικά δομικά συστατικά της νανοτεχνολογίας. Το μέγεθός τους κυμαίνεται κατά προσέγγιση από 1 έως 100 *nm*. Το σχήμα και η δομή τους ποικίλλουν και αναλόγως χαρακτηρίζονται ως σφαιρικά, κυλινδρικά, κωνικά, σωληνοειδή, κοίλα, σπειροειδή κτλ ή ακανόνιστα, ενώ μπορεί να είναι είτε μονοδιάσπαρτα είτε συσσωματωμένα. Σχετικά με την κρυσταλλικότητά τους, μπορεί να είναι κρυσταλλικά (μονοκρυσταλλικά ή πολυκρυσταλλικά) ή άμορφα [3]. Επιπλέον, τα νανοσωματίδια μπορεί να είναι ομοιόμορφα ή να αποτελούνται από διάφορα στρώματα. Στη δεύτερη περίπτωση, τα στρώματα συχνά είναι τα εξής (Εικόνα 1.3): (α) Το επιφανειακό στρώμα που συνήθως αποτελείται από μία ποικιλία μικρών μορίων, μεταλλικών ιόντων, επιφανειοδραστικών ουσιών ή πολυμερών (β) Το στρώμα κελύφους που είναι κατασκευασμένο από χημικά διαφορετικό υλικό από το στρώμα πυρήνα (γ) Τον πυρήνα που είναι το κεντρικό τμήμα και αναφέρεται στο ίδιο το νανοσωματίδιο [9], [3].



Εικόνα 1.3. Δομή ενός νανοσωματιδίου (δημιουργήθηκε με BioRender.com)

Λόγω της μεγάλης ποικιλίας τους έχουν προταθεί πολλοί τρόποι ταξινόμησης των νανοσωματιδίων με διαφορετικά κριτήρια. Τα πιο κοινά είναι η προέλευση και η σύνθεσή τους (Εικόνα 1.4). Με βάση την προέλευσή τους τα νανοσωματίδια διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες [12], [13]:

- ❖ Τα φυσικά παραγόμενα (naturally occurring): Αυτά τα νανοσωματίδια γενικά δημιουργούνται μέσω διάφορων βιογεωχημικών διεργασιών και μπορεί να βρεθούν στην ηφαιστειακή τέφρα, στη θάλασσα, στο χώμα ή στα κύτταρα οργανισμών.
- ❖ Τα τεχνητά (synthetic): Αυτά τα νανοσωματίδια παράγονται από ανθρώπινες δραστηριότητες και είναι είτε τυχαία (incidental) είτε μηχανοποιημένα (engineered). Στην πρώτη περίπτωση είναι παραπροϊόντα ανθρώπινων δραστηριοτήτων με διαφορετικό μέγεθος, σχήμα και σύσταση και μπορεί να βρεθούν στα καυσαέρια και στον καπνό των τσιγάρων. Αντίθετα, στη δεύτερη περίπτωση παράγονται από τον άνθρωπο με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά για εμπορική χρήση, όπως είναι οι νανοφορέας φαρμάκων και οι νανοσφαίρες.



Εικόνα 1.4. Ταξινόμηση των NPs με βάση την προέλευση και τη σύνθεσή τους (δημιουργήθηκε με BioRender.com)

Με βάση τη σύνθεσή τους τα νανοσωματίδια διακρίνονται γενικά σε τρεις κατηγορίες [3], [14]:

- ❖ Τα οργανικά: Αυτά τα νανοσωματίδια αποτελούνται από πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, πολυμερή ή οποιαδήποτε άλλη οργανική ένωση και τυπικά είναι βιοαποικοδομήσιμα και μη τοξικά. Κυριότερα παραδείγματα είναι τα πολυμερικά, τα денδριμερή, τα λιποσώματα, τα μικύλλια και τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, όπως η φερριτίνη.
- ❖ Τα ανόργανα: Αυτά τα νανοσωματίδια μπορεί να είναι μεταλλικά, κεραμικά ή ημιαγώγιμα. Τα μεταλλικά παράγονται από μία πρόδρομη ένωση και διακρίνονται σε μονομεταλλικά, διμεταλλικά και πολυμεταλλικά. Αποτελούνται από κάποιο μέταλλο, όπως άργυρο, χρυσό και ψευδάργυρο, ή

οξειδίο μετάλλου, όπως οξειδίο τιτανίου και οξειδίο σιδήρου, και εμφανίζουν βελτιωμένες ιδιότητες συγκριτικά με τα αντίστοιχα μακροσκοπικά υλικά.

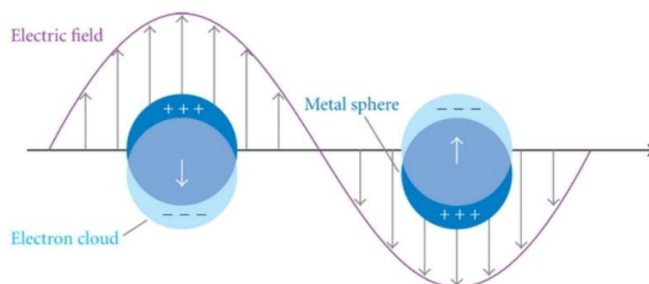
- ❖ Με βάση τον άνθρακα (carbon-based NPs): Αυτά τα νανοσωματίδια αποτελούνται αποκλειστικά από άνθρακα και παραδείγματα είναι τα φουλερένια και οι κβαντικές τελείες άνθρακα.

1.4. Φυσικοχημικές ιδιότητες νανοσωματιδίων

Τα νανοσωματίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών λόγω των μοναδικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους που διαφέρουν σημαντικά από εκείνες των αντίστοιχων μακροσκοπικών υλικών. Εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους, τα νανοσωματίδια διαθέτουν υψηλή αναλογία επιφάνειας προς τον όγκο με αποτέλεσμα να έχουν περισσότερα άτομα στην επιφάνεια και σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον του νανοσωματιδίου. Αντίθετα, τα αντίστοιχα μακροσκοπικά υλικά συγκρατούν τα σωματίδια πιο κοντά στο κέντρο τους. Επιπλέον, στις διαστάσεις της νανοκλίμακας αρχίζουν να παίζουν ρόλο και τα κβαντικά φαινόμενα. Σε αυτούς τους δύο λόγους αποδίδονται οι εξαιρετικές οπτοηλεκτρονικές, μηχανικές, θερμικές, μαγνητικές και καταλυτικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων [3], [9].

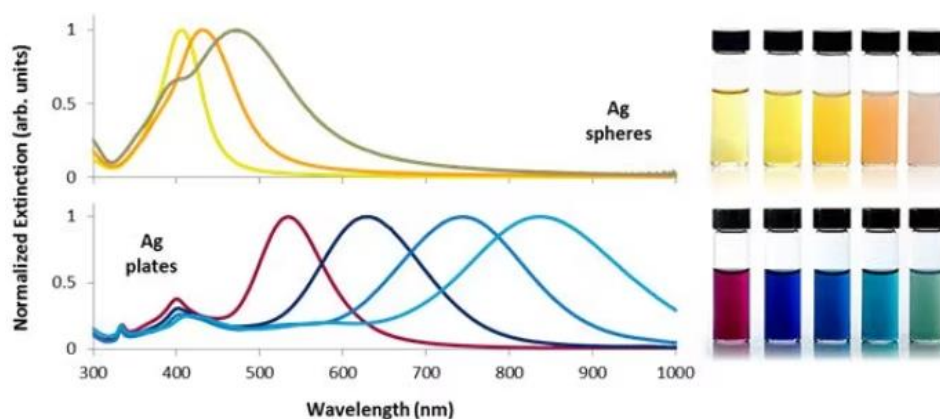
1.4.1. Οπτοηλεκτρονικές ιδιότητες

Τα μεταλλικά νανοσωματίδια και ιδιαίτερα των ευγενών μετάλλων (*Au*, *Ag*, *Pt*, *Pd*) παρουσιάζουν εξαιρετικές οπτοηλεκτρονικές ιδιότητες αλληλεπιδρώντας ισχυρά με συγκεκριμένα μήκη κύματος ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, σε αντίθεση με μεταλλικά υλικά μακροσκοπικών διαστάσεων. Πιο αναλυτικά, κοντά στην επιφάνεια των μεταλλικών νανοσωματιδίων, στη ζώνη αγωγιμότητας, τα ηλεκτρόνια κινούνται ελεύθερα. Με την επιβολή παροδικής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, τα ηλεκτρόνια αυτά διεγείρονται και στη συνέχεια τείνουν να επανέλθουν στη θέση τους. Εξαιτίας, όμως, της αδράνειας την υπερβαίνουν με αποτέλεσμα τη δημιουργία ταλαντώσεων. Σε κατάσταση συντονισμού των ηλεκτρονίων προκαλείται έντονη ταλάντωση και το κβάντο της ενέργειας ταλάντωσης



Εικόνα 1.5. Φαινόμενο συντονισμού επιφανειακών πλάσμονίων (SPR) [15]

ονομάζεται πλασμόνιο (Εικόνα 1.5). Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR) και καθορίζει τα οπτικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων στο φάσμα υπεριώδους-ορατού-εγγύς υπέρυθρου (UV-Vis-NIR). Είναι υπεύθυνο για τα έντονα χρώματα των υδατικών διαλυμάτων των νανοσωματιδίων δίνοντας χαρακτηριστική ζώνη απορρόφησης στο υπεριώδες-ορατό, η οποία δεν εμφανίζεται στο φάσμα των αντίστοιχων μακροσκοπικών υλικών. Η απορρόφηση εξαρτάται από το μέγεθος, το σχήμα, τη διηλεκτρική σταθερά του μετάλλου και το διηλεκτρικό μέσο που είναι διεσπαρμένα. Όσον αφορά το μέγεθος, με την αύξηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων αυξάνεται το μήκος κύματος που εμφανίζεται η μέγιστη απορρόφηση και το εύρος της ζώνης. Το SPR των ανισότροπων νανοσωματιδίων διαφέρει από τα ισότροπα (σφαιρικά) νανοσωματίδια. Τα ανισότροπα σωματίδια έχουν εγκάρσιες και διαμήκεις ταλαντώσεις σε διαφορετικά μήκη κύματος φωτός και εμφανίζουν δύο διακριτές ζώνες SPR, ενώ τα σφαιρικά νανοσωματίδια μόνο μία. Η κατά μήκος απορρόφησης φωτός και η σκέδαση συμβάλλουν στη διαμήκη ζώνη του πλασμονίου, ενώ η απορρόφηση και η κατανομή φωτός κατά μήκος του μικρού άξονα του σωματιδίου συμβάλλουν στην εγκάρσια ζώνη πλασμονίου [1], [3], [9], [15]. Ενδεικτικά, η επίδραση του σχήματος και του μεγέθους νανοσωματιδίων αργύρου στο χρώμα του διαλύματός τους φαίνεται στην Εικόνα 1.6.



Εικόνα 1.6. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis και το χρώμα υδατικών διαλυμάτων νανοσφαιρών αργύρου διαμέτρου μεταξύ 10 και 100 nm (πάνω) και νανοπλακών αργύρου μεταξύ 50 και 150 nm (κάτω) [16]

Οι οπτοηλεκτρονικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων αξιοποιούνται σε ημιαγωγούς, μπαταρίες αλλά και σε βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως σε βιοαισθητήρες, στη φωτοθερμική θεραπεία και τη βιοαπεικόνιση με τα νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) και αργύρου (AgNPs) να είναι τα πιο διαδεδομένα [10].

1.4.2. Μηχανικές ιδιότητες

Εξαιτίας των επιφανειακών και κβαντικών φαινομένων, τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν διαφορετικές μηχανικές ιδιότητες συγκριτικά με εκείνες των αντίστοιχων μακροσκοπικών υλικών. Για παράδειγμα, η

συμβατική σκόνη $FeAl$ που αποτελείται από μικροσωματίδια (μεγαλύτερα από $4 \mu m$), είναι εύθραυστη, ενώ η εξαιρετικά λεπτή σκόνη κράματος $FeAl$ εμφανίζει έναν καλό συνδυασμό αντοχής και ολκιμότητας, καθώς και ενισχυμένης πλαστικότητας [17]. Άλλες μηχανικές ιδιότητες που εξαρτώνται από το μέγεθος είναι το μέτρο ελαστικότητας, η σκληρότητα, η τριβή και η πρόσφυση. Η διαφορά αυτή οφείλεται στις δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των νανοσωματιδίων ή μεταξύ των νανοσωματιδίων και μίας επιφάνειας, όπως οι δυνάμεις Van der Waals και οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Διάφορες θεωρίες έχουν προταθεί για την ερμηνεία των δυνάμεων αλληλεπίδρασης μεταξύ των νανοσωματιδίων με σημαντικότερες τη θεωρία DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek), τη θεωρία JKR (Johnson-Kendall-Roberts) και τη θεωρία DMT (Derjaguin-Muller-Toporog). Οι μηχανικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων αξιοποιούνται σε τομείς, όπως η μηχανική επιφανειών, η τριβολογία, η νανοκατασκευή και η νανοκατεργασία [18].

1.4.3. Θερμικές ιδιότητες

Η ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα των νανοσωματιδίων επηρεάζεται άμεσα από το μέγεθός τους. Δεδομένου ότι η αγωγιμότητα των ηλεκτρονίων είναι ένας από τους δύο κύριους τρόπους με τους οποίους μεταφέρεται η θερμότητα, η υψηλότερη αναλογία επιφάνειας προς όγκο των νανοσωματιδίων παρέχει μεγαλύτερο αριθμό ηλεκτρονίων για μεταφορά θερμότητας σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μακροσκοπικά υλικά. Η ιδιότητα αυτή χρησιμοποιείται για τη δημιουργία νανορευστών με τη διασπορά νανοσωματιδίων σε ένα υγρό όπως το νερό, η αιθυλενογλυκόλη ή τα έλαια. Σε αυτή την περίπτωση η θερμική αγωγιμότητα προωθείται επίσης από τη μικροσυναγωγή, η οποία προκύπτει από την κίνηση Brown των νανοσωματιδίων. Τα νανορευστά αναμένεται να εμφανίζουν σημαντικά βελτιωμένη θερμική αγωγιμότητα σε σχέση με εκείνη των συμβατικών υγρών μεταφοράς θερμότητας. Για παράδειγμα, η προσθήκη νανοσωματιδίων χαλκού (CuNPs) στην αιθυλενογλυκόλη ενισχύει τη θερμική αγωγιμότητα του ρευστού έως και 40% [19], [20].

Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η θερμοχωρητικότητα των νανοσωματιδίων υπερβαίνει τις τιμές των αντίστοιχων μακροσκοπικών υλικών έως και 10%, όπως στην περίπτωση των νανοσωματιδίων Al_2O_3 . Ακόμη, παρουσιάζουν συνήθως και σημαντική μείωση στη θερμοκρασία τήξης ως αποτέλεσμα της βελτιωμένης ελεύθερης ενέργειας στην επιφάνεια του νανοσωματιδίου λόγω της υψηλής αναλογίας επιφάνειας προς τον όγκο. Για παράδειγμα, η θερμοκρασία τήξης των AuNPs διαμέτρου 3 nm είναι 300 βαθμούς χαμηλότερη από τη θερμοκρασία τήξης του χρυσού. Επιπλέον, τα διμεταλλικά νανοσωματίδια από κράμα παρουσιάζουν γενικά υψηλότερες θερμοκρασίες τήξης και θερμική σταθερότητα από τα μονομεταλλικά νανοσωματίδια λόγω του φαινομένου του κράματος [3].

1.4.4. Μαγνητικές ιδιότητες

Στον μακρόκοσμο οι περισσότερες μαγνητικές ενώσεις περιλαμβάνουν σίδηρο, κοβάλτιο ή νικέλιο (*Fe*, *Co* ή *Ni*), στοιχεία γνωστά για τις μαγνητικές ιδιότητές τους σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, ενώ στοιχεία όπως ο *Au* και ο *Ag* είναι διαμαγνητικά. Ωστόσο, στη νανοκλίμακα πολλά υλικά γίνονται μαγνητικά με τη μορφή νανοσωματιδίων, όπως το *Pd* και ο *Au*, ως αποτέλεσμα της ανομοιόμορφης ηλεκτρονικής κατανομής. Με τη μείωση του μεγέθους η ενέργεια μαγνητικής ανισοτροπίας ανά νανοσωματίδιο μειώνεται. Η ενέργεια μαγνητικής ανισοτροπίας είναι η ενέργεια που διατηρεί τη μαγνητική ροπή σε έναν συγκεκριμένο προσανατολισμό. Σε ένα χαρακτηριστικό μέγεθος για κάθε τύπο νανοσωματιδίων, η ενέργεια της ανισοτροπίας γίνεται ίση με τη θερμική ενέργεια, η οποία επιτρέπει την τυχαία ανατροπή της μαγνητικής ροπής. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται υπερπαραμαγνητισμός και τα νανοσωματίδια ορίζονται ως υπερπαραμαγνητικά. Εμφανίζουν υψηλή μαγνήτιση μόνο παρουσία μαγνητικού πεδίου και όταν αυτό αφαιρεί δε διατηρούν καμία μαγνήτιση. Βασικές παράμετροι για τον προσδιορισμό των μαγνητικών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων είναι το μέγεθος και το σχήμα. Επιπλέον, γενικά η τροποποίηση της σύνθεσης των νανοσωματιδίων με την υιοθέτηση μαγνητικών προσμείξεων είναι γνωστό ότι αλλάζει σημαντικά τον μαγνητισμό τους. Οι μαγνητικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων βρίσκουν εφαρμογή σε τομείς, όπως η αποθήκευση δεδομένων, ο καθαρισμός του νερού και χρησιμοποιούνται ως ανιχνευτές και φορείς στις βιοϊατρικές επιστήμες [21].

1.4.5. Καταλυτικές ιδιότητες

Η νανο-κατάλυση, δηλαδή η χρήση των νανοσωματιδίων ως καταλυτών, είναι ένα ταχέως εξελισσόμενο πεδίο στη χημική κατάλυση. Οι καταλύτες νανοσωματιδίων παρουσιάζουν σημαντικά βελτιωμένες ή νέες καταλυτικές ιδιότητες, όπως η δραστικότητα και η εκλεκτικότητα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μακροσκοπικά υλικά τους. Οι καταλυτικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων εξαρτώνται από το μέγεθός τους και η σχέση τους είναι αντίστροφη, δηλαδή όσο μικρότερα είναι τα νανοσωματίδια τόσο πιο καταλυτικά ενεργά είναι. Αυτό μπορεί να αποδοθεί σε φαινόμενα κβαντικού μεγέθους που δημιουργούνται από τον περιορισμό ηλεκτρονίων μέσα σε έναν μικρό όγκο και της υψηλής αναλογίας επιφάνειας προς τον όγκο των νανοσωματιδίων. Το σχήμα είναι, επίσης, γνωστό ότι επηρεάζει την δραστικότητα και την επιλεκτικότητά τους. Για παράδειγμα, για την οξειδωση του στυρενίου από AgNPs οι νανοκύβοι είναι δεκατέσσερις φορές πιο αποτελεσματικοί από τις νανοπλάκες και τέσσερις φορές πιο αποτελεσματικοί από τις νανοσφαίρες. Οι δραματικές αυτές αλλαγές αποδίδονται στην αύξηση/μείωση της σχετικής περιοχής των καταλυτικά ενεργών επιφανειών ή στις διαφορές στη σταθερότητα για διαφορετικά σχήματα των νανοσωματιδίων. Όσον αφορά τον παράγοντα της σύνθεσης, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση κραμάτων μπορεί να ενισχύσει την καταλυτική δραστηριότητα. Γενικά, η αλλαγή

στη σύνθεση των νανοσωματιδίων αλλάζει την ηλεκτρονική δομή των μεταλλικών επιφανειών με τον σχηματισμό διμεταλλικών δεσμών, καθώς και την τροποποίηση των μηκών δεσμών μετάλλου-μετάλλου. Επιπλέον, το φαινόμενο μεταφοράς φορτίου μεταξύ διαφορετικών μετάλλων μπορεί να αλλάξει ευνοϊκά την ενέργεια δέσμευσης των προσροφητικών, να μειώσει τα εμπόδια για συγκεκριμένες χημικές αντιδράσεις και να ελαττώσει τις επιδράσεις δηλητηρίασης [3].

1.5. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων

Οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων καθορίζουν τις πιθανές εφαρμογές τους. Για τον λόγο αυτό, πολλές διαφορετικές μέθοδοι και τεχνικές χρησιμοποιούνται για την ανάλυση και τον χαρακτηρισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους. Συγκεκριμένα, αφορούν τον μορφολογικό και τοπογραφικό χαρακτηρισμό τους, τον δομικό και χημικό χαρακτηρισμό τους και τον χαρακτηρισμό των οπτοηλεκτρονικών, μαγνητικών, θερμικών και μηχανικών ιδιοτήτων τους [3]. Παρακάτω παρουσιάζονται οι περισσότερες από τις αναλυτικές τεχνικές χαρακτηρισμού που χρησιμοποιούνται, καθώς και οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά που προσδιορίζει η κάθε μία (Πίνακας 1.1). Στη συνέχεια περιγράφονται αναλυτικότερα οι πιο κοινές τεχνικές.

Πίνακας 1.1. Τεχνικές και μέθοδοι χαρακτηρισμού NPs [3]

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ	ΜΕΓΕΘΟΣ	ΣΧΗΜΑ	ΚΑΤΑΝΟΜΗ	ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ	ΕΙΔΙΚΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΟΡΩΝ
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ & ΤΟΠΟΓΡΑΦΙΚΟΣ	TEM	✓	✓	✓	✓			
	SEM	✓	✓	✓	✓			
	STM					✓		
	DLS	✓		✓				
	NTA	✓		✓				
	BET						✓	
	BJH							✓

		ΣΥΣΤΑΣΗ	ΦΑΣΗ	ΚΡΥΣΤΑΛΛΙ- ΚΟΤΗΤΑ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ	ΟΞΕΙΔΩΣΗ	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟ ΦΟΡΤΙΟ	ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ	ΔΕΣΜΟΙ	ΗΛΕΚΤΡΟ- ΧΗΜΙΚΑ
ΔΟΜΙΚΟΣ & ΧΗΜΙΚΟΣ	XRD		✓	✓						
	EDX	✓								
	HAADF	✓								
	XPS	✓				✓			✓	✓
	FTIR	✓			✓	✓		✓	✓	
	Zeta Potential						✓			
	CV					✓				✓
	Raman Spectroscopy			✓					✓	
		ΔΙΣΦΡΑΣΙΟΤΗΤΑ	ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΕΦΕΛΚΥΣΜΟ	ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΘΛΙΨΗ	ΕΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ	ΙΣΟΔΟΕΛΑΣΤΙ- ΚΟΤΗΤΑ	ΣΚΛΗΡΟΤΗΤΑ	ΔΥΣΚΑΜΨΙΑ		
ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ	UTM		✓	✓	✓					
	Nano-indentation	✓		✓	✓		✓			
	DMA					✓		✓		
		ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ	ΑΝΑΚΛΑΣΗ	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ	ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ	ΔΙΑΚΕΝΟ ΖΩΝΗΣ	ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	ΦΩΤΟ- ΔΡΑΣΙΚΟΤΗΤΑ	ΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ	
ΟΠΤΟΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΣ	Raman Spectroscopy						✓			
	SERS						✓			
	UV-Vis	✓	✓			✓				
	PL			✓	✓					
	DRS					✓	✓	✓	✓	
	Ellipsometry	✓	✓							✓

		ΜΑΓΝΗΤΙΣΗ ΚΟΡΕΣΜΟΥ	ΠΑΡΑΜΕΝΟΥΣΑ ΜΑΓΝΗΤΙΣΗ	ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ	ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ϵ	ΕΝΤΑΣΗ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΠΕΔΙΟΥ	ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΔΥΝΑΜΗ	ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ	MFM				✓	✓	✓	
	VSM	✓	✓	✓				
	SQUID	✓	✓	✓				✓
	ESR				✓			
		ΣΗΜΕΙΟ ΤΡΗΣΗΣ	ΣΗΜΕΙΟ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ	ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΔΟΜΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ	ΘΕΡΜΟΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑ	ΘΕΡΜΙΚΗ ΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ	ΘΕΡΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ	ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ
ΘΕΡΜΙΚΟΣ	DSC	✓	✓	✓	✓			✓
	DTA	✓	✓	✓				✓
	TGA	✓		✓			✓	
	THW					✓	✓	

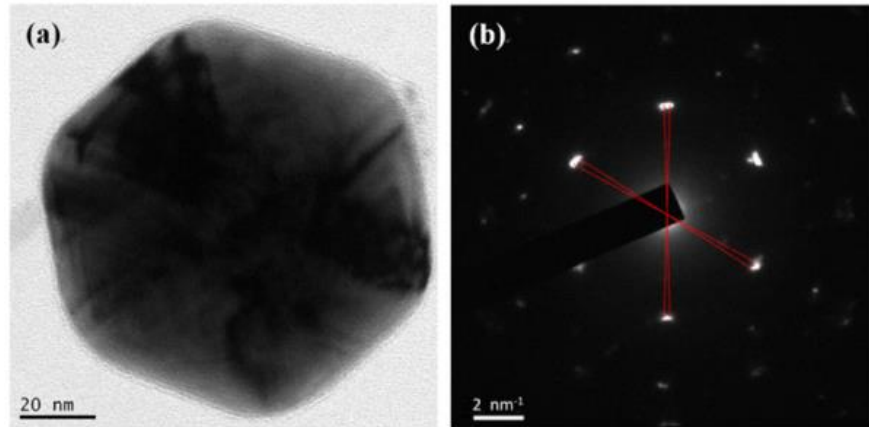
1.5.1. Χαρακτηρισμός οπτοηλεκτρονικών ιδιοτήτων

Ανάμεσα στις αναλυτικές τεχνικές χαρακτηρισμού των οπτοηλεκτρονικών ιδιοτήτων νανοσωματιδίων (Πίνακας 1.1), η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis spectroscopy) είναι εκείνη που χρησιμοποιείται περισσότερο από κάθε άλλη. Αποτελεί μία πολύ χρήσιμη, εύκολη, ευαίσθητη, μη καταστρεπτική και αξιόπιστη τεχνική για την παρακολούθηση της σύνθεσης των νανοσωματιδίων και τον αρχικό χαρακτηρισμό τους. Επιπλέον, για τη λήψη των μετρήσεων απαιτείται μόνο ένα μικρό χρονικό διάστημα και δεν χρειάζεται βαθμονόμηση. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος και το νόμο του Lambert-Beer. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται στην περιοχή του ορατού (800 – 400 nm) και στο εγγύς υπεριώδες (400 – 190 nm). Το φάσμα που λαμβάνεται είναι αποτέλεσμα της ιδιότητας των νανοσωματιδίων να αλληλεπιδρούν ισχυρά με συγκεκριμένα μήκη κύματος ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και του φαινομένου συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων SPR (§ 1.4.1). Η ζώνη απορρόφησης είναι χαρακτηριστική για κάθε τύπο νανοσωματιδίων και εξαρτάται από το μέγεθος, το σχήμα, τη διηλεκτρική σταθερά του μετάλλου και το διηλεκτρικό μέσο που είναι διεσπαρμένα [1], [22].

1.5.2. Μορφολογικός και τοπογραφικός χαρακτηρισμός

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, όπως το μέγεθος, το σχήμα, η κατανομή και η συσσωμάτωση, καθορίζουν τις ιδιότητές τους και κατ' επέκταση τις πιθανές εφαρμογές τους. Επόμενως, ο χαρακτηρισμός τους είναι υψηλής σημασίας και πολλές τεχνικές χρησιμοποιούνται (Πίνακας 1.1). Από τις πιο κοινές είναι η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM), η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) και η δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).

- ❖ TEM: Πρόκειται για μία τεχνική χαρακτηρισμού των νανοσωματιδίων που παρέχει πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος, το σχήμα και την κατανομή του μεγέθους τους μέσω της απεικόνισής τους. Ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης διαθέτει δύο τρόπους λειτουργίας, με τη δημιουργία είτε εικόνας ηλεκτρονίων (image mode) είτε εικόνας περίθλασης του δείγματος (diffraction pattern mode) (Εικόνα 1.7). Από μία κάθοδο (πηγή) εκπέμπονται ηλεκτρόνια που επιταχύνονται προς την άνοδο με την επιβολή διαφοράς δυναμικού. Η πορεία των ηλεκτρονίων ρυθμίζεται από δύο ηλεκτρομαγνητικά πηνία που είναι τοποθετημένα έτσι ώστε η δέσμη των ηλεκτρονίων να περνά κατά μήκος του άξονά τους. Αλλάζοντας την ένταση του ρεύματος που τους διαπερνάει, μεταβάλλεται η ένταση του μαγνητικού πεδίου τους (δηλαδή η εστιακή τους απόσταση) επιτυγχάνοντας την εστίαση της δέσμης των ηλεκτρονίων σε μία περιοχή ελάχιστων τετραγωνικών μικρομέτρων (μm^2) στο επίπεδο του αντικειμένου. Ο αντικειμενικός φακός που βρίσκεται ακριβώς μετά το δείγμα σχηματίζει στο εστιακό του επίπεδο την περίθλαση μακρινού πεδίου του δείγματος η οποία αποτελεί τον μετασχηματισμό Fourier (σε αντίστροφο χώρο) των κρυσταλλικών χαρακτηριστικών του δείγματος. Πρόκειται για την εικόνα περίθλασης του δείγματος και επιτρέπει τη μελέτη της κρυσταλλικής δομής του αντικειμένου μέσω της εικόνας περίθλασης ηλεκτρονίων επιλεγμένης περιοχής (Selected Area Electron Diffraction, SAED). Ακολούθως, τα ηλεκτρόνια διέρχονται από έναν ενδιάμεσο φακό (προβολικός φακός). Η εκ νέου μεγεθυμένη απεικόνιση του αντικειμένου προβάλλεται σε φθορίζουσα οθόνη, όπου η φθορίζουσα ουσία διεγείρεται από τα ηλεκτρόνια που προσπίπτουν πάνω της. Τα σημεία του δείγματος που δεν είναι διαπερατά από τα ηλεκτρόνια δίνουν σκοτεινές περιοχές (ηλεκτρονιόφιλες, ηλεκτρονιακά πυκνές, electron dense), ενώ αντίθετα τα διαπερατά σημεία (ηλεκτρονιακά διαφανή, electron lucent) μας δίνουν φωτεινές περιοχές [23], [24]. Τα κύρια μειονεκτήματα της τεχνικής είναι η απαίτηση υψηλού κενού αυξάνοντας το κόστος της και η προετοιμασία του δείγματος, που είναι χρονοβόρα και υπάρχει κίνδυνος συρρίκνωσης ή συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων όταν το δείγμα αφήνεται να στεγνώσει. Επιπλέον, η ποσότητα του δείγματος είναι αρκετά μικρή και ίσως όχι τόσο αντιπροσωπευτική για πληροφορίες σχετικά με την κατανομή μεγέθους και τον πραγματικό πληθυσμό [1].



Εικόνα 1.7. (a) Εικόνα φωτεινού πεδίου TEM (b) SAED [25]

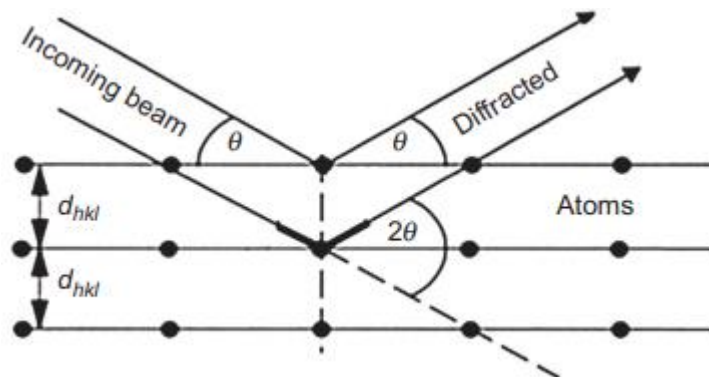
- ❖ SEM: Είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως και έχει πολλές ομοιότητες με το TEM. Σε αντίθεση όμως με το TEM, η αρχή λειτουργίας του SEM βασίζεται σε διασκορπισμένα ηλεκτρόνια, τα δευτερεύοντα και τα οπισθοσκεδαζόμενα. Τα πρώτα προκύπτουν από ανελαστική σκέδαση και δίνουν πληροφορίες για τα μορφολογικά και τοπογραφικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, ενώ τα δεύτερα για τη σύσταση προερχόμενα από ελαστική σκέδαση. Επιπλέον, το SEM εστιάζει στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, ενώ στις εικόνες TEM διαφάνεται και το εσωτερικό τους. Το TEM πλεονεκτεί ως προς τη μεγέθυνση και την ανάλυση, αλλά οι εικόνες SEM έχουν καλύτερο βάθος πεδίου [26].
- ❖ DLS: Είναι από τις πιο κοινές τεχνικές χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων παρέχοντας πληροφορίες για το μέγεθος και τον δείκτη πολυδιασποράς των νανοσωματιδίων. Είναι μία γρήγορη μέθοδος, μη καταστρεπτική για το δείγμα, απόλυτη γιατί δε χρειάζεται βαθμονόμηση και απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία δείγματος. Η τεχνική βασίζεται στην κίνηση Brown, δηλαδή την τυχαία κίνηση των σωματιδίων που προκαλείται από τις πολλαπλές συγκρούσεις με τα μόρια του διαλύτη που τα περιβάλλει και κινούνται εξαιτίας της θερμικής τους ενέργειας. Σημαντικό χαρακτηριστικό της κίνησης Brown είναι ότι τα μικρότερα σωματίδια κινούνται ταχύτερα σε αντίθεση με τα μεγαλύτερα που κινούνται πιο αργά. Περιγράφεται μέσω της εξίσωσης Stokes – Einstein και του συντελεστή διάχυσης στο συγκεκριμένο μέσο διασποράς που εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων, τη δομή της επιφάνειας και τη συγκέντρωση των ιόντων στο μέσο. Όταν μία μονοχρωματική ακτινοβολία (laser) προσπίπτει στα σωματίδια, αυτά σκεδάζουν το φως προς όλες τις κατευθύνσεις και η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός μεταβάλλεται συναρτήσει του χρόνου. Οι μεταβολές της έντασης σχετίζονται με την ταχύτητα της κίνησης Brown και κατ' επέκταση με το μέγεθος των σωματιδίων. Επομένως, πραγματοποιούνται μετρήσεις της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας δημιουργώντας την καμπύλη συσχέτισης από την οποία υπολογίζεται ο συντελεστής διάχυσης και στη συνέχεια η υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων (d_h). Η υδροδυναμική διάμετρος ή

διάμετρος Stokes είναι η διάμετρος μίας υποθετικής σκληρής σφαίρας που έχει τον ίδιο συντελεστή διάχυσης με το σωματίδιο που μετράται και από την οποία προκύπτει τελικά το Z-μέσο (Z-average) μέγεθος των σωματιδίων. Αυτό είναι συγκρίσιμο με το μέγεθος που μετράται από άλλες τεχνικές μόνο εάν το δείγμα είναι μονομερές, δηλαδή έχει μόνο μία κορυφή, και σφαιρικό ή σχεδόν σφαιρικό, δηλαδή έχει πολύ στενό πλάτος κατανομής. Συνήθως, το μέγεθος που μετράται με το DLS είναι μεγαλύτερο από αυτό που μετράται με το TEM και το SEM, πιθανόν λόγω της επίδρασης της κίνησης Brown. Επιπλέον, υπολογίζεται ο δείκτης πολυδιασποράς (Polydispersity Index, PDI) που σχετίζεται με την ομοιογένεια στο μέγεθος των σωματιδίων και είναι αδιάστατος αριθμός. Τιμές μικρότερες από 0,05 εμφανίζονται σπάνια εκτός από τα πρότυπα υψηλής μονοδιασποράς, ενώ τιμές μεγαλύτερες από 0,7 δείχνουν ότι το δείγμα έχει πολύ μεγάλη κατανομή και πιθανώς είναι ακατάλληλο [27], [28].

1.5.3. Δομικός και χημικός χαρακτηρισμός

Εξίσου σημαντικός είναι και ο δομικός και χημικός χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων λόγω της επίδρασης χαρακτηριστικών, όπως η κρυσταλλικότητα και το επιφανειακό φορτίο, στις φυσικοχημικές ιδιότητές τους. Μεταξύ των αναλυτικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται οι πιο κοινές είναι η περιθλασιομετρία ακτίνων-X (X-ray Diffraction, XRD), το Zeta potential και η φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR).

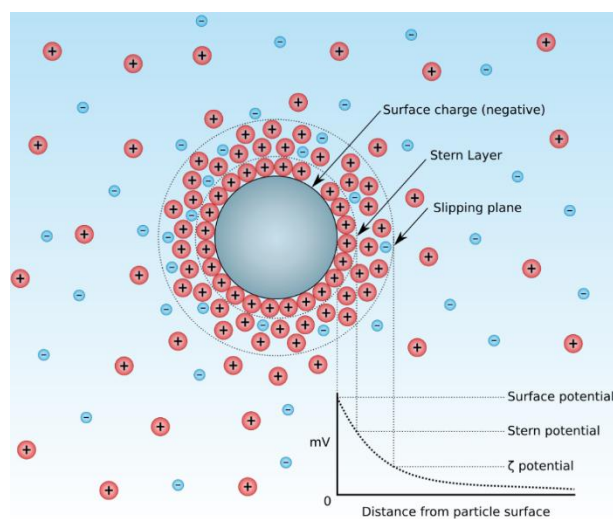
- ❖ XRD: Η περιθλασιομετρία ακτίνων-X με τη μέθοδο της κόνεως (powder) είναι μία αναλυτική μη καταστρεπτική τεχνική προσδιορισμού της κρυσταλλικής δομής των σωματιδίων και της χημικής τους σύστασης. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής βασίζεται στην περίθλαση των ακτίνων-X. Όταν μία δέσμη ακτίνων-X προσκρούει στην επιφάνεια ενός κρυστάλλου υπό γωνία θ , ένα τμήμα της σκεδάζεται από το επιφανειακό στρώμα των ατόμων. Το μη σκεδαζόμενο τμήμα της δέσμης εισέρχεται στο δεύτερο στρώμα, όπου και πάλι ένα μέρος της δέσμης σκεδάζεται ενώ το υπόλοιπο



Εικόνα 1.8. Περίθλαση των ακτίνων-X από έναν κρύσταλλο [29]

εισέρχεται και φτάνει στο τρίτο στρώμα. Όταν οι ακτίνες-Χ σκεδάζονται στο οργανωμένο περιβάλλον του κρυστάλλου, συμβαίνει συμβολή (ενισχυτική ή καταστρεπτική) των σκεδαζόμενων ακτίνων, επειδή οι αποστάσεις μεταξύ των κέντρων σκέδασης είναι του ίδιου μεγέθους με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Το αθροιστικό αποτέλεσμα της σκέδασης αυτής είναι η περίθλαση της δέσμης (Εικόνα 1.8). Προϋποθέσεις για περίθλαση των ακτίνων-Χ είναι οι αποστάσεις μεταξύ των στρωμάτων των ατόμων να είναι περίπου ίδιες με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και τα κέντρα σκέδασης να κατανέμονται στο χώρο με υψηλή κανονικότητα. Η συνθήκη για ενισχυτική συμβολή της δέσμης για τη γωνία θ δίνεται μέσω της εξίσωσης Bragg. Με την καταγραφή της περιθλώμενης ακτινοβολίας ως συνάρτηση της γωνιακής θέσης που έχει ο ανιχνευτής κάθε φορά αποτυπώνεται το διάγραμμα περίθλασης του δείγματος, όπου οι κορυφές που εμφανίζονται είναι αποτέλεσμα του φαινομένου της ενισχυτικής συμβολής [22].

- ❖ Zeta potential: Τα περισσότερα υγρά περιέχουν ιόντα θετικά και αρνητικά φορτισμένα, τα οποία έλκονται στην επιφάνεια ενός φορτισμένου σωματίδιου όταν αυτό διαλυθεί στο υγρό. Τα ιόντα που έλκονται είναι αντίθετα φορτισμένα από το φορτίο του σωματιδίου και δημιουργούν μία ηλεκτρική διπλοστοιβάδα (Εικόνα 1.9). Τα ιόντα που είναι πιο κοντά στην επιφάνεια έλκονται πιο ισχυρά αποτελώντας τη στοιβάδα Stern, ενώ εκείνα που είναι πιο μακριά έλκονται λιγότερο ισχυρά αποτελώντας τη στοιβάδα διάχυσης. Στη στοιβάδα διάχυσης υπάρχει ένα νοητό όριο, που ονομάζεται επίπεδο ολίσθησης, όπου τα ιόντα μέσα από αυτό κινούνται μαζί με το σωματίδιο όταν κινείται στο υγρό, ενώ τα ιόντα έξω από αυτό παραμένουν σταθερά. Το δυναμικό στο επίπεδο ολίσθησης ονομάζεται ζ-δυναμικό και μετράται με έναν συνδυασμό μεθόδων. Η πρώτη είναι η ηλεκτροφόρηση, η οποία με την επιβολή ενός δυναμικού θέτει σε κίνηση τα φορτισμένα σωματίδια σε ένα υγρό, και η δεύτερη είναι η ταχυμετρία Laser Doppler, η οποία μετράει την ηλεκτροφορητική



Εικόνα 1.9. Η συγκέντρωση των ιόντων και η διαφορά δυναμικού σε συνάρτηση με την απόσταση από την φορτισμένη επιφάνεια ενός σωματιδίου σε ένα μέσο διασποράς [30]

κινητικότητα ενός σωματιδίου ανιχνεύοντας την αλλαγή συχνότητας της ανακλώμενης ακτίνας laser από το κινούμενο σωματίδιο. Γνωρίζοντας την ηλεκτροφορητική κινητικότητα (U_E) του σωματιδίου μπορεί να υπολογιστεί το ζ-δυναμικό (z) για υδατικά μέσα και για μέτριες ηλεκτρολυτικές συγκεντρώσεις μέσω της προσέγγισης Smoluchowski. Το ζ-δυναμικό παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων μέσα στο υγρό μέσο διασποράς και την τάση για συσσωμάτωση [28]. Υψηλές τιμές ζ-δυναμικού, δηλαδή μεγαλύτερες από 25 mV κατά απόλυτη τιμή, υποδεικνύουν υψηλή σταθερότητα της διασποράς μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων που προκαλούν άπωση μεταξύ των σωματιδίων αποτρέποντας τη συσσωμάτωσή τους. Ωστόσο, ένα σύστημα μπορεί να σταθεροποιείται με δυνάμεις Van der Waals ή στερεοχημικά που δεν αποτυπώνονται με τη μέτρηση του ζ-δυναμικού δίνοντας λανθασμένη εντύπωση με μικρές τιμές [27].

- ❖ FTIR: Πρόκειται για μία απλή, μη επεμβατική τεχνική με ακρίβεια, αναπαραγωγιμότητα και ευνοϊκή αναλογία σήματος προς θόρυβο. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στην απορρόφηση ή τη μετάδοση μέρους της ακτινοβολίας, όταν ένα υλικό/δείγμα ακτινοβολείται με υπέρυθρη ακτινοβολία. Τα φάσματα που παράγονται με βάση τη μοριακή απορρόφηση και μετάδοση αντιπροσωπεύουν ένα μοριακό δακτυλικό αποτύπωμα του δείγματος. Από αυτό λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με τη φύση του δείγματος, όπως οι εμπλεκόμενοι δεσμοί, η πολικότητα και η κατάσταση οξειδωσης του δείγματος με βάση τις λειτουργικές ομάδες που υπάρχουν. Χρησιμοποιείται κυρίως για τον χαρακτηρισμό οργανικών υλικών, για την αναγνώριση ακαθαρσιών όταν επιδιώκεται υψηλή καθαρότητα, για τον προσδιορισμό της ποσότητας των συστατικών σε ένα μείγμα ανάλογα με τα φάσματα δόνησης των επιφανειακών λειτουργικών ομάδων που υπάρχουν στο δείγμα και για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος κατά τη διάρκεια μίας καταλυτικής διαδικασίας. Επιπλέον, είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση βιομορίων που πιθανόν προσκολλούνται στην επιφάνεια νανοσωματιδίων κατά τη σύνθεσή τους με βιολογικές μεθόδους. Αυτά τα βιομόρια ενδεχομένως να είναι υπεύθυνα για την αναγωγή και σταθεροποίηση των μεταλλικών νανοσωματιδίων [1], [3], [31].

1.6. Νανοσωματίδια αργύρου

1.6.1. Άργυρος και νιτρικός άργυρος

Ο άργυρος (Ag) είναι ευγενές μέταλλο και έχει την υψηλότερη ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα αλλά και τη μεγαλύτερη οπτική ανακλαστικότητα στα μήκη κύματος του ορατού φωτός. Είναι ένα από τα πρώτα μέταλλα που χρησιμοποιήθηκαν από τον άνθρωπο, μετά τον χρυσό και τον χαλκό γύρω στο 4000 π.Χ., ως υλικό σε νομίσματα, οικιακά σκεύη και κοσμήματα λόγω της λευκής μεταλλικής όψης, της

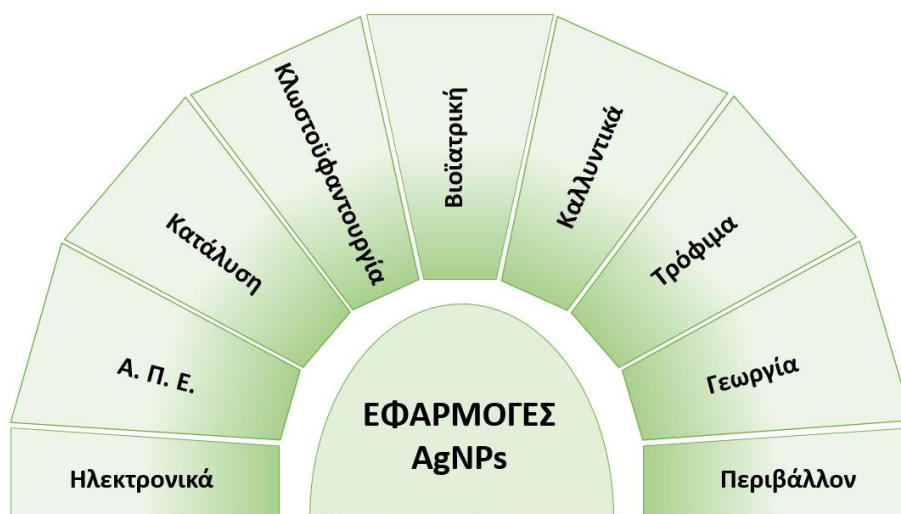
ευπλαστότητας, της ελαστικότητας και της αντοχής του στην ατμοσφαιρική οξείδωση. Επιπλέον, χρησιμοποιούταν για αντιβακτηριακές και θεραπευτικές εφαρμογές. Οι αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι χρησιμοποιούσαν τα ασημικά για να αποθηκεύουν νερό, φαγητό και κρασί για να αποφύγουν την αλλοίωσή τους. Ο μεταλλικός άργυρος δεν προσβάλλεται από το νερό ή από οξέα, ωστόσο, απελευθερώνει συνεχώς μικρές ποσότητες ιόντων, τα οποία δρουν αντιβακτηριακά στην επιφάνεια του μετάλλου. Πιο συγκεκριμένα, όταν ο μεταλλικός άργυρος εκτίθεται σε νερό και βιολογικό περιβάλλον που περιέχει οξυγόνο ή/και υπεροξείδιο, η εκτεθειμένη του επιφάνεια οξειδώνεται σχηματίζοντας ένα στρώμα από οξείδιο του αργύρου. Υπό συγκεκριμένες συνθήκες, όπως όξινες ή οξειδωτικές συνθήκες, κατιόντα αργύρου (Ag^+) μπορούν να ελευθερωθούν από την επιφάνεια του οξειδίου του αργύρου, τα οποία έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Ο Ιπποκράτης χρησιμοποιούσε παρασκευάσματα αργύρου για τη θεραπεία των ελκών και την προώθηση της επούλωσης των πληγών. Ο νιτρικός άργυρος χρησιμοποιήθηκε επίσης για την περιποίηση τραυμάτων και την απολύμανση των οργάνων. Το 1852, ο Sims έραψε τα κυστεοκολλικά συρίγγια που προκλήθηκαν από τον τοκετό με λεπτά ασημένια σύρματα που μείωσαν σημαντικά τη μόλυνση. Στις αρχές του 19^{ου} αιώνα αναπτύχθηκαν παρασκευάσματα αργύρου για την πρόληψη μόλυνσης του τραύματος και τη φροντίδα των εγκαυμάτων. Ωστόσο, στη δεκαετία του 1940, οι ιατρικές εφαρμογές του αργύρου έδωσαν τη θέση τους στην κλινική εισαγωγή των αντιβιοτικών [32], [33].

Η εφαρμογή του μεταλλικού αργύρου ως βακτηριοκτόνου παράγοντα απαιτεί την οξείδωσή του σε ιόντα Ag^+ , η οποία είναι μια αργή διαδικασία υπό κανονικές συνθήκες και οδηγεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις αργύρου. Επομένως, συνηθίζεται να χρησιμοποιούνται άλατα αυτού, όπως ο νιτρικός άργυρος. Ο νιτρικός άργυρος ($AgNO_3$) εμφανίζεται ως ένα άχρωμο ή λευκό κρυσταλλικό στερεό που γίνεται μαύρο με την έκθεση στο φως ή σε οργανικό υλικό. Είναι μια ανόργανη χημική ουσία με αντισηπτική δράση και μπορεί ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας καυτηριασμού. Το 1881 ο Carl Siegmund Franz Credé εισήγαγε τη χρήση αραιών διαλυμάτων $AgNO_3$ στα μάτια νεογνών κατά τη γέννηση για την πρόληψη μόλυνσης με γονόρροια από τη μητέρα, που μπορούσε να προκαλέσει τύφλωση. Η υψηλή διαλυτότητα του νιτρικού αργύρου οδηγεί σε υψηλή τοπική συγκέντρωση αργύρου, με αποτέλεσμα τη θανάτωση των βακτηρίων και τη καταστροφή του περιβάλλοντα ιστού. Αποτελεί πρόδρομη ένωση για πολλές άλλες ενώσεις του αργύρου, καθώς είναι το φθηνότερο άλας του και επιπλέον δεν είναι υγροσκοπικός [34], [35].

Η κατάχρηση και η αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών έχει αυξήσει τη μικροβιακή αντοχή δυσχεραίνοντας τη θεραπεία μικροβιακών ασθενειών, το οποίο αποτελεί πλέον ένα παγκόσμιο πρόβλημα. Σε μία προσπάθεια εύρεσης εναλλακτικών θεραπειών ή μεθόδων οικονομικά αποδεκτών, ο άργυρος άρχισε να τυγχάνει ξανά προσοχής ειδικά με την ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας στις αρχές αυτού του αιώνα. Τα νανοσωματίδια αποτελούν έναν καλό εναλλακτικό υποψήφιο σε πολλές περιπτώσεις.

1.6.2. Ιδιότητες και εφαρμογές

Τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) διαθέτουν εξαιρετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως θερμικές, οπτοηλεκτρονικές και καταλυτικές. Ωστόσο, παρουσιάζουν και μοναδικές βιολογικές ιδιότητες. Η αντιβακτηριακή, η αντιμυκητιασική, η αντικική, η αντιφλεγμονώδης, η αντιοξειδωτική, η αντιαγγειογενετική, η αντικαρκινική, η αντιδιαβητική και η αντιοξειδωτική δράση τους δίνουν τη δυνατότητα αξιοποίησής τους σε μία πληθώρα εφαρμογών [1], [4] (Εικόνα 1.10). Ορισμένοι κλάδοι είναι της βιομηχανίας ηλεκτρονικών με την κατασκευή εύκαμπτων ασύρματων ηλεκτρονικών [36], των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας με εφαρμογή στα φωτοβολταϊκά [37], της κατάλυσης με τη φωτοκαταλυτική αποικοδόμηση βαφών [38], του περιβάλλοντος με την επεξεργασία νερού και αέρα [39], της γεωργίας με τη χρήση νανοεντομοκτόνων και νανολιπασμάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης [40], των τροφίμων με εφαρμογή στα υλικά συσκευασίας [41], της κλωστοϋφαντουργίας με την παρασκευή υφασμάτων που εμποδίζουν την υπεριώδη ακτινοβολία και για ιατρική χρήση (μάσκες, ιατρικές ρόμπες), της ιατροφαρμακευτικής περίθαλψης και των καλλυντικών με εφαρμογή σε τοπικές αλοιφές και κρέμες [42]. Ιδιαίτερα σημαντικός, όμως, είναι ο κλάδος της νανοβιοϊατρικής, ο οποίος τα τελευταία χρόνια αναπτύσσεται ταχύτατα και βρίσκει εφαρμογή σε τομείς, όπως της διάγνωσης, της απεικόνισης, των νανο-θεραπευτικών συστημάτων, των εμβολίων και της αναγεννητικής ιατρικής [4], [5], [10], [43].



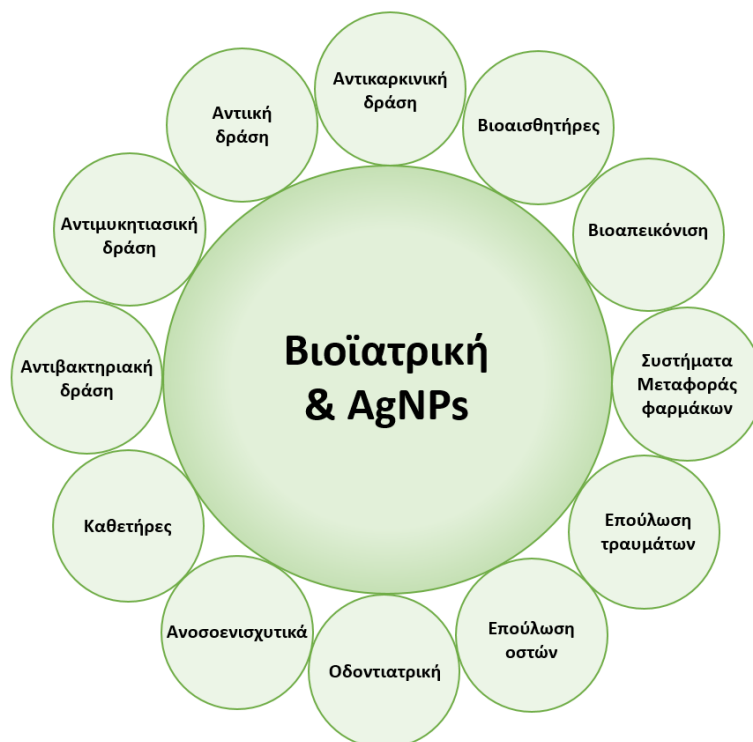
Εικόνα 1.10. Εφαρμογές των AgNPs

Αναλυτικότερα, οι κυριότερες εφαρμογές των AgNPs στη βιοϊατρική είναι [4], [5], [10], [43] (Εικόνα 1.11):

- ❖ Αντιβακτηριακή δράση: Τα AgNPs έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν αποτελεσματικά διάφορα παθογόνα βακτήρια, όπως τα *Staphylococcus aureus*, *E. coli* και *Pseudomonas aeruginosa*. Το μοναδικά μικρό τους μέγεθος ευνοεί την καλύτερη αλληλεπίδρασή τους με τα κύτταρα λόγω

μεγαλύτερης αναλογίας επιφάνειας προς όγκο. Η δράση τους εξαρτάται από το στέλεχος, το μέγεθος, το σχήμα, τη συγκέντρωση και το επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων. Έχει βρεθεί ότι μπορούν να ενισχύσουν τη δραστηριότητα του συμβατικού αντιβιοτικού ως φορείς.

- ❖ Αντιμυκητιασική δράση: Ορισμένες μελέτες επιβεβαιώνουν ότι τα AgNPs επιδεικνύουν καλές αντιμυκητιασικές ιδιότητες έναντι των *Colletotrichum coccodes*, *Monilinia sp.*, *Candida spp.* και διαφόρων παθογόνων μυκήτων των φυτών. Και σε αυτήν την περίπτωση η δράση τους εξαρτάται από το μέγεθος και τη δόση, ενώ μπορεί να επηρεαστεί και από τον τύπο των μέσων καλλιέργειας.
- ❖ Αντιική δράση: Τα AgNPs παρουσιάζουν καλή αντιική δράση έναντι του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV), της ανθρώπινης παραγρίπης (HPIV), του απλού έρπητα (HSV) και της γρίπης Α (H1N1). Για AgNPs μεγέθους μικρότερο από 10 nm η δράση τους είναι αποτελεσματικότερη, το οποίο μπορεί να οφείλεται στη μεγάλη περιοχή αντίδρασης και την ισχυρή προσκόλληση στην επιφάνεια του ιού.
- ❖ Αντικαρκινική δράση: Έχει παρατηρηθεί ότι τα AgNPs παρουσιάζουν καλές αντικαρκινικές δράσεις στον καρκίνο του μαστού, του τραχήλου της μήτρας, του παχέος εντέρου, των ωθηκών, του πνεύμονα, στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος, στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, στο μελάνωμα και στο οστεοσάρκωμα. Η δράση τους επηρεάζεται από το μέγεθος, το σχήμα, τη δόση και τη συγκέντρωση των AgNPs αλλά και από τον χρόνο έκθεσης και το μικροπεριβάλλον του όγκου. Σε γενικές γραμμές, τα AgNPs με μικρότερο μέγεθος μπορούν να προκαλέσουν ενισχυμένη ενδοκυττάρωση και πιο σημαντική κυτταροτοξικότητα και γονοτοξικότητα. Σε σύγκριση με άλλα σχήματα, τα σφαιρικά AgNPs παρουσιάζουν καλύτερη κυτταροτοξικότητα λόγω της υψηλότερης αναλογίας επιφάνειας προς όγκο, ενώ υψηλότερη δόση AgNPs συνήθως οδηγεί σε υψηλότερη απόπτωση.
- ❖ Βιοαισθητήρες: Τα AgNPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοαισθητήρες για την ανίχνευση γλυκόζης στο αίμα, ενζύμων, μοριακών δεικτών καρκινικών κυττάρων, παθογόνων κ.λπ. Για παράδειγμα, νανოსύνθετα που περιέχουν άργυρο χρησιμοποιούνται ως βιοαισθητήρες ακετυλοχολινεστεράσης για ηλεκτροχημική ανίχνευση οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων.
- ❖ Βιοαπεικόνιση: Τα νανοσυμπλέγματα αργύρου έχουν μοναδικές οπτικές και ηλεκτρικές ιδιότητες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υλικά για συνθετικούς ανιχνευτές. Καθώς οι πρωτεΐνες έχουν πολλαπλές χηλικές και λειτουργικές ομάδες, έχουν μοναδικά πλεονεκτήματα ως συνδέτες στη βιολογική απεικόνιση.
- ❖ Συστήματα μεταφοράς φαρμάκων: Μεγάλο είναι το ενδιαφέρον για τη σύνθεση συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων με βάση τα AgNPs, λόγω των εγγενών χαρακτηριστικών των AgNPs, της ικανότητάς τους να δεσμεύουν ένα ευρύ φάσμα οργανικών μορίων, της ισχυρής απορρόφησής τους και της χαμηλής τοξικότητάς τους.
- ❖ Επούλωση τραυμάτων: Τα AgNPs ή τα ιόντα αργύρου που χρησιμοποιούνται σε απορροφητικούς επιδέσμους τραυμάτων μπορούν να αλληλεπιδράσουν και να καταστρέψουν τα βακτήρια.



Εικόνα 1.11. Οι εφαρμογές των AgNPs στη βιοϊατρική

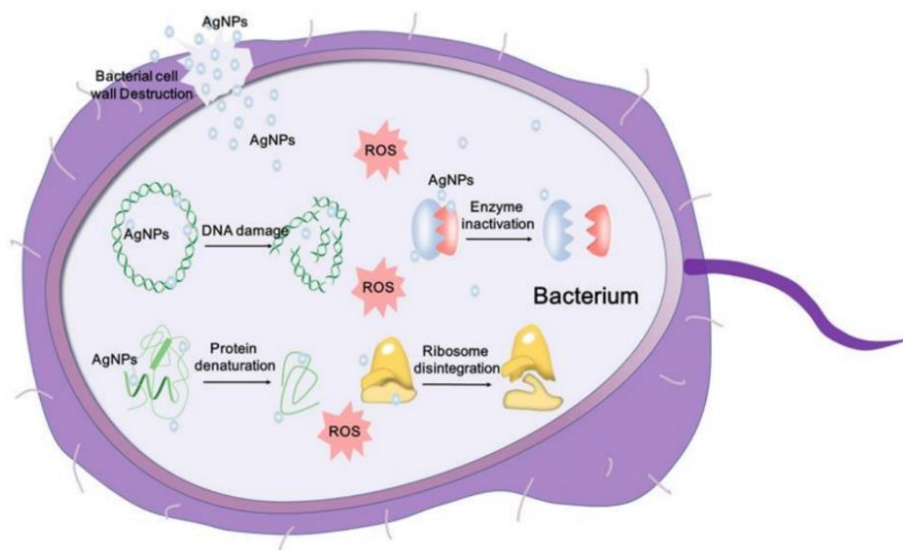
- ❖ **Επούλωση οστών:** Τα οστά είναι ένας ενεργός ιστός με αναγεννητικές ικανότητες που κατά την επούλωσή του υπάρχει κίνδυνος βακτηριακής μόλυνσης. Τα AgNPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιβακτηριακοί παράγοντες στα συνθετικά οστικά ικρίσματα και να προάγουν την επούλωση κατάγματος ως οστεοαγωγίμο βιοϋλικό. Τα ικρίσματα κρυσταλλωμένου υδροξυαπατίτη (HA) ή τιτανίου που εμφυτεύονται με AgNPs εμφανίζουν ισχυρή αντιβακτηριακή ικανότητα έναντι τόσο των θετικών κατά Gram όσο και των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.
- ❖ **Οδοντιατρική:** Ο σχηματισμός βιοφίλμ της πλάκας είναι μία από τις αιτίες των οδοντικών ασθενειών. Τα AgNPs έχουν ενσωματωθεί σε ορισμένα οδοντικά βιοϋλικά για τη μείωση του σχηματισμού βιοφίλμ λόγω της αντιβακτηριακής δράσης τους.
- ❖ **Ανοσοενισχυτικά:** Τα ανοσοενισχυτικά μπορούν ταυτόχρονα να μειώσουν την ποσότητα του αντιγόνου που απαιτείται, να συντομεύσουν το χρόνο που απαιτείται για ένα προστατευτικό όριο παραγωγής αντισωμάτων και να βελτιώσουν την ένταση των προκαλούμενων αποκρίσεων, να διεγείρουν αποκρίσεις μακροπρόθεσμης μνήμης για να μειώσουν την απαίτηση επαναλαμβανόμενων εμβολιασμών. Αξιοσημείωτη είναι η ανοσολογική επικουρική δράση των AgNPs τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε μοντέλα αντιγόνων ωλοευκωματίνης.
- ❖ **Καθετήρες:** Η χρήση των AgNPs σε καθετήρες, που θεωρούνται συσκευές υψηλού κινδύνου για μικροβιακή μόλυνση, προσφέρει τη δυνατότητα για παρατεταμένη απελευθέρωση βακτηριοκτόνου αργύρου δρώντας προληπτικά.

1.6.3. Αντιβακτηριακή δράση

Η αντιβακτηριακή δράση των AgNPs είναι διαφορετική για τα διάφορα στελέχη βακτηρίων. Τα AgNPs παρουσιάζουν ισχυρότερη επίδραση έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων συγκριτικά με τα Gram-θετικά, το οποίο μπορεί να οφείλεται στο διαφορετικό πάχος του κυτταρικού τοιχώματος μεταξύ των δύο ειδών βακτηρίων. Επιπλέον, το μέγεθος, το σχήμα, η συγκέντρωση, ο χρόνος και το επιφανειακό φορτίο των AgNPs επηρεάζουν την αντιβακτηριακή δράση τους. Γενικά, καθώς το μέγεθός τους μειώνεται, η αντιβακτηριακή δράση τους αυξάνεται σημαντικά, ειδικά όταν το μέγεθος είναι μικρότερο από 10 nm. Η αντιβακτηριακή δράση μπορεί να ενισχυθεί σημαντικά με την παράταση του χρόνου θεραπείας. Η αυξημένη βακτηριακή θνησιμότητα μπορεί να αποδοθεί στη συσσώρευση AgNPs και ιόντων αργύρου κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης. Όσον αφορά το σχήμα, συγκρίνοντας την αντιβακτηριακή δράση σφαιρικών, τριγωνικών, γραμμικών και κυβικών AgNPs, παρατηρείται ότι τα σφαιρικού σχήματος AgNPs παρουσιάζουν καλύτερη δράση. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι τα AgNPs με μεγαλύτερη αναλογία επιφάνειας προς όγκο, η οποία σχετίζεται τόσο με την υψηλότερη αποτελεσματική επαφή όσο και με τη μεγαλύτερη επιφάνεια αντίδρασης, μπορεί να εμφανίζουν ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση. Το επιφανειακό φορτίο των AgNPs είναι ένας ακόμα παράγοντας που μπορεί να επηρεάζει την αντιβακτηριακή δράση τους. Λόγω της παρουσίας λιποπολυσακχαρίτη, πεπτιδογλυκάνης και πολλαπλών ομάδων, όπως καρβοξυλικών, αμινο- και φωσφορικών ομάδων, οι βακτηριακές μεμβράνες είναι κατά κύριο λόγο φορτισμένες με αρνητικά φορτία. Το θετικό φορτίο μπορεί να διευκολύνει την προσκόλληση των AgNPs στις βακτηριακές μεμβράνες μέσω ηλεκτροστατικής έλξης. Επομένως, η προσαρμογή των επιφανειακών φορτίων των AgNPs μπορεί να συμβάλει στην ενισχυμένη αντιβακτηριακή δράση. Το επιθυμητό μέγεθος, η διασπορά και το επιφανειακό φορτίο των AgNPs μπορεί να επιτευχθεί με την παρουσία σταθεροποιητών που προσκολλώνται στην επιφάνεια των AgNPs [4].

Αν και τα AgNPs παρουσιάζουν καλή αντιβακτηριακή δράση, οι μηχανισμοί δράσης τους δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Πολλές υποθέσεις έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τους αντιβακτηριακούς μηχανισμούς (Εικόνα 1.12). Αρχικά, για να δράσουν έρχονται σε επαφή με τα βακτηριακά κύτταρα, προσκολλώνται στην επιφάνειά τους μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων και διεισδύουν στο εσωτερικό τους. Τα AgNPs απελευθερώνουν συνεχώς Ag^+ , τα οποία έχουν συγγένεια με τις θειώδεις πρωτεΐνες. Επομένως, μπορούν να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες που περιέχουν θείο και βρίσκονται στη βακτηριακή μεμβράνη πυροδοτώντας την καταστροφή της. Αλλαγές στη διαπερατότητα της βακτηριακής μεμβράνης ενδεχομένως να προκαλούν διαρροή του κυτταρικού περιεχομένου. Όταν τα AgNPs εισέρχονται στο βακτηριακό κύτταρο μπορούν να επηρεάσουν κρίσιμες ενδοκυτταρικές δραστηριότητες. Με τη δημιουργία δραστικών ειδών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και ελεύθερων ριζών προκαλούν οξειδωτικό στρες και προσβάλλουν την αναπνευστική αλυσίδα. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση

με ενώσεις που περιέχουν θείο και φώσφορο, όπως το DNA, μπορεί να παρεμποδίσει την αντιγραφή του DNA, να αναστείλει την κυτταρική διαίρεση και να καταστρέψει τη δομή του DNA. Παράλληλα, τα AgNPs μπορεί να αλληλεπιδράσουν με ένζυμα αναστέλλοντας τη δράση τους και με πρωτεΐνες προκαλώντας μετουσίωση και απενεργοποιώντας τις. Μάλιστα, μπορεί να ανασταλεί τη σύνθεση των πρωτεϊνών μέσω μετουσίωσης των ριβοσωμάτων στο κυτταρόπλασμα [4], [44], [45].



Εικόνα 1.12. Μηχανισμοί αντιβακτηριακής δράσης των AgNPs [4]

1.6.4. Τοξικότητα

Αν και η χρήση των νανοσωματιδίων αυξάνεται εκθετικά, οι πιθανές τοξικολογικές και επικίνδυνες επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον δεν μπορούν να αγνοηθούν. Είναι πιθανό να απελευθερωθούν στο περιβάλλον κατά τα στάδια παραγωγής, χρήσης, ανακύκλωσης ή απόρριψης και να παραμένουν στον αέρα, το έδαφος, το νερό ή τα βιολογικά συστήματα. Για παράδειγμα, τα AgNPs μπορούν να εισέλθουν στα κύτταρα των φυτών και να προκαλέσουν επιβλαβείς επιπτώσεις, ενώ στο υδατικό περιβάλλον γίνονται πηγή ιόντων αργύρου (Ag^+) με τοξικές επιδράσεις σε υδρόβιους οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των φυκιών και των ψαριών [3], [46]. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη τη χρήση τους σε διάφορα προϊόντα, όπως επίδεσμοι, κρέμες, διαλύτες και ικρίσματα, κρίνεται απαραίτητο να αξιολογηθεί η πιθανή τοξικότητάς τους σε κύτταρα, ιστούς και όργανα. Σε γενικές γραμμές, οι πρωτογενείς οδοί έκθεσης περιλαμβάνουν την επαφή με το δέρμα, την εισπνοή, την κατάποση και την υποδόρια ή ενδοφλέβια ένεση. Τα απορροφούμενα AgNPs μπορούν να μεταφερθούν σε διαφορετικά συστήματα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, όπως το δέρμα, το αναπνευστικό, το κυκλοφορικό, το ηπατοχοληφόρο, το πεπτικό, το ουροποιητικό, το νευρικό, το ανοσοποιητικό και το αναπαραγωγικό σύστημα, και κυρίως σε όργανα, όπως στον σπλήνα, το ήπαρ, τους

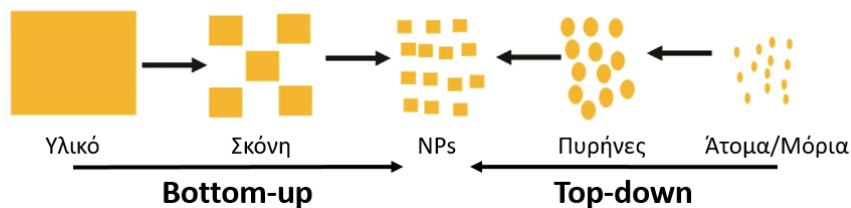
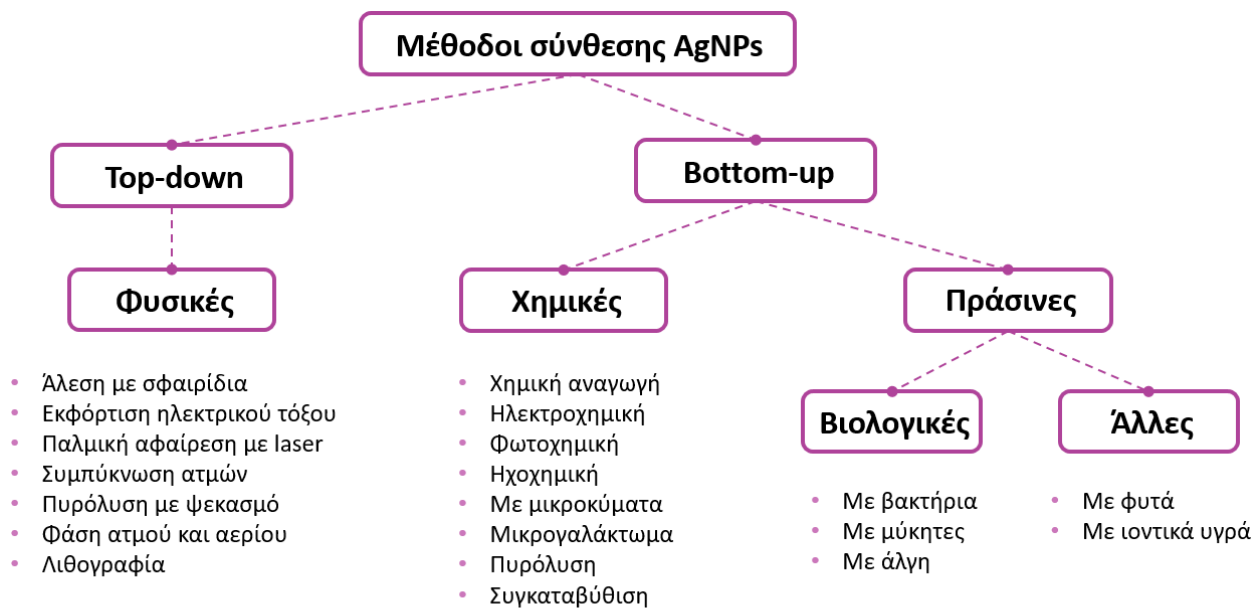
νεφρούς και τους πνεύμονες, ενώ μικρή εναπόθεση παρατηρείται σε δόντια και οστά. Μπορεί να είναι δυνητικά τοξικά για αυτούς τους ιστούς ή τα όργανα προκαλώντας κυτταρική νέκρωση, απόπτωση ή γενετικές μεταλλάξεις. Για παράδειγμα, τα AgNPs που εναποτίθενται στους πνεύμονες μπορεί να προκαλέσουν πνευμονία και άσθμα. Τα μικρού μεγέθους AgNPs είναι εύκολο να διεισδύσουν στο σώμα και να διασχίσουν βιολογικούς φραγμούς, όπως ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός και ο φραγμός αίματος-όρχεων, προκαλώντας στη συνέχεια πιθανή κυτταροτοξικότητα. Η μη ειδική κατανομή τους μπορεί να προκαλέσει κυτταροτοξικότητα όπως δερματική, οφθαλμική, αναπνευστική, ηπατοχολική, νευρική και αναπαραγωγική τοξικότητα. Η πιθανή κυτταροτοξικότητα εξαρτάται από τις οδούς χορήγησης, τη δόση, τη συγκέντρωση, τον χρόνο έκθεσης και τις ιδιότητες ή τα χαρακτηριστικά των AgNPs, όπως το μέγεθος και το σχήμα τους. Ωστόσο, εξακολουθεί να υπάρχει ανεπαρκής γνώση της πιθανής κυτταροτοξικότητας, των μακροπρόθεσμων δυσμενών επιπτώσεων στην υγεία και των ειδικών μηχανισμών των AgNPs που συσσωρεύονται στους διαφορετικούς ιστούς και όργανα. Προκειμένου να αναπτυχθούν AgNPs με καλύτερη βιοσυμβατότητα για ιατρικές εφαρμογές, είναι σημαντικό να μελετηθεί συστηματικά η πιθανή κυτταροτοξικότητά τους. Η διερεύνηση της φαρμακοδυναμικής τους in vivo μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη βιοασφαλών νανοσωματιδίων [4].

1.7. Μέθοδοι σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου

Τα AgNPs είναι δυνατόν να συντεθούν με μια πληθώρα μεθόδων, οι οποίες διακρίνονται σε δύο προσεγγίσεις: την Top-down (από πάνω προς τα κάτω) και την Bottom-up (από κάτω προς τα πάνω) (Εικόνα 1.13). Η προσέγγιση Top-down αναφέρεται στον σχηματισμό μεταλλικών νανοσωματιδίων από χύδην υλικά μέσω μείωσης του μεγέθους τους χρησιμοποιώντας φυσικές δυνάμεις για τη σύνθεσή τους, όπως μηχανική, ηλεκτρική, φωτεινή και θερμική ενέργεια. Η προσέγγιση Bottom-up περιλαμβάνει τη δημιουργία πολύπλοκων συστάδων για τη σύνθεση νανοσωματιδίων από άτομα και μόρια χρησιμοποιώντας διαδικασίες πυρήνωσης και ανάπτυξης. Οι προσεγγίσεις Bottom-up περιλαμβάνουν κυρίως τη χημική σύνθεση και τη βιολογική σύνθεση, που πραγματοποιούνται με την αναγωγή ενός πρόδρομου άλατος και συχνά με τη χρήση σταθεροποιητικών παραγόντων. Το κύριο πλεονέκτημα της προσέγγισης Top-down είναι ότι τα νανοσωματίδια συντίθενται σε μεγάλη ποσότητα σε σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ στη προσέγγιση Bottom-up μπορούν να συντεθούν ομοιογενή νανοσωματίδια με μέγεθος, σχήμα και σύνθεση μονοδιασποράς [4], [6], [47].

1.7.1. Φυσικές μέθοδοι

Στη προσέγγιση Top-down περιλαμβάνονται κυρίως οι φυσικές μέθοδοι σύνθεσης νανοσωματιδίων (Εικόνα 1.13). Για τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων χρησιμοποιείται μηχανική ενέργεια, όπως στη μέθοδο άλεσης με σφαιρίδια (ball milling method), ηλεκτρική ενέργεια, όπως στη μέθοδο εκφόρτισης ηλεκτρικού τόξου (electrical arc-discharge method), φωτεινή ενέργεια, όπως στη μέθοδο



Εικόνα 1.13. Μέθοδοι σύνθεσης AgNPs

παλμικής αφαίρεσης με λέιζερ (pulsed laser ablation method) και θερμική ενέργεια, όπως στη μέθοδο συμπύκνωσης ατμών (vapor condensation method) [4]. Αυτές είναι από τις συνηθέστερες φυσικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται. Πιο αναλυτικά:

- ❖ Μέθοδος άλεσης με σφαίρες: Άκαμπτες σφαίρες, όπως κεραμικά και ανοξείδωτοι χάλυβες, τοποθετούνται σε ένα δοχείο που περιστρέφεται με υψηλή ταχύτητα μαζί με το μεταλλικό υλικό (άργυρος) με συγκεκριμένη αναλογία μάζας καθώς και με αέριο (αέρας ή αδρανές αέριο). Από τις συγκρούσεις υψηλής ταχύτητας παράγονται τοπικές υψηλές πιέσεις, οι οποίες αλέθουν το μέταλλο σε πολύ λεπτές σκόνες. Ο χρόνος άλεσης, η ταχύτητα περιστροφής, το ατμοσφαιρικό μέσο και η θερμοκρασία αποτελούν μερικούς από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των AgNPs [4], [10].
- ❖ Μέθοδος εκφόρτισης ηλεκτρικού τόξου: Η συσκευή που χρησιμοποιείται σε αυτή τη μέθοδο αποτελείται από δύο ηλεκτρόδια αργύρου βυθισμένα σε ένα διηλεκτρικό υγρό, όπως σε κάποιο υγρό αδρανές αέριο ή απιονισμένο νερό. Τα ηλεκτρόδια είναι συνδεδεμένα με ηλεκτρική πηγή συνεχούς ρεύματος. Το ηλεκτρόδιο αργύρου χαράσσεται στο διηλεκτρικό μέσο και η επιφάνειά του εξατμίζεται λόγω της υψηλής θερμοκρασίας κοντά στο ηλεκτρόδιο. Ο ατμός αργύρου

συμπυκνώνεται σε AgNPs και αιωρείται στο διηλεκτρικό υγρό. Με αυτή τη μέθοδο λαμβάνονται AgNPs υψηλής καθαρότητας [4], [6].

- ❖ Μέθοδος παλμικής αφαίρεσης με λέιζερ: Ένα μέταλλο στόχος (άργυρος) βυθισμένο σε νερό ή σε οργανικό διαλύτη θερμαίνεται στιγμιαία από παλμικό λέιζερ και σχηματίζεται νέφος πλάσματος. Ακολουθεί πυρήνωση και ανάπτυξη μεταλλικών σωματιδίων κατά την ψύξη του πλάσματος και τελικά σχηματίζονται συστάδες νανοκλίμακας. Παράγοντες όπως η διάρκεια των παλμών, το μήκος κύματος του λέιζερ και ο τύπος του διαλύτη επηρεάζουν το μέγεθος των AgNPs [4], [6].
- ❖ Μέθοδος συμπύκνωσης ατμών: Η εξάτμιση και η συμπύκνωση είναι δύο διαφορετικά στάδια που εμπλέκονται σε αυτή τη μέθοδο. Το μέταλλο πηγή (άργυρος) τοποθετείται σε φούρνο σωλήνων. Υπό ατμοσφαιρική πίεση και υψηλές θερμοκρασίες εξατμίζεται και στη συνέχεια οι ατμοί συμπυκνώνονται προς σχηματισμό των νανοσωματιδίων. Ωστόσο, υπάρχουν μειονεκτήματα, όπως η υψηλή κατανάλωση ενέργειας και η απαίτηση αρκετού χρόνου για τη προθέρμανση του περιβάλλοντος σε όλο το αρχικό υλικό και την επίτευξη θερμικής σταθερότητας [6], [47].

Με τις φυσικές μεθόδους επιτυγχάνεται σύνθεση νανοσωματιδίων υψηλής καθαρότητας, ομοιόμορφης κατανομής μεγέθους και σε μεγάλη κλίμακα. Επιπλέον, δεν χρησιμοποιούνται χημικά που μπορεί να είναι τοξικά προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον ή να χρειάζεται να απομακρυνθούν από την επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Ωστόσο, υπάρχει τάση για συσσωμάτωση λόγω απουσίας σταθεροποιητών ή παραγόντων κάλυψης. Για την αντιμετώπιση αυτού του φαινομένου μπορεί να χρησιμοποιηθούν ορισμένοι σταθεροποιητές, όπως για παράδειγμα η πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP) στη μέθοδο παλμικής αφαίρεσης με λέιζερ λειτουργώντας τόσο ως ηλεκτρολύτης όσο και ως σταθεροποιητής. Ακόμη, βασικά μειονεκτήματα των φυσικών μεθόδων είναι η υψηλή κατανάλωση ενέργειας και ο πολύπλοκος εξοπλισμός [4], [6].

1.7.2. Χημικές μέθοδοι

Η χημική σύνθεση ανήκει στην προσέγγιση Bottom-up και σήμερα είναι η πιο κοινή μέθοδος σύνθεσης AgNPs (Εικόνα 1.13). Περιλαμβάνει την αναγωγή των ιόντων Ag^+ από ένα πρόδρομο άλας αργύρου σε στοιχειακό άργυρο (AgNPs) μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων υπό ορισμένες συνθήκες. Γενικά, η χημική σύνθεση μπορεί να προωθηθεί με αναγωγικούς παράγοντες, όπως το βοροϋδρίδιο του νατρίου ($NaBH_4$) και το κιτρικό νάτριο. Ωστόσο, μπορεί να συνδυαστεί με εξωτερικές πηγές ενέργειας όπως φωτοχημικές, ηλεκτροχημικές, υποβοηθούμενες από μικροκύματα και ηχοχημικές μεθόδους. Η διαδικασία σύνθεσης μπορεί να χωριστεί σε δύο μέρη: την πυρήνωση και την ανάπτυξη. Η συγκέντρωση του μονομερούς στο διάλυμα αυξάνεται γρήγορα πάνω από το κρίσιμο επίπεδο υπερκορεσμού και πυροδοτεί την πυρήνωση και την καθίζησή του. Η καθίζηση του μονομερούς σχηματίζει τον πυρήνα και η επαναλαμβανόμενη

διαδικασία πυρήνωσης προωθεί τη συνεχή δημιουργία νέων πυρήνων. Καθώς σχηματίζεται ο πυρήνας, η συγκέντρωση του μονομερούς πέφτει κάτω από το κρίσιμο επίπεδο υπερκορεσμού. Μετά την πυρήνωση, η αυξημένη προσθήκη μονομερούς προκαλεί την ανάπτυξη πυρήνων σχηματίζοντας νανοσωματίδια μεγαλύτερου μέγεθους. Κατά τη διαδικασία σύνθεσης, χρησιμοποιούνται συνήθως σταθεροποιητές [4], [10]. Οι συνηθέστερες χημικές μέθοδοι είναι:

- ❖ Χημική αναγωγή: Αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Η σύνθεση πραγματοποιείται σε οργανικά ή υδατικά διαλύματα και περιλαμβάνει τρία συστατικά: μία πρόδρομη ένωση, έναν αναγωγικό παράγοντα και έναν σταθεροποιητικό παράγοντα ή «περίβλημα» (carrying agent). Τα κατιόντα αργύρου Ag^+ από τις πρόδρομες ενώσεις αργύρου, όπως ο νιτρικός άργυρος, η αμμωνία αργύρου (αντιδραστήριο Tollens), ο θειικός άργυρος και ο χλωρικός άργυρος, μπορούν να αναχθούν αποτελεσματικά προς σχηματισμό ελεύθερων μεταλλικών ατόμων αργύρου (Ag^0). Οι αναγωγικοί παράγοντες που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι το $NaBH_4$, η υδραζίνη, το στοιχειακό υδρογόνο, το N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), το κιτρικό νάτριο, το ασκορβικό οξύ και η αιθυλενογλυκόλη και μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη των πυρήνων. Οι τύποι και η αναλογία των πρόδρομων ενώσεων και των αναγωγικών παραγόντων, καθώς και η θερμοκρασία και το pH του διαλύματος, μπορεί να επηρεάσουν τα χαρακτηριστικά των AgNPs. Για την αποφυγή συσσωμάτωσης χρησιμοποιούνται carrying παράγοντες, όπως η πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP), το βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο (CTAB) και η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Με αυτή τη μέθοδο μπορεί να συντεθεί μια σημαντική ποσότητα νανοσωματιδίων σε σύντομο χρονικό διάστημα αλλά τα χημικά που χρησιμοποιούνται είναι τοξικά και παράγονται μη φιλικά προς το περιβάλλον παραπροϊόντα [4], [6], [47].
- ❖ Ηλεκτροχημική μέθοδος: Με την επιβολή δυναμικού στον ηλεκτρολύτη τα κατιόντα αργύρου Ag^+ ανάγονται προς σχηματισμό ελεύθερων μεταλλικών ατόμων αργύρου (Ag^0). Η πυρήνωση και η ανάπτυξη των AgNPs συμβαίνουν σχεδόν ταυτόχρονα υπό την επίδραση του εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Η πυκνότητα ρεύματος, οι τύποι ηλεκτροδίων, οι ηλεκτρολύτες και οι διαλύτες επηρεάζουν το μέγεθος των AgNPs. Η αυξημένη συγκέντρωση πρόδρομης ένωσης, η ενισχυμένη ένταση ρεύματος και ο παρατεταμένος χρόνος συμβάλλουν στη σύνθεση AgNPs με μικρότερο μέγεθος. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σταθεροποιητικοί και carrying παράγοντες. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ο εύκολος έλεγχος της αντίδρασης, οι ήπιες συνθήκες και η λιγότερη περιβαλλοντική ρύπανση [4], [10].
- ❖ Μέθοδος μικρογαλακτώματος: Η πρόδρομη ένωση αργύρου και ο αναγωγικός παράγοντας διασπείρονται και αναμιγνύονται παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών σε δύο διαφορετικά γαλακτώματα (νερό-σε-έλαιο ή έλαιο-σε-νερό) σχηματίζοντας μικύλλια. Η κίνηση Brown των μικυλλίων είναι υπεύθυνη για τις διαμικυλλιακές συγκρούσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την ανάμειξη των αντιδρώντων που ακολουθείται από πυρήνωση για τη σύνθεση των AgNPs. Οι

επιφανειοδραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι κατιονικά τασιενεργά, όπως το CTAB και η PVP, ανιονικά τασιενεργά και μη ιονικά τασιενεργά, όπως το Triton X-100. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η εύκολη σύνθεση θερμοδυναμικά σταθερών νανοσωματιδίων παρόμοιου μεγέθους [6], [10].

- ❖ Μέθοδος υποβοηθούμενη από μικροκύματα: Η πρόδρομη ένωση αργύρου βρίσκεται σε ένα υδατικό ή οργανικό διάλυμα παρουσία σταθεροποιητή. Η ταχεία θέρμανση της πρόδρομης ένωσης με ακτινοβολία μικροκυμάτων προάγει τη δημιουργία πυρήνων στη θέση. Η συγκέντρωση της πρόδρομης ένωσης, ο τύπος σταθεροποιητή, η ισχύς εισόδου, ο χρόνος ακτινοβολίας των μικροκυμάτων, η διηλεκτρική σταθερά και ο δείκτης διάθλασης του μέσου είναι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τη σύνθεση, το σχήμα και το μέγεθος των AgNPs. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η υψηλή απόδοση μετατροπής ενέργειας, η εξοικονόμηση χρόνου, η ευκολία της και η δυνατότητα μεγάλης κλίμακας σύνθεσης AgNPs υψηλής διασποράς [4], [10].
- ❖ Φωτοχημική μέθοδος: Υπό την επίδραση φωτός παράγονται ελεύθερες ρίζες που μπορούν να ανάγουν τα κατιόντα αργύρου Ag^+ σε Ag^0 . Οι πηγές φωτός που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το υπεριώδες φως, το ηλιακό φως και το φως λέιζερ. Η πηγή, η ένταση και το μήκος κύματος του φωτός και ο χρόνος ακτινοβολίας μπορεί να επηρεάσουν τη σύνθεση των AgNPs. Έχει το μοναδικό πλεονέκτημα της σύνθεσης AgNPs υψηλής διασποράς επί τόπου, δηλαδή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση AgNPs στην επιφάνεια διάφορων μέσων, όπως πολυμερικές μεμβράνες, γυαλί και κύτταρα που φωτίζονται. Η σύνθεση τερματίζεται με διακοπή του φωτισμού [4], [10], [26].
- ❖ Ηχοχημική μέθοδος: Σχετίζεται με το φαινόμενο της σπηλαίωσης που προκαλείται από την υπερηχητική ακτινοβολία, η οποία δημιουργεί ένα τοπικό hot spot και προάγει τη σύνθεση των AgNPs. Το διάλυμα αναμιγνύεται ομοιόμορφα και η στιγμιαία υψηλή πίεση μπορεί να δημιουργήσει φυσαλίδες, οι οποίες μπορεί να καταρρεύσουν ξαφνικά όταν μεγαλώσουν. Η αδιαβατική συμπίεση της αέριας φάσης στη φυσαλίδα δημιουργεί ένα τοπικό hot spot, το οποίο επιταχύνει την επαφή του ιόντος Ag^+ με τον αναγωγικό παράγοντα και να το ανάγει γρήγορα σε AgNPs. Οι υπέρηχοι εμποδίζουν τη συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων στο υδατικό διάλυμα. Είναι μια απλή και οικονομική μέθοδος για τη σύνθεση AgNPs [4].

Οι χημικές μέθοδοι είναι οι πιο συνηθισμένες για τη σύνθεση AgNPs λόγω ευκολίας, εξοικονόμησης χρόνου, υψηλής απόδοσης, ομοιογένειας των AgNPs και δυνατότητας ελέγχου της σύνθεσης και των χαρακτηριστικών των AgNPs. Ωστόσο, η χρήση αντιδραστηρίων που είναι τοξικά προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον, η δυσκολία απομάκρυνσής τους από την επιφάνεια των νανοσωματιδίων και η απαίτηση για προσεκτική απόρριψή τους είναι βασικά μειονεκτήματα. Επιπλέον, καθιστά απαγορευτική τη χρήση των AgNPs σε βιοϊατρικές εφαρμογές [4], [6], [47].

1.7.3. Πράσινες μέθοδοι

Οι φυσικές και χημικές μέθοδοι σύνθεσης είναι ενεργοβόρες και δαπανηρές, ενώ η χρήση τοξικών και μη φιλικών προς το περιβάλλον χημικών ουσιών αποτελεί το βασικότερο μειονέκτημά τους. Για την υπέρβαση των προβλημάτων των συμβατικών μεθόδων, τα τελευταία χρόνια υπάρχει μία στροφή προς την πράσινη σύνθεση και την αναζήτηση εναλλακτικών, φιλικών προς το περιβάλλον, οικονομικά αποδοτικών και μη τοξικών μεθόδων. Πολλές μελέτες πραγματοποιούνται προς διάφορες κατευθύνσεις με τις πράσινες μεθόδους να κατηγοριοποιούνται σε (α) βιολογικές με τη χρήση μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες και φύκη (β) μεθόδους που χρησιμοποιούν φυτά και εκχυλίσματα φυτών και (γ) άλλες μεθόδους που χρησιμοποιούν πράσινους διαλύτες, όπως τα ιοντικά υγρά. Στις δύο πρώτες περιπτώσεις η σύνθεση των AgNPs επιτυγχάνεται με τα βιομόρια των μικροοργανισμών και των φυτών που δρουν ως αναγωγικοί και σταθεροποιητικοί παράγοντες. Επιπλέον, δημιουργούν ένα προστατευτικό περίβλημα γύρω από τα νανοσωματίδια (capping). Επομένως, τα συστατικά στην επιφάνεια των AgNPs πρέπει να λαμβάνονται επαρκώς υπόψη στις εφαρμογές των AgNPs, καθώς μπορεί να επηρεάζουν τις φυσικοχημικές και βιολογικές τους ιδιότητες. Πέρα από τον τύπο του μικροοργανισμού ή του φυτού, τις κληρονομικές και γενετικές ιδιότητές τους και τις βέλτιστες συνθήκες κυτταρικής τους ανάπτυξης, η σύνθεση και τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων μπορούν να επηρεαστούν και από παράγοντες, όπως η συγκέντρωση της πρόδρομης ένωσης, η παρουσία φωτός, η θερμοκρασία, το pH, η ταχύτητα ανάδευσης και ο χρόνος σύνθεσης [10], [26], [47].

• Φυτά

Η φυτική σύνθεση είναι μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση και έχει λάβει μεγάλη προσοχή τα τελευταία χρόνια. Έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά εκχυλίσματα από διαφορετικά μέρη των φυτών, όπως του φλοιού, των φύλλων, του άνθους, των καρπών, των σπόρων και των ριζών. Τα εκχυλίσματα περιέχουν βιομόρια όπως ένζυμα, αλκοόλες, φλαβονοειδή, αλκαλοειδή, κινίνες, έλαια, τερπενοειδή και φαινολικές ενώσεις. Σε αυτά τα οργανικά μόρια υπάρχουν διαφορετικές λειτουργικές ομάδες, όπως το υδροξύλιο, το καρβονύλιο και οι φαινυλομάδες, που μπορεί να συμβάλλουν στην αναγωγή του Ag^+ σε Ag^0 . Επιπλέον, μπορεί να δρουν και ως σταθεροποιητικοί παράγοντες, δημιουργώντας ένα capping γύρω από τα νανοσωματίδια. Ωστόσο, απαιτείται περισσότερη μελέτη των μορίων που συμμετέχουν στη σύνθεση και του μηχανισμού δράσης τους διότι δεν είναι πλήρως γνωστός. Το είδος του εκχυλίσματος επιδρά με διαφορετικό τρόπο στη σύνθεση των νανοσωματιδίων, οπότε το μέγεθος και το σχήμα τους μπορεί να διαφέρει. Αυτές οι διαφοροποιήσεις οφείλονται τόσο στη διαφορετική συγκέντρωση αλλά και στο είδος των οργανικών μορίων που μπορεί να περιέχει το κάθε εκχύλισμα. Επιπλέον, η σύνθεση επηρεάζεται και από εξωτερικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και το pH. Η μέθοδος αυτή είναι οικονομική, απλή, φιλική προς το περιβάλλον, μη τοξική, βιοσυμβατή και τα AgNPs που παράγονται είναι κατάλληλα για

βιοϊατρικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές. Εκχυλίσματα που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι από φύλλα αλόης *Aloe vera*, φύλλα παπάγιας *Carica papaya* και φύλλα ελιάς [4], [26], [48].

- Ιοντικά υγρά

Τα ιοντικά υγρά αποτελούνται κατά κύριο λόγο από οργανικά κατιόντα και οργανικά ή ανόργανα ανιόντα, τα οποία συντελούν στη μείωση της ενέργειας πλέγματος και κατά συνέπεια στην επίτευξη υγρής κατάστασης ακόμα και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Πρόκειται για μία γενιά προηγμένων υλικών που τείνουν να ακολουθούν τις επιταγές της πράσινης χημείας. Η χρήση των ιοντικών υγρών στη σύνθεση των AgNPs έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, διότι διαθέτουν ιδιότητες που δεν διαθέτουν οι συμβατικοί οργανικοί διαλύτες, όπως ικανότητα να διαλύσουν ποικιλία πρόδρομων ενώσεων αργύρου. Στη σύνθεση των AgNPs τα ιοντικά υγρά διαθέτουν διττό χαρακτήρα, τόσο αναγωγικό όσο και σταθεροποιητικό. Επιπλέον, τα κατιόντα και τα ανιόντα μπορούν να σχηματίσουν ένα ηλεκτροστατικό *carriing* γύρω από τα νανοσωματίδια που εμποδίζει τη συσσωμάτωσή τους και τα σταθεροποιεί. Ακόμη, με την κατάλληλη επιλογή των ιόντων τα AgNPs μπορούν να αποκτήσουν επιθυμητές ιδιότητες, όπως υδρόφιλα ή υδρόφοβα, με σκοπό μία συγκεκριμένη εφαρμογή [49], [50].

1.7.4. Βιολογικές μέθοδοι

Οι βιολογικές μέθοδοι ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των πράσινων μεθόδων και για τη σύνθεση των AgNPs χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί, όπως βακτήρια, μύκητες και άλγη, που παράγουν πληθώρα βιομορίων που δρουν ως αναγωγικοί και σταθεροποιητικοί παράγοντες. Η βέλτιστη ανάπτυξη των μικροοργανισμών πρέπει να διατηρηθεί για την καλύτερη σύνθεση των νανοσωματιδίων. Ως πράσινη σύνθεση διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα. Ωστόσο, η κύρια πρόκληση στη σύνθεση με τη χρήση βιολογικών παραγόντων είναι η μονοδιασπορά των νανοσωματιδίων [10].

- Σύνθεση με βακτήρια

Πολλά βακτήρια, τόσο Gram-αρνητικά όσο και Gram-θετικά, έχουν μελετηθεί για τη σύνθεση AgNPs. Η σύνθεση των AgNPs μπορεί να πραγματοποιηθεί ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά χρησιμοποιώντας βιομάζα, υπερκείμενο υγρό, εκχυλίσματα χωρίς κύτταρα και παράγωγα συστατικά των βακτηρίων. Μεταξύ αυτών των δύο τρόπων, η εξωκυτταρική μέθοδος πλεονεκτεί έναντι της ενδοκυτταρικής μεθόδου λόγω της ευκολίας ανάκτησης των AgNPs. Στην ενδοκυτταρική μέθοδο χαμηλή συγκέντρωση Ag^+ μπορεί να προάγει τη σύνθεση AgNPs, ενώ υψηλότερη συγκέντρωση μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο. Η δυνατότητα και ο μηχανισμός σύνθεσης AgNPs των στελεχών διαφέρουν μεταξύ τους λόγω διαφορετικής συγκέντρωσης και διαφορετικού είδους βιομορίων που μπορεί να παράγει το κάθε στέλεχος. Διάφορα βιομόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αναγωγικοί παράγοντες, όπως

πεπτίδια, ένζυμα, αναγωγάση, εξωπολυσακχαρίτες, συμπαράγοντες, κυτοχρώματα τύπου c και γονίδια ανθεκτικά στον άργυρο. Επιπλέον, μπορεί να προσκολληθούν στην επιφάνεια των πυρήνων των AgNPs δημιουργώντας carrying για την αποφυγή συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων. Η σύνθεση επηρεάζεται και από εξωτερικούς παράγοντες, όπως η συγκέντρωση της πρόδρομης ένωσης και το pH. Η νιτρική αναγωγάση, ένα ένζυμο που εξαρτάται από το *NADH*, έχει κερδίσει περισσότερη προσοχή, διότι μπορεί να συμμετέχει στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και στη συνέχεια να δημιουργεί ένα μικροσκοπικό αναγωγικό περιβάλλον μεταφέροντας άτομα υδρογόνου. Το ένζυμο αυτό λαμβάνει ηλεκτρόνιο από το *NADH*, το οξειδώνει σε *NAD⁺* και υφίσταται οξείδωση για να ανάγει τα *Ag⁺* σε *Ag⁰*. Οι μηχανισμοί της μεθόδου δεν είναι πλήρως γνωστοί και επομένως πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω. Ακόμη, με τη χρήση τεχνικών γενετικής μηχανικής η σύνθεση μπορεί να βελτιωθεί εύκολα και στοχευμένα για τη μείωση της επιβλαβούς επίδρασης και την επίτευξη βιώσιμης σύνθεσης AgNPs. Βακτήρια που έχουν μελετηθεί για τη σύνθεση AgNPs είναι τα *E. coli*, *Bacillus cereus* και *Streptomyces albogriseolus* [4], [26].

- Σύνθεση με μύκητες

Η σύνθεση των AgNPs με τη χρήση μυκήτων μπορεί να πραγματοποιηθεί ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά χρησιμοποιώντας τα μυκήλια ή το διήθημα, αντίστοιχα. Προτιμάται η εξωκυτταρική σύνθεση λόγω της εύκολης συλλογής και επεξεργασίας καθαρισμού. Πολλοί μύκητες επιλέγονται για τη σύνθεση AgNPs λόγω των μοναδικών δυνατοτήτων τους, όπως η ταχεία ανάπτυξη των μυκηλίων, η έκκριση διαφόρων εξωκυτταρικών ενζύμων σε μεγάλες ποσότητες, η οικονομική βιωσιμότητα και η μεγάλη επιφάνειά τους εξαιτίας των μυκηλίων. Διάφορες οργανικές ενώσεις των μυκήτων παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνθεση των AgNPs, όπως η νιτρική αναγωγάση, οι ξυλανάσες, οι ναφθοκινόνες και οι ανθρακινόνες, ενώ τα παράγωγα κινίνης των δύο τελευταίων εμπλέκονται στην αναγωγή του *Ag⁺*. Επιπλέον, ορισμένες πρωτεΐνες που εκκρίνονται από μύκητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες carrying. Διάφορες συνθήκες επώασης μπορεί να επηρεάσουν τα χαρακτηριστικά των AgNPs, όπως οι τύποι πηγών άνθρακα και αζώτου, η θερμοκρασία και η πηγή φωτός. Ωστόσο, ορισμένοι μύκητες, όπως ο *F. oxysporum*, αναγνωρίζονται ως δυνητικά παθογόνοι, γεγονός που μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την υγεία σε μεταγενέστερες εφαρμογές. Δύο μύκητες που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση AgNPs και είναι μη παθογόνοι είναι ο *Trichoderma asperellum* και ο *Trichoderma reesei* [4], [26].

- Σύνθεση με φύκη

Τα φύκη έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τη χρήση τους στη σύνθεση AgNPs. Περιέχουν μία πληθώρα βιομορίων, όπως υδατάνθρακες, πολυσακχαρίτες, ένζυμα, πρωτεΐνες, βιταμίνες, χρωστικές και δευτερογενείς μεταβολίτες, που καθιστούν τα άλγη ιδανικό υποψήφιο για τη σύνθεση των AgNPs. Αυτά τα βιομόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αναγωγικοί, σταθεροποιητικοί και carrying παράγοντες καθορίζοντας το σχήμα και το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Η σύνθεση μπορεί

να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως είναι η συγκέντρωση της πρόδρομης ένωσης αργύρου, το pH, ο χρόνος επώασης και η θερμοκρασίας. Ωστόσο, ο μηχανισμός σύνθεσης δεν είναι γνωστός και απαιτείται περαιτέρω έρευνα. Πρόκειται για μία εύκολη, βιώσιμη και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο. Διάφορα φύκη μπορούν να θεωρηθούν υποψήφια για τη σύνθεση των AgNPs λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους, όπως της ταχείας ανάπτυξης, της υψηλής ικανότητας συσσώρευσης μετάλλων και της άφθονης περιεκτικότητάς τους σε οργανικές ενώσεις. Ορισμένα που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση AgNPs είναι το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* και το κυανοβακτήριο *Spirulina platensis* [6], [26].

1.7.5. Σύγκριση

Συγκρίνοντας τις συμβατικές μεθόδους σύνθεσης AgNPs, φυσικές και χημικές, με τις πράσινες μεθόδους καθίσταται σαφές ότι η πράσινη σύνθεση είναι ελπιδοφόρα για την αντιμετώπιση των προβλημάτων των συμβατικών μεθόδων. Ωστόσο, χρειάζεται να πραγματοποιηθεί περαιτέρω έρευνα ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί η σύνθεση των AgNPs με πράσινες μεθόδους σε μεγάλη κλίμακα (Πίνακας 1.2).

Πίνακας 1.2. Σύγκριση μεθόδων σύνθεσης AgNPs

ΜΕΘΟΔΟΙ	+	-
Φυσικές	Υψηλής καθαρότητας AgNPs	Υψηλή κατανάλωση ενέργειας
	Ομοιομορφία κατανομής μεγέθους AgNPs	Υψηλό κόστος εξοπλισμού
	Απουσία διαλυτών	Τάση συσσωμάτωσης των AgNPs
Χημικές	Γρήγορη σύνθεση	Χρήση μη βιοσυμβατών διαλυτών
	Υψηλή απόδοση	Χρήση τοξικών διαλυτών
	Έλεγχος συνθηκών σύνθεσης	Δυσκολία απομάκρυνσης διαλυτών από τα AgNPs
	Ομοιογενή AgNPs	
Πράσινες	Μη τοξικοί διαλύτες	Άγνωστος ο μηχανισμός σύνθεσης
	Ήπιες συνθήκες	Περιορισμοί για scale-up
	Βιοσυμβατότητα	Χαμηλή επαναληψιμότητα

1.8. Μικροφύκη

Τα φύκη (λατινικά alga, πλ. algae) είναι μια μεγάλη πολυφυλετική κατηγορία μονοκύτταρων ή πολυκύτταρων οργανισμών με σχήματα και μεγέθη που ποικίλουν σημαντικά. Αναγνωρίζονται ως μια από τις παλαιότερες μορφές ζωής. Είναι πρωτόγονα φυτά χωρίς ρίζες, φύλλα ή μίσχους και ως βασική

φωτοσυνθετική χρωστική ουσία έχουν τη χλωροφύλλη α. Αποτελούν τη βάση διατροφής για το 70% της γήινης παραγωγής βιομάζας, ενώ ευθύνονται περίπου για το 50% της γήινης φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου. Διακρίνονται σε δύο μεγάλες κύριες μορφολογικές κατηγορίες:

- ❖ Μακροφύκη (macroalgae ή κοινώς seaweeds): Το μήκος τους κυμαίνεται από μερικά εκατοστά (*cm*) μέχρι πολλά μέτρα (*60 m*), όπως τα γιγάντια Φαιοφύκη.
- ❖ Μικροφύκη (microalgae): Το μήκος τους είναι μερικά μικρόμετρα (συνήθως $0,2 - 50 \mu m$ τα μονοκύτταρα και $100 - 200 \mu m$ στις περιπτώσεις των νηματωδών πολυκύτταρων σχηματισμών).

Τα μικροφύκη είναι προκαρυωτικοί και ευκαρυωτικοί φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί. Τα προκαρυωτικά κύτταρα (κυανοβακτήρια) είναι οι μόνοι γνωστοί προκαρυώτες που μπορούν να φωτοσυνθέτουν. Η ταξινόμηση των μικροφυκών δεν μπορεί να οριστεί εύκολα λόγω της ποικιλίας των ιδιοτήτων και των χαρακτηριστικών τους. Μερικά από τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται είναι το χρώμα, η βασική κυτταρική δομή και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Για παράδειγμα, με βάση το χρώμα τους μπορούν να διακριθούν σε μπλε-πράσινα (Cyanophyta), καφέ (Ochrophyta), κόκκινα (Rhodophyta) και πράσινα φύκη (Chlorophyta) [51] (Εικόνα 1.14).



Εικόνα 1.14. Ταξινόμηση φυκών με βάση το χρώμα [2]

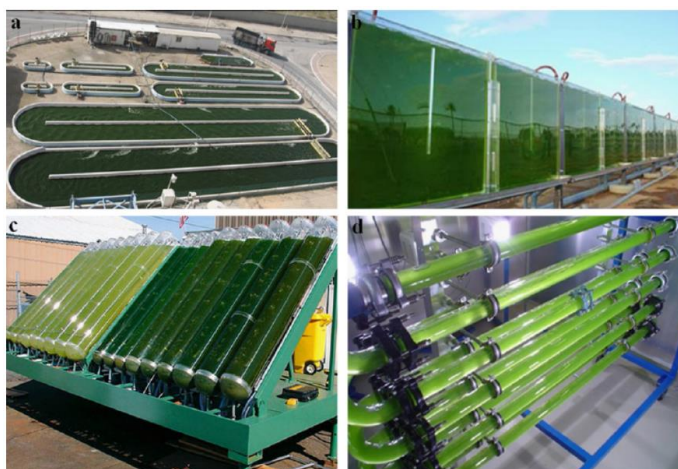
Τα μικροφύκη μπορούν να βρεθούν παντού στη Γη, καθώς μπορούν να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών, αρκεί να υπάρχει κάποια ποσότητα νερού και μικροθρεπτικών συστατικών λόγω της μονοκύτταρης ή απλής πολυκύτταρης δομής τους. Επομένως, συναντώνται σε σκοτεινά σπητικά περιβάλλοντα μέχρι και σε περιβάλλοντα με υψηλές συγκεντρώσεις άλατος. Ο φωτοσυνθετικός τους μηχανισμός είναι παρόμοιος με εκείνον των χερσαίων φυτών. Ωστόσο, στα μικροφύκη είναι πιο αποτελεσματικός, εξαιτίας της απλής κυτταρικής τους δομής και του γεγονότος ότι είναι βυθισμένα σε θαλασσινό περιβάλλον, όπου υπάρχει επάρκεια σε νερό, διοξείδιο του άνθρακα και άλλα θρεπτικά. Οι μεταβολικοί τύποι με τους οποίους μπορούν να αναπτυχθούν είναι ο φωτοαυτότροφος, ο ετερότροφος, ο μιξότροφος και ο φωτοετερότροφος και είναι ικανά για μεταβολική μετατόπιση ως απάντηση στις αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών [52], [53].

Τα μικροφύκη είναι ένας ανεκμετάλλευτος πόρος με περισσότερα από 50.000 είδη εκ των οποίων μόνο ένας περιορισμένος αριθμός, περίπου 30.000, έχουν μελετηθεί και αναλυθεί. Η χρήση τους στην ανθρώπινη διατροφή έχει καταγραφεί από αρχαιοτάτων χρόνων. Σήμερα, μόνο 15 από αυτά

χρησιμοποιούνται για εμπορικές εφαρμογές (*Spirulina*, *Chlorella*, *Haematococcus*, *Dunaliella*, *Botryococcus*, *Phaeodactylum* και *Porphyridium*). Άλλα είδη που επίσης είναι εμπορικά καλλιεργήσιμα και αφορούν τον τομέα των υδατοκαλλιεργειών είναι τα *Chaetoceros*, *Cryptothecodinium*, *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *Nitzschia*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis*, και *Skeletonema*. Υπάρχουν περίπου 110 εμπορικοί παραγωγοί μικροφυκών στην περιοχή της Ασίας-Ειρηνικού, με ετήσια παραγωγική δυναμικότητα που κυμαίνεται από 3 έως 500 τόνους. Περίπου 9 στις 10 καλλιέργειες βρίσκονται στην περιοχή της Ασίας. Η διαθεσιμότητα των μικροφυκών στο εμπόριο είναι περίπου 5000 t/y ξηρής ύλης. Η κατανάλωση της βιομάζας των μικροφυκών από τους ανθρώπους περιορίζεται σε πολύ λίγα είδη (*Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*), γεγονός που οφείλεται στους αυστηρούς κανονισμούς για την ασφάλεια των τροφίμων, τους εμπορικούς παράγοντες, τη ζήτηση από την αγορά και την ειδική προετοιμασία που απαιτείται. Πέρα από τη βιομηχανία τροφίμων, βρίσκουν εφαρμογή και στις βιομηχανίες των ζωοτροφών, της φαρμακευτικής, της κοσμητολογίας, των εδαφοβελτιωτικών, των βιοκαυσίμων, της διαχείρισης αποβλήτων και απόβλητων και του περιβάλλοντος [54], [55].

Το εύρος των εφαρμογών των μικροφυκών οφείλεται στις πολυάριθμες βιολογικές ιδιότητές τους, όπως αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιυπερτασικές, αντικές και πρόληψης καρδιαγγειακών παθήσεων. Αποτελούν μια μικρογραφία βιοχημικού εργοστασίου και μία πλούσια πηγή πολύτιμων βιομορίων, όπως πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών, λιπιδίων, λιπαρών οξέων, βιταμινών και φωτοσυνθετικών χρωστικών, όπως τα καροτενοειδή και οι χλωροφύλλες. Γενικά, παρουσιάζουν μία σημαντική συσσώρευση των λιπιδίων που φτάνει μέχρι και 70% επί του ξηρού βάρους τους [54], [55].

Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα των μικροφυκών είναι ότι αναπτύσσονται πολύ πιο γρήγορα σε σχέση με άλλες καλλιέργειες, καθώς διπλασιάζουν τη βιομάζα τους συνήθως μέσα σε 24 h , ενώ κατά τη



Εικόνα 1.15. Φωτοβιοαντιδραστήρες (PBRs) που χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη μικροφυκών: (α) επιμήκεις λεκάνες (b) τύπου επίπεδης πλάκας (c) κεκλιμένου σωληνοειδούς τύπου και (d) οριζόντιου συνεχούς σωληνοειδούς τύπου [56]

διάρκεια της εκθετικής τους φάσης ο χρόνος μπορεί να μειωθεί εξαιρετικά. Ωστόσο, είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν και να συλλεχθούν με έναν οικονομικά αποδοτικό τρόπο σε μεγάλη κλίμακα. Λίγα μόνο μικροφύκη παράγονται σε μεγάλη κλίμακα, όπως τα χλωροφύκη *Chlorella* και *Scenedesmus obliquus* και το κυανοβακτήριο *Spirulina*. Η καλλιέργεια μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ανοικτούς ή κλειστούς τύπους καλλιεργειών (Εικόνα 1.15). Στις ανοικτού τύπου καλλιέργειες, τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε τεχνητούς ή φυσικούς περιέκτες, όπως δεξαμενές, νερόλακκους και λίμνες. Στις κλειστού τύπου καλλιέργειες η καλλιέργεια γίνεται εντός διαφόρων σχημάτων κλειστών περιεκτών που ονομάζονται φωτοβιοαντιδραστήρες [53], [54].

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροφυκών μπορούν να διακριθούν σε [54]:

- ❖ Αβιοτικούς: το φως, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών (άνθρακας, άζωτο, φώσφορος κτλ), το οξυγόνο, το pH, η αλατότητα και το περιεχόμενο σε τοξικά και χημικά
- ❖ Βιοτικούς: η παρουσία παθογενών μικροοργανισμών (μύκητες, βακτήρια, ιοί) και ο ανταγωνισμός με άλλα μικροφύκη
- ❖ Λειτουργικούς: ο ρυθμός ανάδευσης, το βάθος και η συχνότητα συγκομιδής

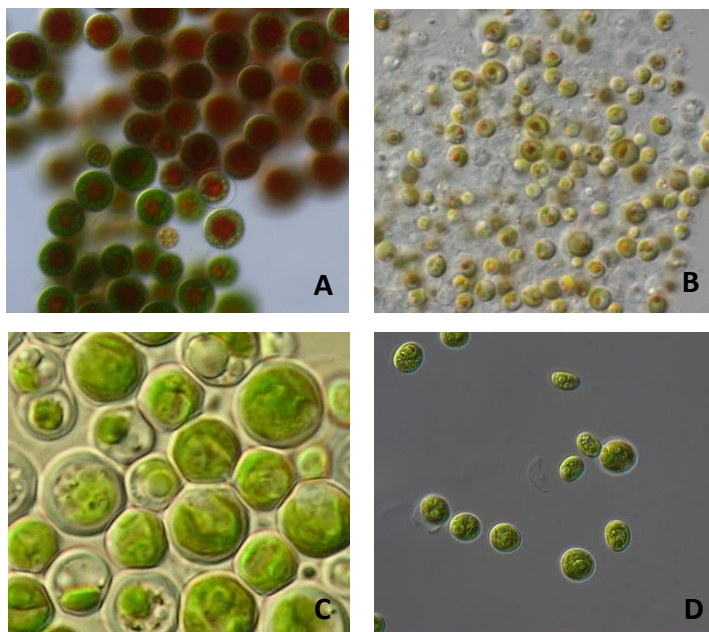
Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας τα είδη μικροφυκών που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα *Haematococcus pluvialis*, *Nannochloropsis oceanica*, *Chlorella vulgaris* και *Scenedesmus almeriensis* (Εικόνα 1.16). Παρακάτω παρουσιάζεται η ταξινόμησή τους (Πίνακας 1.3).

Πίνακας 1.3. Ταξινόμηση μικροφυκών [57]

Αυτοκρατορία (Empire)	Βασίλειο (Kingdom)	Φυλή (Phylum)	Κλάση (Class)	Τάξη (Order)	Οικογένεια (Family)	Γένος (Genus)	Είδος (Species)
Eukaryota	Plantae	Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlamydomonadales	Haematococcaceae	Haematococcus	pluvialis
Eukaryota	Chromista	Ochrophyta	Eustigmatophyceae	Eustigmatales	Monodopsidaceae	Nannochloropsis	oceanica
Eukaryota	Plantae	Chlorophyta	Trebouxiophyceae	Chlorellales	Chlorellaceae	Chlorella	vulgaris
Eukaryota	Plantae	Chlorophyta	Chlorophyceae	Sphaeropleales	Scenedesmaceae	Scenedesmus	almeriensis

1.8.1. Μικροφύκος *Haematococcus pluvialis*

Το *H. pluvialis* είναι ένα μονοκύτταρο μικροφύκος που τυπικά έχει σφαιρικό έως ωοειδές σχήμα με διάμετρο ~30 μm . Η έκθεσή του σε διάφορες συνθήκες στρες επηρεάζει τις υπερδομικές αλλαγές των κυττάρων σε όλο τον κύκλο ζωής τους. Αρχικά, ξεκινά ως ένα πράσινο διμαστιγωτό κύτταρο με έναν μόνο χλωροπλάστη που περιέχει πυρηνοειδή. Στη συνέχεια, χάνει τα μαστίγιά του και στρογγυλοποιείται για



Εικόνα 1.16. Αναπαράσταση των κυττάρων των μικροφυκών (A) *H. pluvialis* [58] (B) *N. oceanica* [59] (C) *C. vulgaris* [60] (D) *S. almeriensis* [61]

να γίνει ένα μη κινητικό κύτταρο. Τελικά μεταβαίνει σε κύτταρο με παχύ τοίχωμα. Τα βλαστικά κύτταρα του *H. pluvialis* (τα πράσινα στην Εικόνα 1.16Α), τα οποία συνδέονται με το πράσινο στάδιο και τη συσσώρευση βιομάζας, μπορούν να αναπαράγουν ασεξουαλικά 2 – 32 θυγατρικά κύτταρα. Στο ενδιάμεσο στάδιο αρχίζει να συσσωρεύεται ασταξανθίνη, όπου τα κύτταρα παίρνουν ένα χρώμα πρασινοπορτοκαλί (Εικόνα 1.16Α). Το μεταβατικό χρώμα μπορεί να παρατηρηθεί στις 7 έως 10 *ημέρες*. Οι συνθήκες στρες προκαλούν την απώλεια των μαστιγίων και την αύξηση του μεγέθους των κυττάρων. Η ασταξανθίνη συσσωρεύεται συνεχώς και στο τελικό στάδιο τα κύτταρα σχηματίζουν κύστες. Τα κύτταρα αναφέρονται ως «σχηματισμός ερυθράς ασταξανθίνης» (κόκκινο στάδιο) και σχηματίζονται στις 11 έως 14 *ημέρες*. Δημιουργείται ένα παχύ κυτταρικό τοίχωμα που περιέχει αλγενάνη και προστατεύει τα κύτταρα από την ακετόλυση λόγω στέρσης θρεπτικών συστατικών ή υψηλής έκθεσης στο φως. Στο τελικό στάδιο η ασταξανθίνη συσσωρεύεται πυκνά σε σταγονίδια στο περιπυρηνικό κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα το έντονο κόκκινο χρώμα των κυττάρων (Εικόνα 1.16Α) [62].

Το *H. pluvialis* μπορεί να συσσωρεύει καροτενοειδή υπό διάφορες συνθήκες ανάπτυξης σε ποσοστό μέχρι και 5% επί της ξηρής βιομάζας του, από το οποίο το 90% είναι ασταξανθίνη (15 – 30 *mg* ανά γραμμάριο ξηρού κυττάρου). Η ασταξανθίνη έχει αντιγηραντική, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και ηλιοπροστατευτική δράση και συμβάλλει στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι κύριες εφαρμογές της φυσικής ασταξανθίνης είναι στην υδατοκαλλιέργεια, στα συμπληρώματα διατροφής και στη φαρμακευτική. Αποτελεί φυσική πηγή κόκκινου χρώματος για τα τρόφιμα και ως χρωστική ουσία για τις ιχθυοτροφές. Ίσως η μεγαλύτερη χρήση της είναι για τις τροφές των σαλμονοειδών [62].

1.8.2. Μικροφύκος *Nannochloropsis oceanica*

Το *N. oceanica* (Εικόνα 1.16B) ανήκει στο γένος *Nannochloropsis*, ένα γένος μονοκύτταρου κοκκοειδούς μη κινητικού μικροφύκου με κιτρινοπράσινο χρώμα που αναπτύσσεται ευρέως σε θαλασσινό, γλυκό και υφάλμυρο νερό. Το μέγεθός του κυμαίνεται μεταξύ 2 και 8 μm . Διαθέτει τα μικρότερα και πιο απλής μορφής είδη, καθιστώντας την ταξινομική ταυτότητα των ειδών δύσκολη. Τα κύτταρά του μάλιστα είναι τόσο μικρά και δυσδιάκριτα σε σχέση με εκείνα των υπόλοιπων μικροφυκών, ώστε η διαδικασία του καθορισμού να καθίσταται δύσκολη ακόμα και με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Έχει πλαστίδια παρόμοια με αυτά των φυτικών κυττάρων και χαρακτηρίζεται για την απουσία της χλωροφύλλης b και c. Διαθέτει έναν χλωροπλάστη ανά κύτταρο που είναι πολύ κοντά στον πυρήνα και οι στοιβάδες των θυλακοειδών είναι ορατές. Τα σταγονίδια των λιπιδίων λειτουργούν ως αποθήκη ενέργειας, η οποία μπορεί να αυξηθεί σε μέγεθος υπό συνθήκες στρες [63].

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί έξι διαφορετικά είδη του γένους *Nannochloropsis*, τα οποία είναι τα *N. salina*, *N. gaditana*, *N. oculata*, *N. oceanica*, *N. granulate* και *N. limnetica*. Αποτελούν μία φυσική πηγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως είναι τα καρτενοειδή, τα λιπαρά οξέα (FAs), τα στεροειδή και οι πολυσακχαρίτες. Σε γενικές γραμμές, το μεγαλύτερο ποσοστό των παραγόμενων συστατικών του είναι οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται υπό στρεσογόνες συνθήκες. Το κυριότερο κυτταρικό συστατικό, που ενδιαφέρει ιδιαίτερα τους επιστήμονες αλλά και τη βιομηχανία, είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA). Πιο συγκεκριμένα, τα βασικά λιπαρά οξέα του μικροφύκου είναι τα 14:0, 16:0, 16:1, 20:4 ω 6 και 20:5 ω 5, εμφανίζοντας ιδιαίτερα υψηλές τιμές περιεκτικότητας στο εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA). Όλα τα είδη του μικροφύκου *Nannochloropsis* διαθέτουν περιεκτικότητα σε ολικά λιπαρά σε ποσοστό 37 – 60% επί της ξηρής βιομάζας. Τα είδη *N. oculata* και *N. gaditana* χρησιμοποιούνται στη θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια λόγω του περιεχομένου τους σε EPA, ενώ θεωρούνται και ελκυστική πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ λόγω της ικανότητάς τους να συσσωρεύσουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων, όπως και το *N. oceanica* [63].

1.8.3. Μικροφύκος *Chlorella vulgaris*

Το *C. vulgaris* (Εικόνα 1.16C) είναι ένα μονοκύτταρο σφαιρικό μικροφύκος με διάμετρο 2 – 10 μm , έχει πολλά δομικά στοιχεία παρόμοια με τα φυτά και αναπτύσσεται σε γλυκό νερό. Είναι ένα μη κινητικό αναπαραγωγικό κύτταρο που αναπαράγεται ασεξουαλικά και γρήγορα μέσα σε 24 h. Έχει γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης και ανταποκρίνεται σε κάθε σύνολο συνθηκών ανάπτυξης τροποποιώντας την απόδοση ενός συγκεκριμένου συστατικού [64].

Το *C. vulgaris* είναι ένα από τα πιο μελετημένα και δημοφιλή φύκη παγκοσμίως. Είναι ιδανικό για παραγωγή, γιατί είναι εξαιρετικά ανθεκτικό στις σκληρές συνθήκες και τους εισβολείς. Από τη μία

πλευρά, η περιεκτικότητα σε λιπίδια και άμυλο αυξάνεται και η παραγωγικότητα της βιομάζας σταματά ή μειώνεται κατά τη διάρκεια δυσμενών συνθηκών ανάπτυξης, όπως ο περιορισμός του αζώτου και του φωσφόρου, η υψηλή συγκέντρωση CO_2 , η υπερβολική έκθεση στο φως, η περίσσεια σιδήρου στο μέσο ή η αύξηση της θερμοκρασίας. Από την άλλη πλευρά, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη αυξάνεται κατά τη διάρκεια φυσιολογικών και ελεγχόμενων συνθηκών ανάπτυξης (συμπληρώματα αζώτου). Ως εκ τούτου, πολλές τεχνικές ανάπτυξης χρησιμοποιούνται στοχεύοντας επιλεκτικά την παραγωγικότητα της βιομάζας, τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και την περιεκτικότητα σε χρωστικές ουσίες. Η συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες στο ώριμο *C. vulgaris* αντιπροσωπεύει το 42 – 58% του ξηρού βάρους βιομάζας. Το ποσοστό των λιπιδίων σε βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης κυμαίνεται στο 5– 40% ανά ξηρό βάρος βιομάζας, ενώ κατά τη διάρκεια δυσμενών συνθηκών ανάπτυξης μπορεί να φτάσει το 58%. Σε αυτή την περίπτωση τριακυλογλυκερίνες συσσωρεύονται ως πυκνά αποθηκευτικά σταγονίδια λιπιδίων στο κυτταρόπλασμα και στον μεσοθυλακοειδή χώρο του χλωροπλάστη. Το ποσοστό των υδατανθράκων κατά τη διάρκεια του περιορισμού του αζώτου μπορεί να φτάσει το 12 – 55% του ξηρού βάρους. Η πιο άφθονη χρωστική ουσία είναι η χλωροφύλλη, η οποία μπορεί να φτάσει το 1 – 2% επί του ξηρού βάρους και βρίσκεται στα θυλακοειδή, αλλά περιέχει επίσης σημαντικές ποσότητες καροτενοειδών. Βρίσκει εφαρμογή σε τομείς όπως η ανθρώπινη διατροφή, τα βιοκαύσιμα, οι ζωοτροφές και επεξεργασία λυμάτων. Σήμερα, η Ιαπωνία είναι ο παγκόσμιος ηγέτης στην κατανάλωση *Chlorella* και τη χρησιμοποιεί για ιατρική θεραπεία [64].

1.8.4. Μικροφύκος *Scenedesmus almeriensis*

Το *Scenedesmus* είναι ένα γένος που περιλαμβάνει πάνω από 70 είδη και πρόκειται για κοινά πράσινα μικροφύκη του γλυκού νερού. Μπορεί να είναι σφαιρικά κύτταρα (Εικόνα 1.16D) ή ελλειπτικά μεμονωμένα κύτταρα γραμμικά ή πλευρικά διατεταγμένα σε μία ή δύο σειρές και αποτελούνται από 4, 8, 16 ή 32 κύτταρα. Ορισμένα είδη είναι αγκαθωτά ή έχουν τρίχες. Είναι μη κινητικά και συνήθως περιβάλλονται από βλέννα. Ο σχηματισμός αυτός μπορεί να επηρεάζεται από την κυτταρική πυκνότητα, τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών, το pH, τη θερμοκρασία ή ακόμη και την παρουσία φυτοφάγου ζωοπλαγκτόν [65].

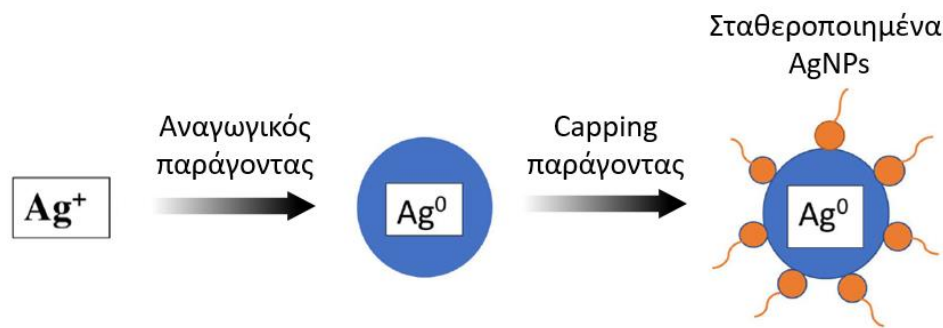
Λόγω της εξαιρετικής ανάπτυξής τους, του υψηλού δυναμικού παραγωγής καροτενοειδών και της υψηλότερης ικανότητας θερμοαντοχής, τα είδη *Scenedesmus* μπορούν να αξιοποιηθούν στην παραγωγή βιομάζας πλούσιας σε καροτενοειδή, όπως β-καροτένιο, ισομερή ασταξανθίνης και λουτεΐνης. Τα καροτενοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χρωστική και στα καλλυντικά λόγω της αντιηλιακής προστασίας που προσφέρουν. Επιπλέον, διαθέτουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και μπορούν να βρουν εφαρμογή στα συμπληρώματα διατροφής. Τα είδη *Scenedesmus* μπορούν να χρησιμοποιηθούν, επίσης,

σε ζωοτροφές, σε βιολιπάσματα και ως δείκτης ρύπανσης, καθώς μπορούν να προσαρμοστούν και να αναπτυχθούν καλά σε μολυσμένα νερά ή λύματα. Ωστόσο, μπορούν να συμβάλλουν στις διαδικασίες καθαρισμού των λυμάτων παρέχοντας οξυγόνο για τη βακτηριακή διάσπαση της οργανικής ύλης και βοηθώντας στην καταστροφή άλλων επιβλαβών ουσιών. Ακόμη, παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), όπως λινολενικό οξύ και ελαϊκό οξύ, καθιστώντας τα καλούς υποψήφιους για την παραγωγή βιοκαυσίμων [65], [66].

1.9. Σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου με τη χρήση μικροφυκών

Τα μικροφύκη αποτελούν μία μικρογραφία βιοχημικού εργοστασίου και μία πλούσια πηγή πολύτιμων βιομορίων, όπως πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών, λιπιδίων, λιπαρών οξέων, βιταμινών και φωτοσυνθετικών χρωστικών, όπως τα καροτενοειδή και οι χλωροφύλλες. Επιπλέον, έχουν γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης, οικονομικά αποδοτική κλιμάκωση (scale-up), συλλέγονται εύκολα και διαθέτουν την ικανότητα να υπερσυσσωρεύουν μέταλλα και να τα μετατρέπουν σε νανοσωματίδια. Επιπλέον, ο χρόνος που απαιτείται για τη σύνθεση νανοσωματιδίων είναι μικρότερος συγκριτικά με τον χρόνο που χρειάζονται άλλοι μικροοργανισμοί. Για παράδειγμα, με το βακτήριο *E. coli* χρειάζονται περίπου 60 h για να πραγματοποιηθεί η σύνθεση AgNPs, ενώ με το μικροφύκος *Caulerpa racemose* μόλις 3 h. Τα AgNPs που συντίθενται από μικροφύκη περιέχουν υδρόφιλες επιφανειακές ομάδες, όπως θειικές, υδροξυλικές και καρβοξυλικές, που τους προσδίδουν μοναδικές δυνατότητες εφαρμογής. Ακόμη, μπορούν να χρησιμοποιούνται στην ιατρική θεραπεία, καθώς τα ίδια τα μικροφύκη δεν παράγουν καμία τοξική ή επιβλαβή ουσία. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν τα μικροφύκη ιδανικούς υποψήφιους για τη σύνθεση AgNPs με πράσινες μεθόδους [2], [6].

Τα βιομόρια μπορούν να ανάγουν τα ιόντα αργύρου (Ag^+), που προέρχονται από τη διάσταση της πρόδρομης ένωσης αργύρου στο νερό, προς σχηματισμό ελεύθερων μεταλλικών ατόμων αργύρου (Ag^0). Ο ρόλος των βιομορίων είναι διττός, καθώς δρουν και ως σταθεροποιητικοί παράγοντες. Η σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων επιτυγχάνεται με τη δημιουργία ενός capping γύρω από αυτά κατά



Εικόνα 1.17. Μηχανισμός σύνθεσης AgNPs με τη χρήση μικροφυκών [6]

τη διάρκεια της σύνθεσης, όταν τα βιομόρια προσδένονται στην επιφάνεια του αργύρου, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη συσσωμάτωσή τους [67] (Εικόνα 1.17). Το είδος του μικροφύκους επιδρά με διαφορετικό τρόπο στη σύνθεση των νανοσωματιδίων, οπότε το μέγεθος και το σχήμα τους μπορεί να διαφέρει. Αυτές οι διαφοροποιήσεις οφείλονται τόσο στη διαφορετική συγκέντρωση αλλά και στο είδος των βιομορίων που μπορεί να παράγει το κάθε μικροφύκος. Επιπλέον, η σύθεση επηρεάζεται και από εξωτερικούς παράγοντες, όπως το φως, ο χρόνος, η θερμοκρασία, το pH και η συγκέντρωση της πρόδρομης ένωσης αργύρου. Ο τρόπος σύνθεσης είναι ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας που καθορίζει τη σύνθεση των AgNPs. Οι πιθανοί τρόποι είναι με τη χρήση εκχυλίσματος βιομορίων, εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας, ολόκληρων των κυττάρων ή της καλλιέργειας ζωντανών μικροφυκών. Ωστόσο, τα βιομόρια που εμπλέκονται και ο ακριβής μηχανισμός της σύνθεσης δεν είναι γνωστός και απαιτείται περαιτέρω έρευνα [6], [68].

1.9.1. Με τη χρήση εκχυλίσματος κυττάρων

Τα βιομόρια είναι τα οργανικά μόρια που υπάρχουν μέσα στα κύτταρα και μπορεί να είναι αμινοξέα και πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, νουκλεϊκό οξύ ή μερικά μικρά οργανικά μόρια. Τα βιομόρια ανάγουν τα Ag^+ και σταθεροποιούν τα σχηματιζόμενα νανοσωματίδια. Για την εξαγωγή των βιομορίων από τα κύτταρα, χρειάζεται να πραγματοποιηθεί κυτταρική λύση. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τη λύση των κυττάρων των μικροφυκών, όπως η θερμόλυση, η άλωση με σφαιρίδια, οι υπέρηχοι και η επεξεργασία



Εικόνα 1.18. Διαφορετικοί τρόποι σύνθεσης AgNPs με τη χρήση μικροφυκών [6]

με λέιζερ. Μία σημαντική μέθοδος είναι η εκχύλιση με διαλύτη, όπως η αιθανόλη. Μετά την παραλαβή τους, είναι δυνατή η χρήση τους για τη σύνθεση AgNPs. Με αυτόν τον τρόπο έχει πραγματοποιηθεί η σύνθεση AgNPs από τα μικροφύκη *C. vulgaris* και *Amphora sp.* [6], [68].

1.9.2. Με τη χρήση εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας

Η μέθοδος αυτή είναι η πιο απλή, καθώς το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας μπορεί να παραληφθεί εύκολα. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται η ανάπτυξη του μικροφύκου σε ένα υγρό μέσο καλλιέργειας και στη συνέχεια διαχωρίζεται η βιομάζα από το μέσο με φυγοκέντρηση ή διήθηση. Το υπερκείμενο που λαμβάνεται αποτελεί το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση AgNPs [6]. Ο Patel και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν αυτή τη μέθοδο για τη σύνθεση AgNPs εξετάζοντας πολλά μικροφύκη, όπως τα κυανοβακτήρια *Limnothrix sp.* και *Cylindrospermopsis sp.* και τα χλωρόφυτα *Chlamidomonas sp.*, *Chlorella sp.* και *Scenedesmus sp.* [69].

1.9.3. Με τη χρήση ολόκληρων των κυττάρων

Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση το μικροφύκος αναπτύσσεται σε ένα υγρό μέσο καλλιέργειας και στη συνέχεια διαχωρίζεται η βιομάζα από το μέσο με φυγοκέντρηση, διήθηση ή με απλό ξέπλυμα των κυττάρων. Μετά τον διαχωρισμό, τα κύτταρα των μικροφυκών επαναιωρούνται σε απεσταγμένο νερό. Ακολούθως προστίθενται στο διάλυμα της πρόδρομης ένωσης του αργύρου για να πραγματοποιηθεί η σύνθεση των AgNPs [6]. Είναι και αυτός ένας απλός και εύκολος τρόπος σύνθεσης, όπου τα κύτταρα λειτουργούν σαν βιοκαταλύτες. Ωστόσο, ακόμα κι αν τα κύτταρα παραμείνουν άθικτα χωρίς καμία βλάβη, μπορεί να χάσουν τη μεταβολική τους δραστηριότητα μέσα σε λίγες ώρες, καθώς απομακρύνονται από το μέσο ανάπτυξής τους και επαναιωρούνται σε απεσταγμένο νερό, το οποίο είναι ένα περιβάλλον που υποβάλλει τα κύτταρα σε συνθήκες στρες εκθέτοντάς τα σε υψηλή οσμωτική πίεση [68]. Μερικά μικροφύκη που έχουν μελετηθεί για τη σύνθεση AgNPs με τη χρήση ολόκληρων των κυττάρων είναι τα *Synechocystis sp.*, *Botryococcus sp.* και *Chlorella sp.* [69].


1.9.4. Με τη χρήση καλλιέργειας ζωντανών μικροφυκών

Η χρήση της καλλιέργειας ζωντανών μικροφυκών για τη σύνθεση AgNPs είναι μία από τις απλούστερες μεθόδους. Σε αυτό μέθοδο, γίνεται απευθείας προσθήκη της πρόδρομης ένωσης αργύρου στην καλλιέργεια των ζωντανών κυττάρων. Η σύνθεση μπορεί να πραγματοποιηθεί ακολουθώντας δύο οδούς. Η πρώτη είναι η ενδοκυτταρική οδός, στην οποία η σύνθεση γίνεται μέσα στα κύτταρα, και η άλλη είναι

η εξωκυτταρική οδός, στην οποία η σύνθεση γίνεται έξω από τα κύτταρα, καθώς τα μικροφύκη εκκρίνουν ορισμένες βιοδραστικές ενώσεις στο περιβάλλον που διευκολύνουν τη σύνθεση των AgNPs. Στην περίπτωση που η σύνθεση πραγματοποιείται εσωκυτταρικά απαιτείται ένα επιπλέον βήμα, αυτό της διάρρηξης των κυττάρων, για την παραλαβή των νανοσωματιδίων μετά την σύνθεση. Οι καλλιέργειες ζωντανών μικροφυκών *N. oculata*, *Dunaliella salina* και *C. vulgaris* έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση AgNPs [6].

1.10. Σκοπός μελέτης

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) χρησιμοποιώντας το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* μελετώντας την επίδραση διαφόρων παραγόντων. Η επιλογή του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας έγινε αφενός λόγω της απλότητας της μεθόδου και αφετέρου στα πλαίσια της λογικής εκμετάλλευσης του συνόλου της καλλιέργειας, καθώς η κύρια εφαρμογή του μικροφύκου *H. pluvialis* είναι η αξιοποίηση της ασταξανθίνης που συσσωρεύεται στο εσωτερικό των κυττάρων του. Το συγκεκριμένο μικροφύκος δεν έχει μελετηθεί μέχρι τώρα από την επιστημονική κοινότητα για τη σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου. Οι υπό εξέταση παράγοντες είναι το φως, το *pH* του υδατικού διαλύματος νιτρικού αργύρου, η θερμοκρασία σύνθεσης, η συγκέντρωση του νιτρικού αργύρου στο υδατικό διάλυμα, η κατ' όγκο αναλογία του διαλύματος νιτρικού αργύρου με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας και η ανάδευση. Πραγματοποιείται χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων με τις μεθόδους UV-Vis, DLS, TEM και XRD και εξετάζεται η αντιβακτηριακή τους δράση.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:
Υλικά και Μέθοδοι

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Μικροοργανισμοί

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν συνολικά πέντε μικροοργανισμοί και πιο συγκεκριμένα τέσσερα στελέχη μικροφυκών και ένα στέλεχος βακτηρίου. Τα στελέχη των μικροφυκών ήταν τα εξής:

- ❖ *Haematococcus pluvialis* (*Haematococcus lacustris*) CCAP34/6, το οποίο προμηθεύτηκε από την Culture Collection of Algae and Protozoa (Dunbeg, UK)
- ❖ *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779, το οποίο προμηθεύτηκε από την CCMP (Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton, USA) που πλέον ονομάζεται NCMA (Provasoli-Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota)
- ❖ *Chlorella vulgaris* UTEX 1809, το οποίο παραχωρήθηκε από τον Καθ. Χ. Σταμάτη (Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων)
- ❖ *Scenedesmus almeriensis* παραχωρήθηκε από τον Dr. Antonio Molino (ENEA, Italy)

Επιπλέον, για τον έλεγχο των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των AgNPs χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *Escherichia coli* (*E. coli*).

2.2. Χημικά αντιδραστήρια – Αναλώσιμα Υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), Merck (Γερμανία) και PanReac AppliChem (Γερμανία) και η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού. Τα αναλώσιμα εργαστηριακά υλικά, των οποίων έγινε χρήση, ενδεικτικά ήταν κωνικές φιάλες Erlenmeyer, ποτήρια ζέσεως, ογκομετρικοί κύλινδροι, γυάλινα μπουκάλια αποστείρωσης, ρύγχη πιπετών (tips), πιπέτες Pasteur, σωληνάρια τύπου Eppendorf (Eppendorf tubes 1,5 & 2,0 mL), σωληνάρια φυγοκέντρου τύπου Falcon (Falcon tubes 15 & 50 mL), αποστειρωμένες βελόνες και σύριγγες μίας χρήσης, αποστειρωμένα τρυβλία Petri, σπάτουλες, σπαθίδα διανομής κυτταρικού υλικού (cell spreader) και μαγνητάκια ανάδευσης. Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά υλικά ήταν των εταιρειών Eppendorf (Γερμανία), ISOLAB (Γερμανία), SCHOTT AG (Γερμανία), SIMAX (Τσεχία), BOMEX (Κίνα), Greiner-Bio One (Γερμανία), Sterilin Limited (Μ. Βρετανία), Merck-Millipore (Γερμανία) και Whatman (Μ. Βρετανία).

2.3. Όργανα και Συσκευές

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1. Όργανα και συσκευές για τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό των AgNPs

ΟΡΓΑΝΟ/ΣΥΣΚΕΥΗ	ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗΣ	ΜΟΝΤΕΛΟ
Ανακινούμενοι Επωαστικοί Θάλαμοι	ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)	ZHWY-211C
Αναλυτής Μεγέθους Σωματιδίων	Malvern Panalytical (Μ. Βρετανία)	Zetasizer Nano ZS
Αναλυτικός Ζυγός	KERN & SOHN GmbH (Γερμανία)	Abs 120-4N
Αυτόκαυστο	SANYO (Η.Π.Α.)	Labo Autoclave MLS-3020
Επωαστήρας	Stuart Scientific (Μ. Βρετανία)	ORBITAL INCUBATOR SI50
Ζυγός Ακριβείας	BEL Engineering (Ιταλία)	Mark 2060
Ζυγός Ακριβείας	BEL Engineering (Ιταλία)	Mark 4065
Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης	JEOL (Η.Π.Α.)	JEM-2100 LaB ₆
Μικροφυγόκεντρος Πάγκου	Eppendorf (Γερμανία)	3200
Οπτικό Μικροσκόπιο	Zeiss (Γερμανία)	Axiolab
Περιθλασίμετρο Ακτίνων-Χ	Bruker (Η.Π.Α.)	D8 Advance
Συσκευή Καθαρισμού Υπερήχων	EMAG Technologies (Γερμανία)	Emmi-30HC
Συσκευή Λυοφιλίωσης (Freeze Drying)	B. Braun Biotech International (Γερμανία)	CHRIST ALPHA 1-4
Συσκευή Μέτρησης pH	WTW (Γερμανία)	537
Σύστημα Παραγωγής Υπερκάθαρου Νερού	Millipore (Η.Π.Α.)	Direct-Q
Φασματοφωτόμετρο UV/Vis	Hitachi (Ιαπωνία)	U-5100
Φυγόκεντρος	Hettich (Γερμανία)	ROTANTA 460R
Φωτόμετρο	BOECO (Γερμανία)	S-20 Vis Spectrophotometer

2.4. Θρεπτικά Μέσα

• Μικροφύκος *H. pluvialis*

Το μικροφύκος *H. pluvialis* αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο, η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται αναλυτικά (Πίνακας 2.2). Το νιτρικό ασβέστιο ($Ca(NO_3)_2$) και το νιτρικό κάλιο (KNO_3) αποτελούσαν τις πηγές αζώτου, ενώ ως πηγή άνθρακα προστέθηκε όξινο ανθρακικό νάτριο ($NaHCO_3$) σε τελική συγκέντρωση 1 g/L στην καλλιέργεια. Το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 7,5 [70].

Πίνακας 2.2. Σύσταση θρεπτικού μέσου μικροφύκους *H. pluvialis*

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΥΣΤΑΣΗ ($L^{-1} dH_2O$)
$Ca(NO_3)_2$	0,15 g
KNO_3	0,10 g
β-glycerophosphoric acid disodium salt pentahydrate	0,05 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,04 g
Tris-aminomethane	0,50 g
Thiamine	0,01 mg
PIV metal solution*	3,00 mL
Biotin	0,10 μg
Vitamin B_{12}	0,10 μg
*PIV metal solution	
Na_2EDTA	1,0 g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,196 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	36,0 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22,0 mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	4,0 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	2,5 mg

• Μικροφύκος *N. oceanica*

Το μικροφύκος *N. oceanica* αναπτύχθηκε σε φυσικό θαλασσινό νερό που εμπλουτιζόταν με το θρεπτικό μέσο F/2, του οποίου η σύσταση παρουσιάζεται αναλυτικά (Πίνακας 2.3). Το νιτρικό νάτριο ($NaNO_3$) αποτελούσε την πηγή αζώτου, ενώ ως πηγή άνθρακα προστέθηκε όξινο ανθρακικό νάτριο ($NaHCO_3$) σε τελική συγκέντρωση 1 g/L στην καλλιέργεια. Το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 8,0 [71]. Το θαλασσινό νερό διηθούταν αρχικά με διηθητικό χαρτί για την απομάκρυνση των ακαθαρσιών και στη συνέχεια υπό κενό με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm .

Πίνακας 2.3. Σύσταση θρεπτικού μέσου F/2 μικροφύκους *N. oceanica*

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΥΣΤΑΣΗ ($L^{-1} dH_2O$)
$NaNO_3$	0,075 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0,005 g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	$3,15 \cdot 10^{-3} g$

$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	$4,36 \cdot 10^{-3} g$
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	$9,80 \cdot 10^{-6} g$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	$6,30 \cdot 10^{-6} g$
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	$2,20 \cdot 10^{-5} g$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	$1,00 \cdot 10^{-5} g$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	$1,8 \cdot 10^{-4} g$
Biotin	$5 \cdot 10^{-7} g$
Vitamin B_{12}	$5 \cdot 10^{-7} g$
Thiamine · HCl	$1,00 \cdot 10^{-4} g$

· Μικροφύκος *C. vulgaris*

Το μικροφύκος *C. vulgaris* αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο, η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται αναλυτικά (Πίνακας 2.4). Το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 6,8 – 7,0 [72].

Πίνακας 2.4. Σύσταση θρεπτικού μέσου μικροφύκους *C. vulgaris*

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΥΣΤΑΣΗ ($L^{-1} dH_2O$)
$NaNO_3$	250 mg
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	25 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	75 mg
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	75 mg
KH_2PO_4	175 mg
$NaCl$	25 mg
Trace element solution*	6,00 mL
Vitamin B_1	0,12 μg
Vitamin B_{12}	0,10 μg
*Trace element solution	
Na_2EDTA	750 mg
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	97,0 mg
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	41,0 mg
$ZnCl_2 \cdot 6H_2O$	5,0 mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	2,0 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	4,0 mg

- Μικροφύκος *S. almeriensis*

Το μικροφύκος *S. almeriensis* αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο BG11 με τροποποιημένη σύσταση που παρουσιάζεται αναλυτικά (Πίνακας 2.5). Το νιτρικό νάτριο ($NaNO_3$) και το ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) αποτελούν την πηγή αζώτου και άνθρακα, αντίστοιχα. Το *pH* ρυθμίστηκε στην τιμή 8,0 [73], [74].

Πίνακας 2.5. Σύσταση θρεπτικού μέσου μικροφύκου *S. almeriensis*

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΥΣΤΑΣΗ ($L^{-1} dH_2O$)
$NaNO_3$	1500 mg
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	40 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	75 mg
Ammonium ferric citrate	6 mg
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	36 mg
Na_2CO_3	20 mg
Citric acid	6 mg
EDTA	1 mg
H_3BO_3	2,86 mg
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,81 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,079 mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,39 mg
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,049 mg

- Βακτήριο *E. coli*

Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε για το βακτήριο *E. coli* ήταν το LB, η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται αναλυτικά (Πίνακας 2.6). Το *pH* ρυθμίστηκε στην τιμή 7,0 [75].

Πίνακας 2.6. Σύσταση θρεπτικού μέσου LB βακτηρίου *E. coli*

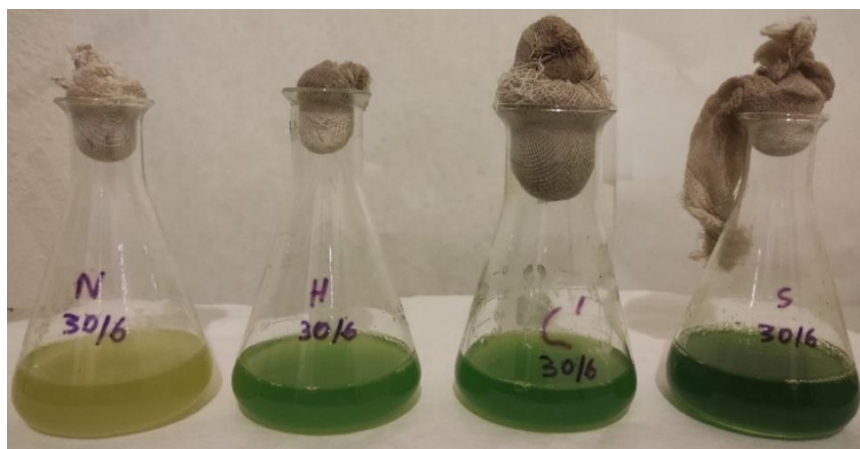
ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΣΥΣΤΑΣΗ ($L^{-1} dH_2O$)
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	5 g
Τρυπτόνη	10 g
NaCl	10 g
Άγαρ*	15 g

*Σημειώνεται ότι η προσθήκη του άγαρ έγινε μόνο στην περίπτωση παρασκευής στερεού υποστρώματος ανάπτυξης του βακτηρίου για την επίστρωση τρυβλίων.

2.5. Καλλιέργεια μικροοργανισμών

2.5.1. Διατήρηση μικροφυκών/Ανακαλλιέργεια

Για τη διατήρηση των τεσσάρων μικροφυκών χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 100 mL που περιείχαν 50 mL καλλιέργειας του κάθε μικροφύκου (Εικόνα 2.1). Οι φιάλες ήταν πωματισμένες με υδρόφοβο βαμβάκι και τοποθετημένες σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 23°C υπό συνεχή ανάδευση 100 rpm. Ως πηγή φωτεινής ενέργειας χρησιμοποιήθηκαν λάμπες LED λευκού φωτός έντασης $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ με φωτοπερίοδο 24 h συνεχή φωτισμό. Κάθε περίπου 10 ημέρες πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργειες με εμβόλιο ποσότητας ίσης με 10% του τελικού όγκου της νέας καλλιέργειας. Η διαδικασία των ανακαλλιεργιών ήταν αντίστοιχη με εκείνη των καλλιεργειών, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην § 2.5.3.



Εικόνα 2.1. Καλλιέργειες μικροφυκών *N. oceanica*, *H. pluvialis*, *C. vulgaris* και *S. almeriensis* (από αριστερά προς τα δεξιά) ηλικίας 10 ημερών

2.5.2. Έλεγχος αξενικότητας και ανάπτυξης μικροφυκών

Συστηματικά πραγματοποιούταν έλεγχος αξενικότητας για τη διαπίστωση τυχόν μολύνσεων στις καλλιέργειες των τεσσάρων μικροφυκών με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου. Η προσθήκη του αντιβιοτικού αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 mg/L σε κάθε καλλιέργεια συνέβαλλε στην αποφυγή πιθανής βακτηριακής μόλυνσης.

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης των καλλιιεργειών των τεσσάρων μικροφυκών πραγματοποιούνταν με τη μέθοδο μέτρησης οπτικής πυκνότητας. Ανά δύο μέρες λαμβανόταν δείγμα (2 mL) από κάθε καλλιέργεια και ύστερα από κατάλληλη αραιώση τοποθετούνταν σε πλαστική κυψελίδα 1 cm. Οι μετρήσεις γίνονταν με τη χρήση φωτόμετρου σε μήκη κύματος 750 nm για το μικροφύκος *N. oceanica* [73], σε 680 nm για το μικροφύκος *H. pluvialis* [70] και σε 600 nm για τα μικροφύκη *C. vulgaris* [72] και *S. almeriensis* [73].

2.5.3. Καλλιέργεια μικροφυκών

Οι καλλιέργειες των τεσσάρων μικροφυκών πραγματοποιούνταν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL και με τελικό όγκο καλλιέργειας 100 mL. Το φρέσκο θρεπτικό υλικό κάθε μικροφύκου (§2.4) προετοιμαζόταν σε ποσότητα ίση με 90% του τελικού όγκου της νέας καλλιέργειας. Η ρύθμιση του αρχικού pH των καλλιιεργειών πραγματοποιούνταν με χρήση διαλυμάτων υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) και υδροχλωρικού οξέος (HCl). Οι φιάλες πωματίζονταν με υδρόφοβο βαμβάκι και αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 121°C για 20 min υπό πίεση 0,1 mPa. Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ακολουθούσε η προσθήκη των θερμοευαίσθητων υλικών, δηλαδή των βιταμινών και του θρεπτικού μέσου F/2. Οι βιταμίνες και το μέσο F/2 αποστειρώνονταν με διήθηση μέσω φίλτρου 0,22 μm. Ο εμβολιασμός των καλλιιεργειών πραγματοποιούνταν με προσθήκη 10% (v/v) αξενικής αυτοτροφικής καλλιέργειας μικροφύκου ηλικίας 10 ημερών. Οι καλλιέργειες επώαζονταν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 23°C υπό συνεχή ανάδευση 100 rpm. Ως πηγή φωτεινής ενέργειας χρησιμοποιήθηκαν λάμπες LED λευκού φωτός έντασης 80 μmol · m⁻² · s⁻¹ με φωτοπερίοδο 24 h συνεχή φωτισμό.

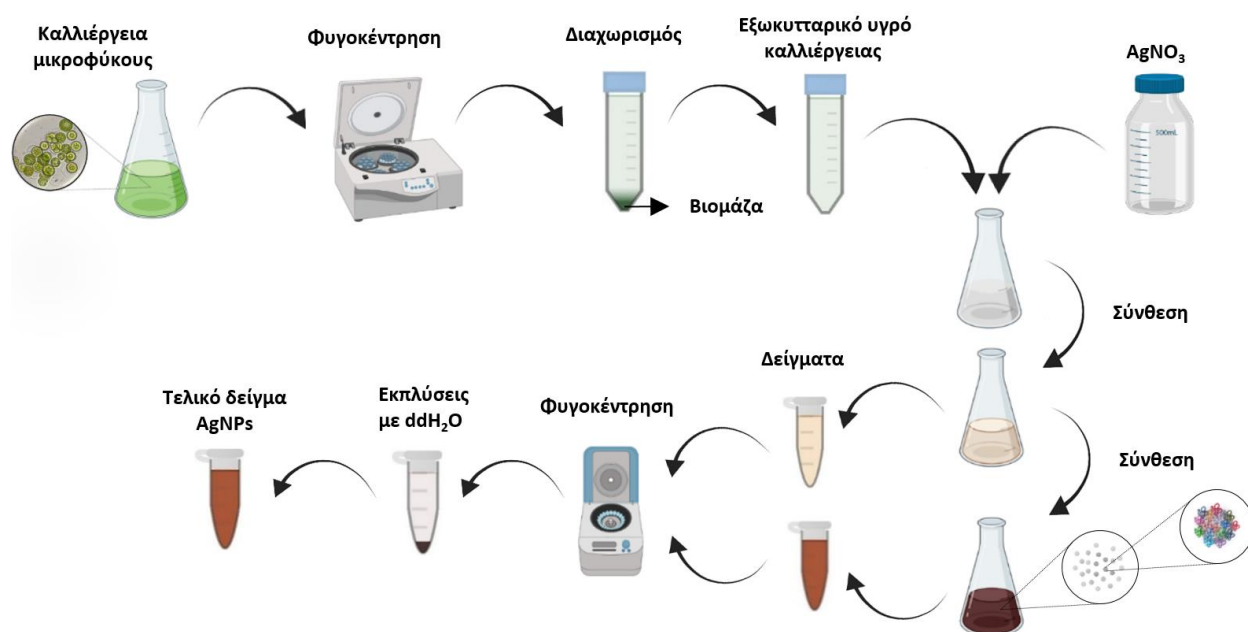
2.5.4. Καλλιέργεια *E. coli*

Οι υγρές καλλιέργειες του *E. coli* πραγματοποιούνταν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 100 mL και περιείχαν 50 mL θρεπτικό υλικό (§ 2.4). Για τη ρύθμιση του pH των καλλιιεργειών χρησιμοποιούνταν διαλύματα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) και υδροχλωρικού οξέος (HCl). Το θρεπτικό μέσο αποστειρωνόταν σε αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 121°C για 20 min υπό πίεση 0,1 mPa και ακολουθούσε εμβολιασμός με κύτταρα του βακτηρίου *E. coli*. Η επώαση πραγματοποιούνταν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 37°C υπό συνεχή ανάδευση 180 rpm για ~20 h. Η παρακολούθηση της ανάπτυξης του βακτηρίου πραγματοποιούνταν λαμβάνοντας δείγματα (1 mL) και μετρώντας την οπτική πυκνότητα με τη χρήση φωτόμετρου σε μήκος κύματος 600 nm [75].

Για την παρασκευή του στερεού υποστρώματος ανάπτυξης του βακτηρίου γινόταν προσθήκη ποσότητας άγαρ στο υγρό μέσο ανάπτυξης (§ 2.4) και αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 121°C για 20 *min* υπό πίεση 0,1 *mPa*. Το συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο χρησιμοποιούταν για την επίστρωση τρυβλίων, στα οποία αποχύνονταν ~25 *mL* θρεπτικού μέσου. Η επίστρωση πραγματοποιούταν όσο ακόμα το θρεπτικό μέσο ήταν ζεστό και στη συνέχεια αφηνόταν να στερεοποιηθεί.

2.6. Σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου με εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας

Για τη σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας των μικροφύκων. Το σύνολο της διαδικασίας παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.2. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν καλλιέργειες ηλικίας 10 ημερών, ώστε τα κύτταρα να βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους. Το σύνολο της καλλιέργειας φυγοκεντρούταν σε 4500 *rpm* για 10 *min* προς διαχωρισμό των κυττάρων από το εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας. Τα κύτταρα κατακρημνίζονταν και παραλαμβανόταν το άχρωμο υπερκείμενο εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας.



Εικόνα 2.2. Γραφική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας σύνθεσης AgNPs με εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας μικροφύκων (δημιουργήθηκε με BioRender.com)

Η σύνθεση των νανοσωματιδίων αργύρου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως πρόδρομη ένωση τον νιτρικό άργυρο (AgNO_3). Σε γυάλινο μπουκάλι αποστείρωσης γινόταν προσθήκη υπερκείμενου νερού μαζί με ένα μαγνητάκι ανάδευσης και ρυθμιζόταν το επιθυμητό *pH*, ώστε να αποφευχθούν σημαντικές διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Το νερό αποστειρώνονταν στο αυτόκαυστο

σε θερμοκρασία 121°C για 20 min υπό πίεση $0,1\text{ mPa}$ και αφηνόταν να φτάσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κατάλληλη ποσότητα νιτρικού αργύρου ζυγίζοταν με ακρίβεια τέταρτου δεκαδικού ψηφίου και ακολουθούσε η προσθήκη του στο υπερκάθαρο νερό υπό στείρες συνθήκες προς σχηματισμό διαυγούς διαλύματος νιτρικού αργύρου καθορισμένης συγκέντρωσης. Για την επίτευξη ομοιογένειας το διάλυμα αναδεύοταν για λίγα λεπτά σε πλάκα ανάδευσης. Το μπουκάλι αποστείρωσης με το διάλυμα σκεπαζόταν από τη στιγμή της προσθήκης του νιτρικού αργύρου, διότι πρόκειται για φωτοευαίσθητη ένωση και φυλασσόταν πάντα σε σκοτεινό μέρος.

Σε αποστειρωμένες φιάλες Erlenmeyer των 100 mL γινόταν προσθήκη του διαλύματος νιτρικού αργύρου και ακολούθως του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας σε τελικό όγκο 50 mL . Όλα τα σκεύη που χρησιμοποιούνταν ήταν αποστειρωμένα στο αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 121°C για 20 min υπό πίεση $0,1\text{ mPa}$ και η διαδικασία λάμβανε χώρα σε θάλαμο νηματικής ροής. Οι φιάλες πωματίζονταν με υδρόφοβο βαμβάκι και τοποθετούνταν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο υπό σταθερή θερμοκρασία και συνεχή ανάδευση για 24 h . Ένδειξη για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων αργύρου αποτελούσε η σταδιακή αλλαγή του χρώματος του διαλύματος από άχρωμο σε χάλκινο και τελικά σκούρο καφέ. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (15 min , 1 h , 3 h , 6 h και 24 h) και υπό στείρες συνθήκες λαμβάνονταν δείγματα των 2 mL , τα οποία φυγοκεντρώνταν για 5 min σε μικροφυγόκεντρο πάγκου. Τα νανοσωματίδια κατακρημνίζονταν, το υπερκείμενο υγρό απορριπτόταν και τα νανοσωματίδια επαναιωρούνταν σε ίση ποσότητα υπερκάθαρου νερού. Η διαδικασία της έκπλυσης επαναλαμβανόταν άλλες δύο φορές και έπειτα τα νανοσωματίδια επαναιωρούνταν σε 2 mL υπερκάθαρου νερού. Αυτά αποτελούσαν και τα τελικά δείγματα που στη συνέχεια αναλύονταν περαιτέρω με τις μεθόδους χαρακτηρισμού. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν δύο φορές.

2.7. Μελέτη συνθηκών σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου

Τα σχηματιζόμενα νανοσωματίδια αργύρου ενδεχομένως να διαφέρουν ως προς την ποσότητα, το σχήμα, το μέγεθος και άλλα χαρακτηριστικά που εξαρτώνται από μία πληθώρα παραμέτρων της σύνθεσης. Μερικοί από τους σημαντικότερους παράγοντες εξετάζονται στην παρούσα διπλωματική με στόχο τη βελτιστοποίηση της διεργασίας. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι η μέθοδος “ένας-παράγοντας-τη-φορά” (“one-factor-at-a-time” method). Επομένως, οι πειραματικές παράμετροι διερευνήθηκαν κατά μία τη φορά διατηρώντας τις υπόλοιπες σταθερές και όχι πολλαπλές ταυτόχρονα [76]. Οι σταθερές τιμές των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 2.7). Στις παρακάτω παραγράφους, περιγράφονται αναλυτικά οι παράγοντες που επιλέχθηκαν καθώς και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες διεξήχθησαν τα πειράματα.

Πίνακας 2.7. Σταθερές συνθήκες σύνθεσης AgNPs

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΣΥΝΘΗΚΗ
Μικροφύκος	<i>H. pluvialis</i>
Φως/Σκοτάδι	Φως
<i>pH</i>	8
T (°C)	25
Συγκέντρωση δ/τος <i>AgNO₃</i> (mM)	1
Αναλογία δ/τος <i>AgNO₃</i> /Εξ. υγρού καλ. (v/v)	90/10
Ανάδευση (rpm)	180 for 15 min & 80

2.7.1. Επιλογή μικροφύκους (Screening)

Υπήρχαν διαθέσιμα τέσσερα μικροφύκη, τα οποία μελετήθηκαν για τη δυνατότητα χρήσης του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας στη σύνθεση AgNPs. Αναλυτικά παρουσιάζονται οι συνθήκες σύνθεσης για την επιλογή μικροφύκους (Πίνακας 2.8).

Πίνακας 2.8. Συνθήκες σύνθεσης AgNPs για screening

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΣΥΝΘΗΚΗ
Μικροφύκος	<i>H. pluvialis</i> , <i>N. oceanica</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>S. almeriensis</i>
Φως/Σκοτάδι	Φως
<i>pH</i>	8
T (°C)	25
Συγκέντρωση δ/τος <i>AgNO₃</i> (mM)	1
Αναλογία δ/τος <i>AgNO₃</i> /Εξ. υγρού καλ. (v/v)	90/10
Ανάδευση (rpm)	180 for 15 min & 80

2.7.2. Επίδραση φωτός

Για ορισμένα είδη μικροφυκών η παρουσία φωτός ευνοεί τη σύνθεση των AgNPs, ενώ για άλλα ευνοϊκή είναι η απουσία φωτός. Συνεπώς, μελετήθηκε η επίδραση του φωτός πριν διερευνηθούν οι υπόλοιποι παράγοντες. Αναλυτικά παρουσιάζονται οι συνθήκες σύνθεσης των AgNPs (Πίνακας 2.9).

Πίνακας 2.9. Συνθήκες σύνθεσης AgNPs για τη μελέτη επίδρασης φωτός

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΣΥΝΘΗΚΗ
Μικροφύκος	<i>H. pluvialis</i>
Φως/Σκοτάδι	Φως, Σκοτάδι
<i>pH</i>	8
T (°C)	25
Συγκέντρωση δ/τος <i>AgNO₃</i> (mM)	1
Αναλογία δ/τος <i>AgNO₃</i> /Εξ. υγρού καλ. (v/v)	90/10
Ανάδευση (rpm)	180 for 15 min & 80

2.7.3. Επίδραση pH του διαλύματος *AgNO₃*

Το *pH* αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση των νανοσωματιδίων. Η τιμή του *pH* αφορά το υδατικό διάλυμα πριν την προσθήκη του νιτρικού αργύρου. Τόσο η προσθήκη του νιτρικού αργύρου όσο και του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας δεν επηρεάζουν σημαντικά την αρχική τιμή του *pH*. Αναλυτικά παρουσιάζονται οι συνθήκες σύνθεσης των AgNPs για τη μελέτη επίδρασης του pH του διαλύματος *AgNO₃* (Πίνακας 2.10).

Πίνακας 2.10. Συνθήκες σύνθεσης AgNPs για τη μελέτη επίδρασης pH

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΣΥΝΘΗΚΗ
Μικροφύκος	<i>H. pluvialis</i>
Φως/Σκοτάδι	Φως
<i>pH</i>	5, 7, 8, 9, 11
T (°C)	25
Συγκέντρωση δ/τος <i>AgNO₃</i> (mM)	1
Αναλογία δ/τος <i>AgNO₃</i> /Εξ. υγρού καλ. (v/v)	90/10
Ανάδευση (rpm)	180 for 15 min & 80

2.7.4. Επίδραση θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία είναι ένας ακόμα παράγοντας που επιδρά στη σύνθεση των AgNPs. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν θερμοκρασίες μεταξύ 25°C και 55°C. Αναλυτικά παρουσιάζονται οι συνθήκες σύνθεσης των AgNPs για τη μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας (Πίνακας 2.11).

Πίνακας 2.11. Συνθήκες σύνθεσης AgNPs για τη μελέτη επίδρασης θερμοκρασίας

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΣΥΝΘΗΚΗ
Μικροφύκος	<i>H. pluvialis</i>
Φως/Σκοτάδι	Φως
<i>pH</i>	8
<i>T (°C)</i>	25, 35, 45, 55
Συγκέντρωση δ/τος <i>AgNO₃</i> (<i>mM</i>)	1
Αναλογία δ/τος <i>AgNO₃</i> /Εξ. υγρού καλ. (<i>v/v</i>)	90/10
Ανάδευση (<i>rpm</i>)	180 for 15 min & 80

2.7.5. Επίδραση συγκέντρωσης του *AgNO₃* στο υδατικό διάλυμα

Χρησιμοποιώντας τον νιτρικό άργυρο ως πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση AgNPs καθίσταται σαφές ότι η συγκέντρωσή του στο υδατικό διάλυμα επηρεάζει τη σύνθεση. Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν κυμαίνονται μεταξύ 1 *mM* και 5 *mM*. Αναλυτικά παρουσιάζονται οι συνθήκες σύνθεσης των AgNPs για τη μελέτη επίδρασης της συγκέντρωσης διαλύματος *AgNO₃* (Πίνακας 2.12).

Πίνακας 2.12. Συνθήκες σύνθεσης AgNPs για τη μελέτη επίδρασης συγκέντρωσης διαλύματος *AgNO₃*

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΣΥΝΘΗΚΗ
Μικροφύκος	<i>H. pluvialis</i>
Φως/Σκοτάδι	Φως
<i>pH</i>	8
<i>T (°C)</i>	25
Συγκέντρωση δ/τος <i>AgNO₃</i> (<i>mM</i>)	1, 2, 3, 4, 5
Αναλογία δ/τος <i>AgNO₃</i> /Εξ. υγρού καλ. (<i>v/v</i>)	90/10
Ανάδευση (<i>rpm</i>)	180 for 15 min & 80

2.7.6. Επίδραση αναλογίας διαλύματος *AgNO₃*/εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας

Μία παράμετρος που επηρεάζει τη σύνθεση των AgNPs είναι και η αναλογία όγκων με την οποία αναμιγνύονται το διάλυμα του νιτρικού αργύρου με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας. Για τον σκοπό αυτό διερευνήθηκαν οι αναλογίες διαλύματος *AgNO₃*/εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας 95 / 5,

90 / 10, 85 / 15, 80 / 20 και 70 / 30 *v/v*. Αναλυτικά παρουσιάζονται οι συνθήκες σύνθεσης των AgNPs για τη μελέτη επίδρασης της αναλογίας διαλύματος $AgNO_3$ /εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας (Πίνακας 2.13).

Πίνακας 2.13. Συνθήκες σύνθεσης AgNPs για τη μελέτη επίδρασης αναλογίας διαλύματος $AgNO_3$ /εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΣΥΝΘΗΚΗ
Μικροφύκος	<i>H. pluvialis</i>
Φως/Σκοτάδι	Φως
<i>pH</i>	8
T (°C)	25
Συγκέντρωση δ/τος $AgNO_3$ (mM)	1
Αναλογία δ/τος $AgNO_3$ /Εξ. υγρού καλ. (<i>v/v</i>)	95/5, 90/10, 85/15, 80/20, 70/30
Ανάδευση (<i>rpm</i>)	180 for 15 min & 80

2.7.7. Επίδραση ανάδευσης

Ο παράγοντας της ανάδευσης είναι κι αυτός ένας από τους παράγοντες που επιλέχθηκε να εξεταστεί στην παρούσα εργασία λόγω της πιθανής επίδρασής του στη σύνθεση AgNPs. Οι συνθήκες ανάδευσης που μελετήθηκαν είναι: (A) ανάδευση σε 180 *rpm* για τα πρώτα 15 *min* της σύνθεσης και σε 80 *rpm* μέχρι το τέλος της σύνθεσης, (B) ανάδευση σε 180 *rpm* για τα πρώτα 15 *min* και χωρίς ανάδευση μέχρι το τέλος της σύνθεσης, (C) χωρίς ανάδευση και (D) ανάδευση σε 180 *rpm* καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης. Αναλυτικά παρουσιάζονται οι συνθήκες σύνθεσης των AgNPs για τη μελέτη επίδρασης της ανάδευσης (Πίνακας 2.14).

Πίνακας 2.14. Συνθήκες σύνθεσης AgNPs για τη μελέτη επίδρασης ανάδευσης

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΣΥΝΘΗΚΗ
Μικροφύκος	<i>H. pluvialis</i>
Φως/Σκοτάδι	Φως
<i>pH</i>	8
T (°C)	25
Συγκέντρωση δ/τος $AgNO_3$ (mM)	1
Αναλογία δ/τος $AgNO_3$ /Εξ. υγρού καλ. (<i>v/v</i>)	90/10

Ανάδευση (*rpm*)

(A) 180 for 15 min & 80

(B) 180 for 15 min & 0

(C) 0

(D) 180

2.8. Σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου με αλκοολικό εκχύλισμα κυττάρων

Για τη σύνθεση AgNPs δοκιμάστηκε να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη και αλκοολικό εκχύλισμα κυττάρων του μικροφύκου *H. pluvialis* αντί για εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας. Σε αυτή την περίπτωση κύτταρα του μικροφύκου που είχαν αποθηκευτεί στην κατάψυξη, ξηράνθηκαν με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης (freeze drying) προς απομάκρυνση της υγρασίας. Μετά από 24 h τα ξηρά πλέον κύτταρα ζυγίστηκαν, προστέθηκε αιθανόλη 95% *v/v* σε αναλογία 1 g/10 mL και τοποθετήκαν σε ανακινούμενο επωαστήρα για 24 h. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 20 min σε μικροφυγόκεντρο πάγκου και παραλήφθηκε το υπερκείμενο υγρό. Το εκχύλισμα αυτό χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τη σύνθεση των AgNPs [77].

Η παρασκευή του διαλύματος νιτρικού αργύρου καθώς και η πειραματική διαδικασία της σύνθεσης των AgNPs μέχρι την παραλαβή των τελικών δειγμάτων είναι ακριβώς ίδια με αυτή που περιγράφηκε στην περίπτωση του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας (§ 2.6) με μόνη διαφορά τη χρήση του αλκοολικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα του μικροφύκου αντί του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας. Αναλυτικά παρουσιάζονται οι συνθήκες σύνθεσης των AgNPs για τη μελέτη σύνθεσης AgNPs με αλκοολικό εκχύλισμα κυττάρων (Πίνακας 2.15).

Πίνακας 2.15. Συνθήκες σύνθεσης AgNPs για τη μελέτη σύνθεσης AgNPs με αλκοολικό εκχύλισμα κυττάρων

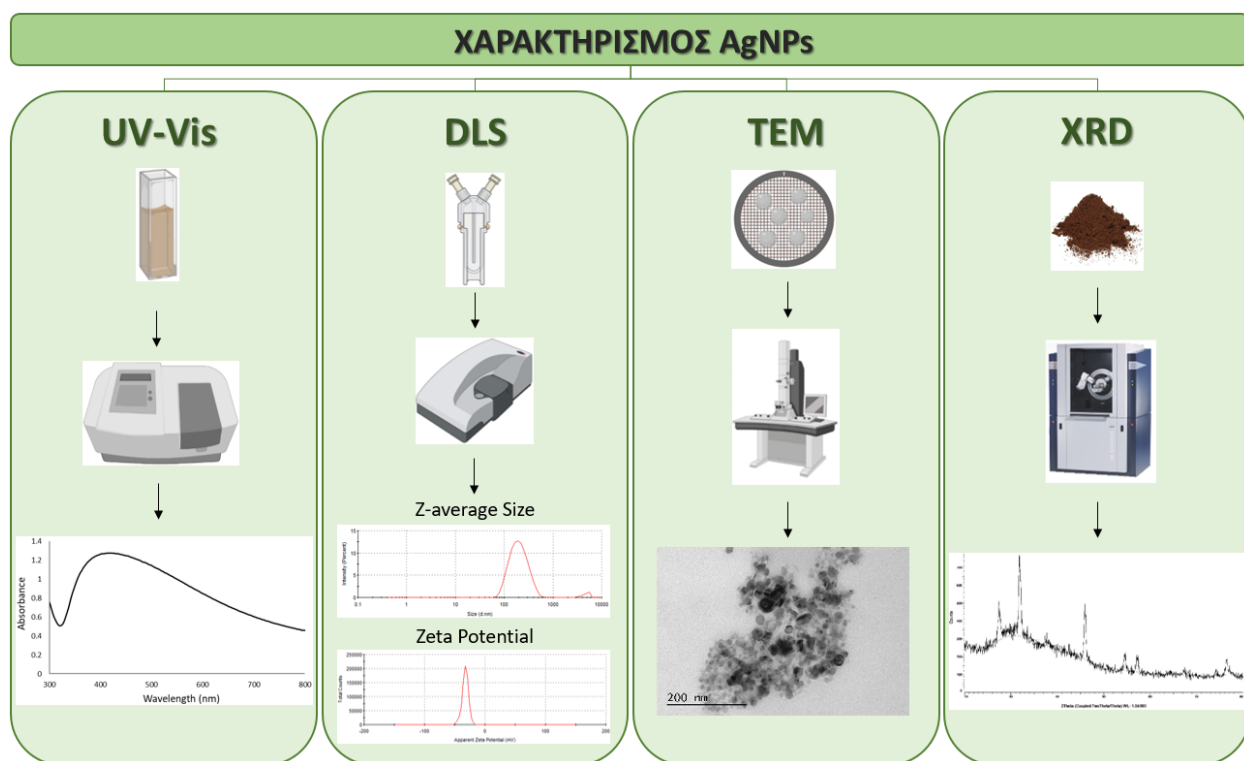
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΣΥΝΘΗΚΗ
Στέλεχος	<i>H. pluvialis</i>
Μέθοδος	Αλκοολικό εκχύλισμα κυττάρων
Φως/Σκοτάδι	Φως
pH	8
T (°C)	25
Συγκέντρωση δ/τος $AgNO_3$ (mM)	1
Αναλογία δ/τος $AgNO_3$ /Εξ. υγρού καλ. (<i>v/v</i>)	90/10
Ανάδευση (<i>rpm</i>)	180 for 15 min & 80

2.9. Μελέτη σταθερότητας νανοσωματιδίων αργύρου

Πέρα από τις παραμέτρους που επηρεάζουν τη σύνθεση των AgNPs, μελετήθηκε και η σταθερότητα των νανοσωματιδίων με την πάροδο του χρόνου. Στόχος ήταν ο προσδιορισμός του χρονικού διαστήματος μετά τη σύνθεση κατά το οποίο τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων διατηρούνται σχεδόν αναλλοίωτα, καθιστώντας τα κατάλληλα προς εφαρμογή. Η σταθερότητα των νανοσωματιδίων εξετάστηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στους $4^{\circ}C$ για διάστημα δύο μηνών. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (7, 21, 35 και 60 ημέρες) λαμβάνονταν δείγματα και καταγραφόταν το φάσμα UV-Vis.

2.10. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων αργύρου

Για τον χαρακτηρισμό των AgNPs χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις μέθοδοι και συγκεκριμένα φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), δυναμική σκέδαση φωτός (DLS), ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM) και περιθλασιομετρία ακτίνων-X (XRD) (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3. Μέθοδοι χαρακτηρισμού AgNPs

2.10.1. Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Τα τελικά δείγματα των 2 mL από τις διάφορες συνθήκες σύνθεσης τοποθετούνταν σε λουτρό υπερήχων ώστε να διαρρηχθούν συσσωματώματα που πιθανόν είχαν σχηματιστεί. Από το κάθε δείγμα λαμβανόταν 1 mL, τοποθετούταν σε ειδική κυψελίδα UV-Vis και καταγραφόταν το φάσμα UV-Vis. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιούταν υπερκάθαρο νερό. Τα φάσματα UV-Vis λαμβάνονταν με τη χρήση φασματοφωτόμετρου UV-Vis σε εύρος μέτρησης μήκους κύματος μεταξύ 300 και 800 nm με δειγματοληψία σε διαστήματα του 1 nm και ταχύτητα σάρωσης 200 nm/min. Τα AgNPs εμφανίζουν ζώνη SPR με κορυφή συνήθως στα 400 – 450 nm [26], [31].

2.10.2. Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)

Τα τελικά δείγματα των 2 mL από τις διάφορες συνθήκες σύνθεσης σε χρόνο δειγματοληψίας 24 h τοποθετούνταν σε λουτρό υπερήχων ώστε να διαρρηχθούν συσσωματώματα που πιθανόν είχαν σχηματιστεί. Στη συνέχεια, πραγματοποιούταν αραιώση των δειγμάτων με υπερκάθαρο νερό και μέτρηση της απορρόφησή τους στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 633 nm, το οποίο είναι το μήκος κύματος του λέιζερ του οργάνου DLS. Ακολουθούσε καλή ανάδευση του διαλύματος και το δείγμα τοποθετούταν σε ειδική κυψελίδα (κυψελίδα DTS1070). Πραγματοποιούνταν μετρήσεις για τον προσδιορισμό του μεγέθους (size) των AgNPs και τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού τους (z-potential). Σε κάθε περίπτωση λαμβάνονταν τρεις μετρήσεις σε θερμοκρασία 25°C και προέκυπτε ο μέσος όρος.

2.10.3. Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM)

Η ανάλυση του δείγματος AgNPs πραγματοποιήθηκε με το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διερχόμενης Δέσμης Ηλεκτρονίων υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRTEM) της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών ΕΜΠ, δυναμικού επιτάχυνσης ηλεκτρονίων 200 kV. Πριν την ανάλυση, το υπό μελέτη δείγμα (~0,2 mL) αραιώθηκε σε υπερκάθαρο νερό. Μία σταγόνα από το αραιωμένο δείγμα AgNPs εναποτέθηκε πάνω σε χάλκινο δακτύλιο με πλέγμα 300 mesh και επίστρωση άνθρακα (300 mesh carbon coated copper grid) και αφέθηκε να στεγνώσει για ένα βράδυ (overnight).

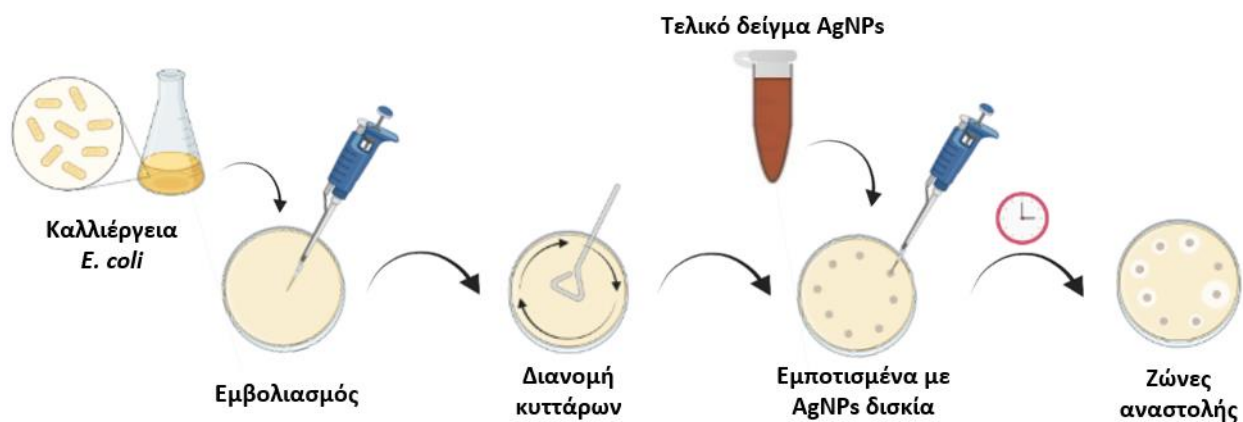
2.10.4. Περιθλασιομετρία ακτίνων-X (XRD)

Για τον προσδιορισμό των κρυσταλλικών φάσεων και της καθαρότητας των AgNPs χρησιμοποιήθηκε περιθλασίμετρο ακτίνων-X με πηγή ακτινοβολίας Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), τάση λειτουργίας 40 kV και

ρεύμα λειτουργίας 40 mA. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε εύρος γωνιών 2θ από 20° μέχρι 80° με βήμα $0,05^\circ$ και με χρόνο βήματος 1 s. Το δείγμα που μελετήθηκε ήταν από AgNPs που είχαν λυοφιλωθεί και η σκόνη που παραλήφθηκε ήταν ~ 20 mg, μέρος της οποίας τοποθετήθηκε στον ειδικό για περιθλασίμετρα ακτίνων-Χ δειγματοφορέα και κατόπιν στο όργανο προς μέτρηση.

2.11. Έλεγχος αντιβακτηριακών ιδιοτήτων νανοσωματιδίων αργύρου

Η μελέτη των αντιβακτηριακών ιδιοτήτων των AgNPs πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο διάχυσης δίσκου (Disc Diffusion Method) ενάντια σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* (Εικόνα 2.4). Αρχικά, υγρή καλλιέργεια *E. coli* (§ 2.5.4) αραιωνόταν σε συγκέντρωση κυττάρων ίση με 10^6 κύτταρα/mL [78] και 100 μ L εμβολιάζονταν σε κάθε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο. Αποστειρωμένα δισκία διαμέτρου 5 mm από φίλτρο Whatman No.1 εμποτίζονταν με 50 μ L τελικού δείγματος AgNPs. Τα δείγματα είχαν τοποθετηθεί νωρίτερα σε λουτρό υπερήχων ώστε να διαρρηχθούν συσσωματώματα που πιθανόν είχαν σχηματιστεί, καθώς για να εισχωρήσουν τα AgNPs στις κυτταρικές μεμβράνες απαιτείται να έχουν μικρό μέγεθος. Τα εμποτισμένα δισκία αφήνονταν να στεγνώσουν και τοποθετούνταν προσεκτικά στην επιφάνεια του στερεού θρεπτικού μέσου. Επιπλέον, ως τυφλά δείγματα σε κάθε τρυβλίο χρησιμοποιούνταν δύο δισκία εμποτισμένα το ένα με 50 μ L εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκους και το άλλο με 50 μ L διαλύματος νιτρικού αργύρου συγκέντρωσης 1 mM. Όλα τα σκεύη, τα εργαλεία και το υπερκάθαρο νερό, των οποίων γινόταν χρήση, ήταν αποστειρωμένα στο αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 121°C για 20 min υπό πίεση 0,1 MPa και η διαδικασία λάμβανε χώρα σε θάλαμο νηματικής ροής. Τα τρυβλία επωάζονταν σε θερμοκρασία 37°C για ~ 20 h. Η αντιβακτηριακή δράση των AgNPs εκτιμήθηκε μόνο ποιοτικά με οπτική παρατήρηση της ύπαρξης ζώνης αναστολής και της διαμέτρου της, συγκρίνοντας την επίδραση κάθε συνθήκης που μελετήθηκε.



Εικόνα 2.4. Μέθοδος διάχυσης δίσκου (δημιουργήθηκε με BioRender.com)

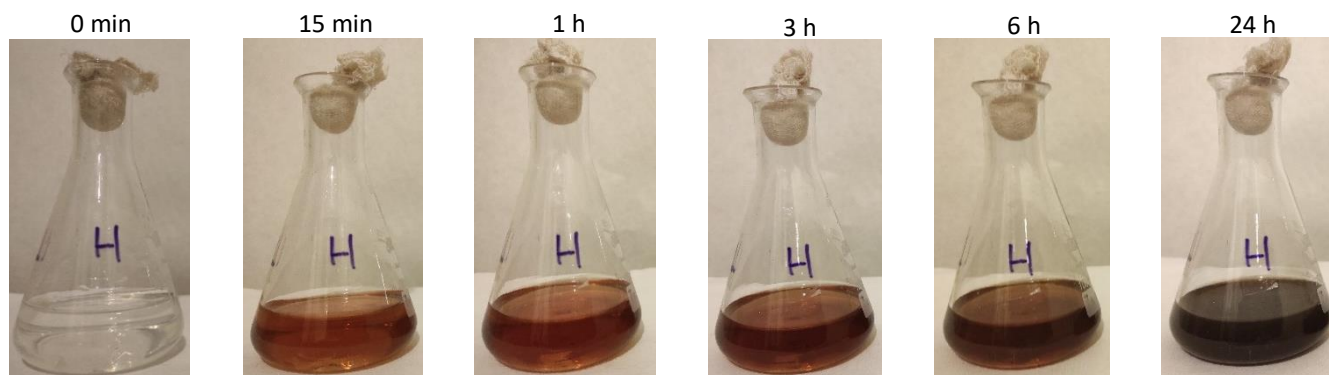
The background features a series of fluid, overlapping green lines that flow from the top left towards the bottom right. The lines vary in opacity and color, ranging from a vibrant lime green to a soft, pale green, creating a sense of movement and depth. The overall aesthetic is clean and modern.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:
Αποτελέσματα και Συζήτηση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1. Σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου και ανάλυση UV-Vis φασματοφωτομετρίας

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία επιτεύχθηκε η σύνθεση AgNPs με τη χρήση του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis*. Τα βιομόρια που υπάρχουν στο εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας ανάγουν τα ιόντα αργύρου (Ag^+), που προέρχονται από τη διάσταση του νιτρικού αργύρου ($AgNO_3$) στο νερό, προς σχηματισμό ελεύθερων μεταλλικών ατόμων αργύρου (Ag^0). Ο ρόλος των βιομορίων είναι διττός, καθώς δρουν και ως σταθεροποιητικοί παράγοντες. Η σταθεροποίηση των διεσπαρμένων νανοσωματιδίων επιτυγχάνεται με τη δημιουργία ενός *capping* γύρω από αυτά κατά τη διάρκεια της σύνθεσης, όταν τα βιομόρια προσδένονται στην επιφάνεια του αργύρου, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη συσσωμάτωση [67]. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη παραγόντων που επηρεάζουν τη σύνθεση των νανοσωματιδίων, όπως (α) η παρουσία/απουσία φωτός κατά τη διάρκεια της σύνθεσης, (β) το *pH* του υδατικού διαλύματος νιτρικού αργύρου, (γ) η θερμοκρασία σύνθεσης, (δ) η συγκέντρωση του νιτρικού αργύρου στο υδατικό διάλυμα, (ε) η κατ' όγκο αναλογία του διαλύματος νιτρικού αργύρου με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας και (στ) η ανάδευση. Για όλους τους παράγοντες η ανάλυση ήταν χρονικά εξαρτώμενη με χρόνους δειγματοληψίας στα 15 min, τη 1 h, τις 3 h, τις 6 h και τις 24 h. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι γενικά η σύνθεση είναι πιο αποτελεσματική σε μεγαλύτερους χρόνους. Πρώτη ένδειξη για τον σχηματισμό AgNPs μετά την προσθήκη του χρησιμοποιούμενου αναγωγικού μέσου στο υδατικό διάλυμα νιτρικού αργύρου είναι η αλλαγή του χρώματος του διαλύματος από άχρωμο διαυγές σταδιακά σε χάλκινο και τελικά σε σκούρο καφέ (Εικόνα 3.1). Η αλλαγή αυτή υποδεικνύει την αναγωγή των κατιόντων αργύρου σε ελεύθερα μεταλλικά άτομα αργύρου και πιστοποιεί τη σύνθεση των νανοσωματιδίων [79]. Η σύνθεσή τους επιβεβαιώνεται με φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού αναμένοντας στα φάσματα να εμφανίζεται η χαρακτηριστική για τα AgNPs ζώνη SPR με κορυφή συνήθως στα 400 –



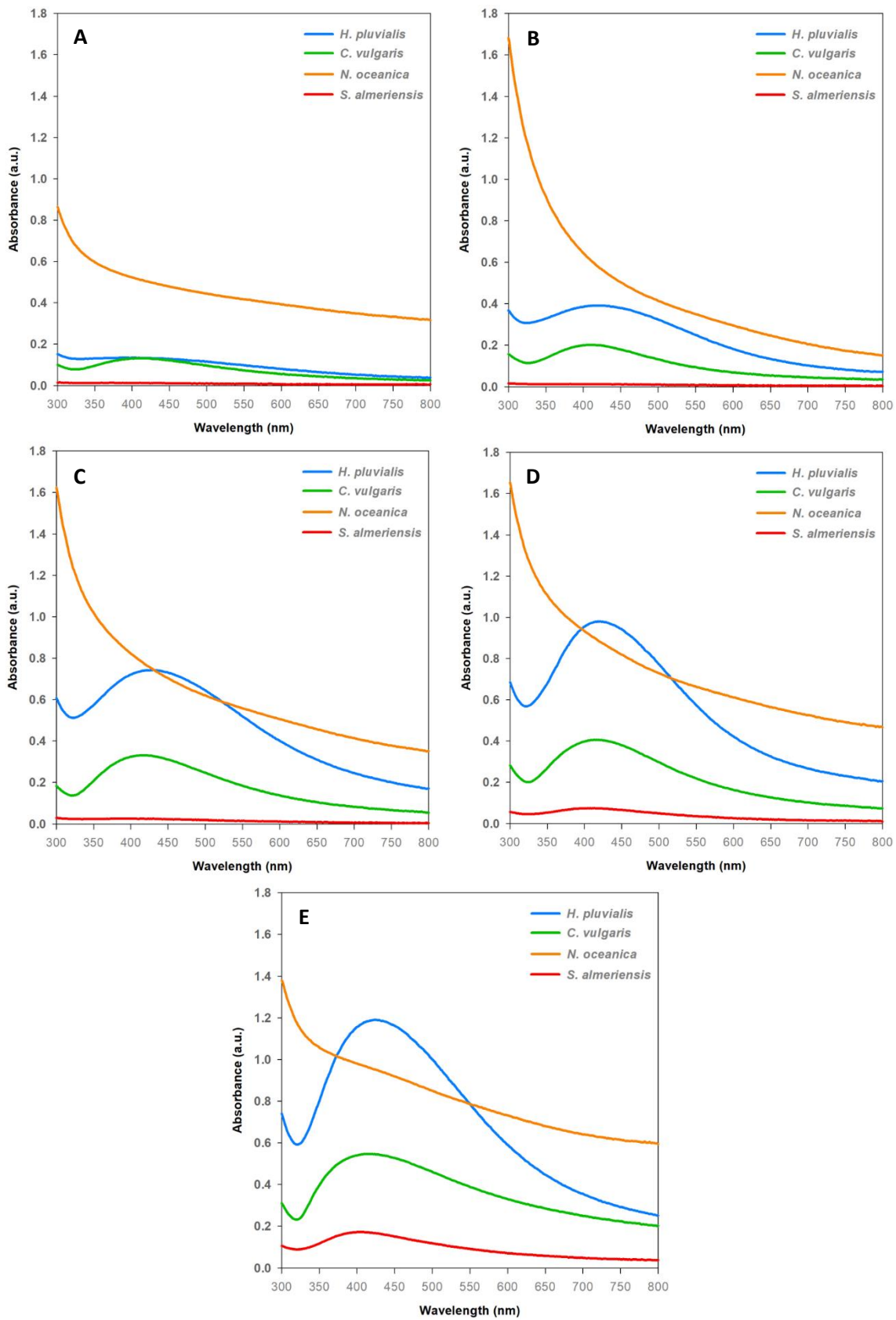
Εικόνα 3.1. Σταδιακή μεταβολή του χρώματος του διαλύματος από διάφανο σε χάλκινο και τελικά σε σκούρο καφέ μετά από 24 h που πιστοποιεί τη σύνθεση των AgNPs

450 nm. Από την τιμή της μέγιστης απορρόφησης, το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης (λ_{max}) και το εύρος της ζώνης μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τα χαρακτηριστικά των σχηματισμένων AgNPs και κατ' επέκταση για την επίδραση κάθε εξεταζόμενου παράγοντα στη σύνθεση. Στις επόμενες παραγράφους παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα για κάθε παράγοντα.

3.1.1. Επιλογή μικροφύκους

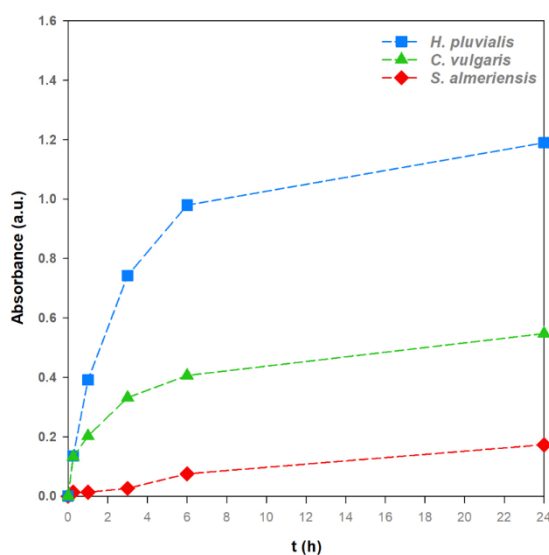
Χρησιμοποιήθηκε το εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας των μικροφυκών *H. pluvialis* CCAP34/6, *N. oceanica* CCMP1779, *C. vulgaris* UTEX 1809 και *S. almeriensis*. Οι συνθήκες σύνθεσης ήταν ίδιες για όλα τα μικροφύκη (§ 2.7.1). Από τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis (Διάγραμμα 3.1) διαπιστώνεται ότι η σύνθεση AgNPs με τη χρήση του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου *N. oceanica* CCMP1779 δεν είναι εφικτή, καθώς δεν εμφανίζεται η χαρακτηριστική για τα AgNPs ζώνη SPR καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης. Μάλιστα, η παρατήρηση της μεταβολής του χρώματος του διαλύματος από διάφανο προς γκρι και όχι προς καφέ, όπως στις υπόλοιπες περιπτώσεις, αποτέλεσε μία πρώτη ένδειξη της διαφορετικής συμπεριφοράς του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του *N. oceanica* CCMP1779 σε σχέση με τα υπόλοιπα μικροφύκη κατά τη διάρκεια της σύνθεσης, πριν τη λήψη των φασμάτων. Για τα άλλα τρία μικροφύκη εμφανίζεται η χαρακτηριστική ζώνη SPR, για το *H. pluvialis* και το *C. vulgaris* ήδη από τα πρώτα 15 min ενώ για το *S. almeriensis* είναι ευδιάκριτη μετά τις 3 h (Διάγραμμα 3.1). Με την πάροδο του χρόνου η μέγιστη απορρόφηση αυξάνεται και στις 24 h φτάνει στην τιμή 1,190 για το *H. pluvialis*, στην τιμή 0,547 για το *C. vulgaris*, και στην τιμή 0,173 για το στέλεχος *S. almeriensis*. Κάθε χρονική στιγμή η μέγιστη απορρόφηση είναι μεγαλύτερη για το στέλεχος *H. pluvialis* και μικρότερη για το στέλεχος *S. almeriensis*. Επιπλέον, η αύξηση της μέγιστης απορρόφησης για το *H. pluvialis* είναι σχεδόν γραμμική για μικρούς χρόνους (μέχρι 6 h), ενώ σε μεγαλύτερους χρόνους συνεχίζει να αυξάνεται με πολύ μικρότερο ρυθμό παρουσιάζοντας μία τάση σταθεροποίησης και σχηματισμού πλατό (Διάγραμμα 3.2). Φαίνεται, λοιπόν, ότι το μεγαλύτερο μέρος της σύνθεσης πραγματοποιείται μέσα στις πρώτες 6 h. Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν προκύψει και από τη χρήση εκχυλίσματος φύλλων *Piper pedicellatum* για τη σύνθεση AgNPs [80]. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και για το *C. vulgaris*, ενώ το *S. almeriensis* παρουσιάζει γραμμική αύξηση με το χρόνο (Διάγραμμα 3.2). Συνεπώς, φαίνεται ότι με τη χρήση του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας από το *H. pluvialis* συντίθεται μεγαλύτερη ποσότητα AgNPs σε μικρότερους χρόνους συγκριτικά με τα *C. vulgaris* και *S. almeriensis*, αλλά και με άλλα μικροφύκη που έχουν μελετηθεί, όπως το *Oscillatoria limnetica* [81] καθώς και άλλα είδη *Chlorella* [69].

Από τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis είναι δυνατό να εξαχθούν και ορισμένα αρχικά συμπεράσματα σχετικά με το σχήμα, το μέγεθος και την ομοιογένεια των AgNPs. Και για τα τρία μικροφύκη η μέγιστη απορρόφηση της χαρακτηριστικής ζώνης SPR παρουσιάζεται μεταξύ 400 – 430 nm καθ' όλη τη διάρκεια



Διάγραμμα 3.1. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των AgNPs συντεθειμένων με τα διαφορετικά μικροφύκη μετά από χρόνο σύνθεσης (A) 15 min (B) 1 h (C) 3 h (D) 6 h και (E) 24 h

της σύνθεσης. Η εμφάνιση μέγιστης απορρόφησης σε αυτά τα μήκη κύματος είναι ενδεικτική του σφαιρικού σχήματος των AgNPs. Θεωρητικά έχει προβλεφθεί ότι τα σφαιρικά νανοσωματίδια εμφανίζουν μία κορυφή SPR σε εύρος 400 – 490 nm [82], το οποίο έχει αποδειχθεί και από πολλές μελέτες που έχουν δείξει ότι παρουσιάζουν μέγιστο συνήθως μεταξύ 420 και 450 nm [83]. Ακόμα, έχει παρατηρηθεί ότι μία κορυφή SPR σε εύρος 410 – 440 nm αφορά μεταλλικά νανοσωματίδια με μεγέθη από 2 έως 100 nm [84], [85]. Στο εύρος αυτό βρίσκονται και τα AgNPs που προέκυψαν από τις συνθέσεις με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας από τα τρία μικροφύκη, οπότε το μέγεθός τους αναμένεται να είναι μικρότερο από 100 nm. Όσον αφορά την ομοιογένεια των νανοσωματιδίων, αυτή σχετίζεται με το εύρος της χαρακτηριστικής ζώνης SPR, καθώς όσο μικρότερο είναι το εύρος της τόσο μεγαλύτερη είναι η ομοιογένεια που παρουσιάζουν [83]. Από τα φάσματα (Διάγραμμα 3.1) παρατηρείται ότι το πλάτος της ζώνης είναι στενό υποδεικνύοντας την καλή ομοιογένεια των AgNPs. Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου αυξάνεται το πλάτος της, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα Π.Α.1, υποδηλώνοντας ότι αυξάνεται παράλληλα και η ετερογένεια των AgNPs.



Διάγραμμα 3.2. Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των συνθεσιμμένων AgNPs σε συνάρτηση με τον χρόνο για τα διαφορετικά μικροφύκη

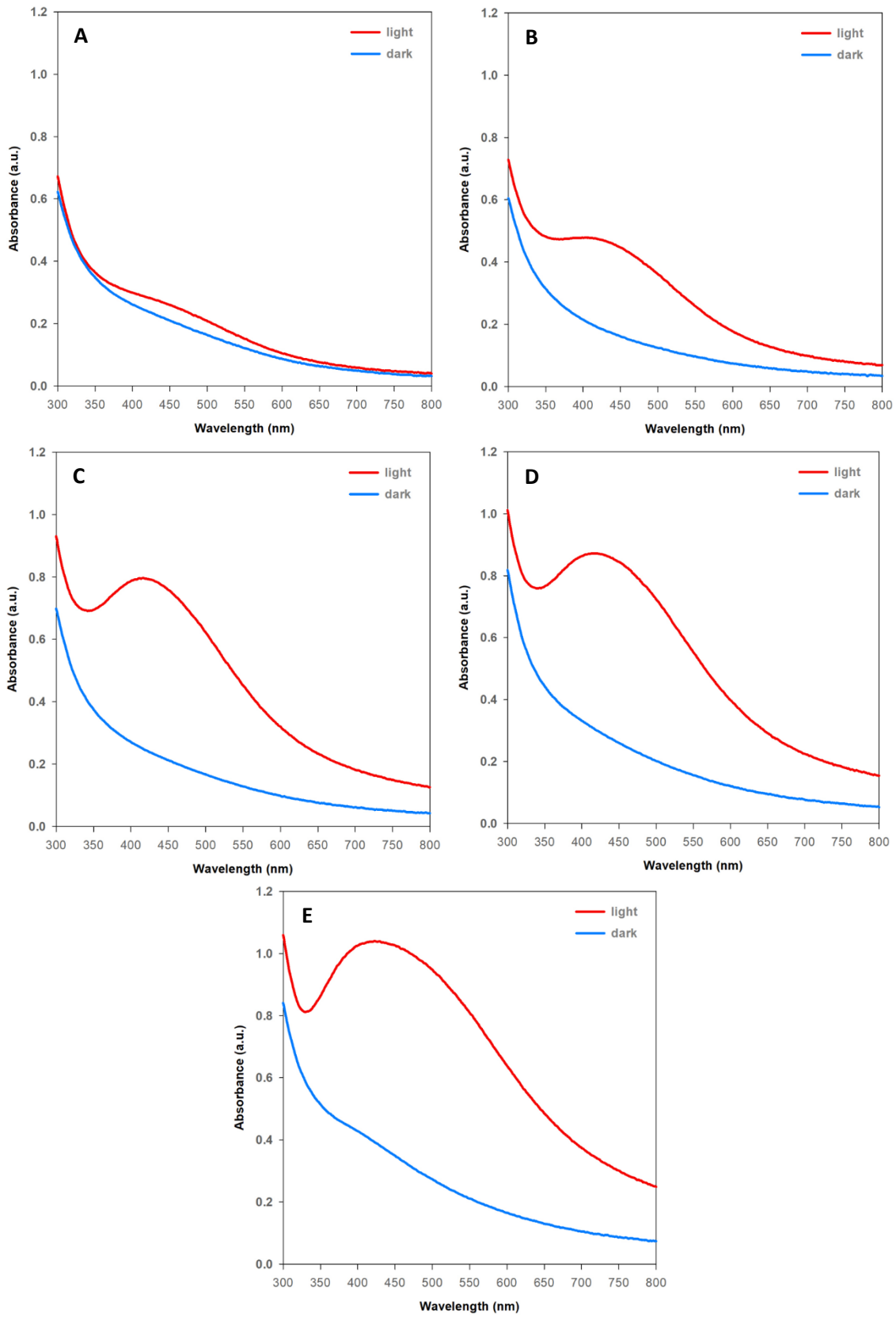
Συνοψίζοντας, επιτεύχθηκε η σύνθεση AgNPs με τη χρήση εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας των μικροφυκών *H. pluvialis*, *C. vulgaris* και *S. almeriensis*, αλλά όχι του *N. oceanica*. Τα AgNPs που σχηματίστηκαν αναμένεται να είναι σφαιρικά, μεγέθους μικρότερο από 100 nm και με καλή ομοιογένεια. Η διαπίστωση ότι με το μικροφύκος *H. pluvialis* συντίθεται μεγαλύτερη ποσότητα σε μικρότερους χρόνους συγκριτικά με τα άλλα δύο μικροφύκη, το καθιστά αρκετά ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη.

3.1.2. Επίδραση φωτός

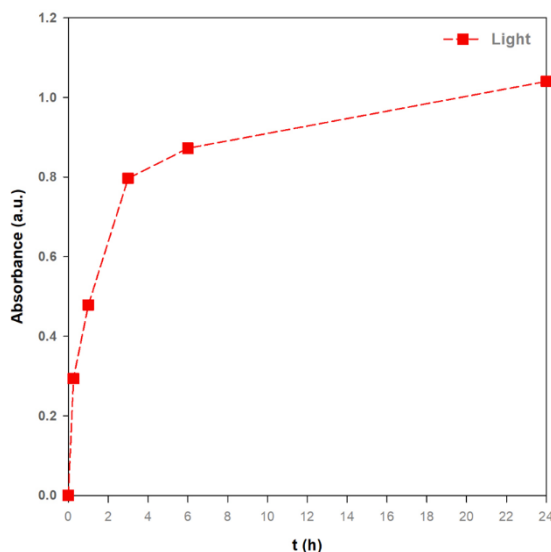
Η μελέτη της επίδρασης του φωτός στη σύνθεση των AgNPs με τη χρήση του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* αφορούσε στη συνεχή έκθεση του μίγματος σύνθεσης στο φως και στη σύνθεση απουσία φωτός (σκοτάδι). Από τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis διαπιστώνεται ότι για τη συνθήκη απουσίας φωτός δεν εμφανίζεται η χαρακτηριστική για τα AgNPs ζώνη SPR καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης (Διάγραμμα 3.3) υποδεικνύοντας ότι δεν είναι εφικτή η σύνθεση σε αυτή τη συνθήκη τουλάχιστον στον χρόνο που μελετάται (24 h). Μάλιστα, η παρατήρηση της μεταβολής του χρώματος του διαλύματος από διάφανο προς υποκίτρινο και όχι προς καφέ αποτέλεσε μία πρώτη ένδειξη της μη σύνθεσης νανοσωματιδίων, πριν τη λήψη των φασμάτων. Αντιθέτως, για τη συνθήκη της παρουσίας φωτός εμφανίζεται η χαρακτηριστική ζώνη SPR και είναι ευδιάκριτη ήδη από τη πρώτη μία ώρα (Διάγραμμα 3.3). Με την πάροδο του χρόνου η μέγιστη απορρόφηση αυξάνεται και στις 24 h φτάνει στην τιμή 1,041, με την αύξηση σε μικρούς χρόνους να είναι σχεδόν γραμμική (μέχρι 3 h), ενώ σε μεγαλύτερους χρόνους συνεχίζει να αυξάνεται με πολύ μικρότερο ρυθμό παρουσιάζοντας μία τάση σταθεροποίησης και σχηματισμού πλατό (Διάγραμμα 3.4). Φαίνεται, λοιπόν, ότι το μεγαλύτερο μέρος της σύνθεσης πραγματοποιείται μέσα στις πρώτες 3 – 6 h, όπως διαπιστώθηκε και στην περίπτωση μελέτης επιλογής του μικροφύκου (§ 3.1.1).

Καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης η κορυφή SPR παρουσιάζεται μεταξύ 400 και 430 nm, υποδεικνύοντας ότι το σχήμα των AgNPs αναμένεται να είναι σφαιρικό και το μέγεθός τους μικρότερο από 100 nm. Η τάση αύξησης του λ_{max} αποτελεί μία ένδειξη ότι με την πάροδο του χρόνου το μέγεθος των νανοσωματιδίων τείνει να αυξάνεται ή ενδεχομένως και να δημιουργούνται συσσωματώματα. Επιπλέον, από τα φάσματα συμπεραίνεται ότι τα νανοσωματίδια είναι ομοιογενή (Διάγραμμα 3.3), αν και με την πάροδο του χρόνου το εύρος της ζώνης SPR αυξάνεται, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα Π.Α.2, υποδηλώνοντας ότι αυξάνεται παράλληλα και η ετερογένεια των AgNPs.

Επομένως, η σύνθεση AgNPs με τη χρήση εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* ευνοείται από την παρουσία φωτός. Τα σχηματιζόμενα νανοσωματίδια αναμένεται να έχουν σφαιρικό σχήμα, μέγεθος μικρότερο από 100 nm και καλή ομοιογένεια. Για τον λόγο αυτό, τα ακόλουθα πειράματα μελέτης επίδρασης άλλων παραγόντων διεξήχθησαν μόνο σε συνθήκες παρουσίας φωτός. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες, όπως στην περίπτωση του μικροφύκου *Dunaliella salina* που η παρουσία φωτός εμφάνισε υψηλότερη αποτελεσματικότητα σύνθεσης AgNPs [86] και στην περίπτωση του πράσινου φύκου *Neochloris oleoabundans* που αποδείχτηκε ότι η σύνθεση εξαρτάται από την παρουσία φωτός [87].



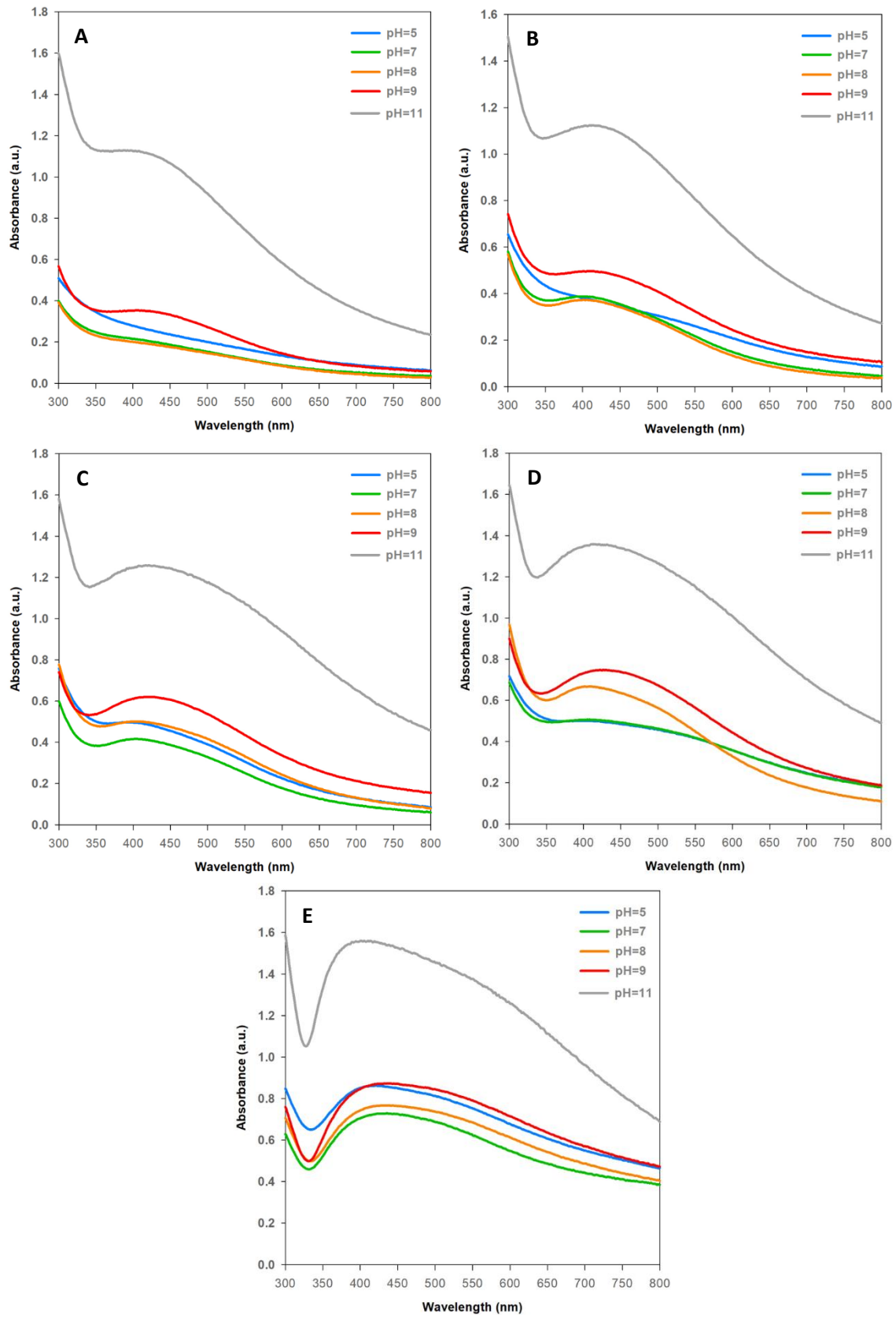
Διάγραμμα 3.3. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των AgNPs συντεθειμένων σε συνθήκες φωτός και σκοταδιού μετά από χρόνο σύνθεσης (A) 15 min (B) 1 h (C) 3 h (D) 6 h και (E) 24 h



Διάγραμμα 3.4. Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των συνθεσιμένων AgNPs σε συνάρτηση με τον χρόνο για τη συνθήκη του φωτός

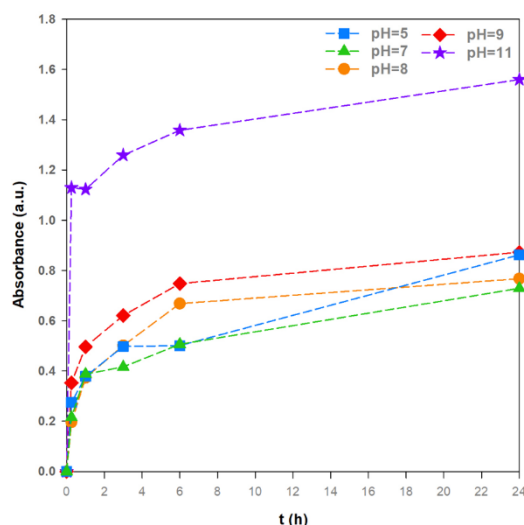
3.1.3. Επίδραση pH του διαλύματος AgNO₃

Το pH του μέσου σύνθεσης αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος και το σχήμα των νανοσωματιδίων, γιατί το ηλεκτρικό φορτίο των βιομορίων που λειτουργούν ως αναγωγικοί και σταθεροποιητικοί παράγοντες αλλάζει σημαντικά σε διαφορετικές συνθήκες pH μεταβάλλοντας την ικανότητά τους να ανάγουν τα μεταλλικά ιόντα και να προσδένονται στην επιφάνεια του αργύρου [88], [89]. Από τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis διαπιστώνεται ότι για όλες τις τιμές pH εμφανίζεται η χαρακτηριστική για τα AgNPs ζώνη SPR και είναι ευδιάκριτη ήδη από τα πρώτα 15 min για τις τιμές pH = 9 και pH = 11, στη 1 h σύνθεσης για τις τιμές pH = 7 και pH = 8 και στις 24 h για την τιμή pH = 5 (Διάγραμμα 3.5). Με την πάροδο του χρόνου η μέγιστη απορρόφηση αυξάνεται για όλες τις τιμές pH και στις 24 h φτάνει στην τιμή 0,862 για pH = 5, στην τιμή 0,729 για pH = 7, στην τιμή 0,767 για pH = 8, στην τιμή 0,873 για pH = 9 και στην τιμή 1,560 για pH = 11. Καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης τα καλύτερα αποτελέσματα εμφανίζονται για pH = 11 με το φάσμα απορρόφησης να παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερες τιμές συγκριτικά με τις υπόλοιπες τιμές pH και μέγιστη τιμή στις 24 h. Μάλιστα, η παρατήρηση της μεταβολής του χρώματος του διαλύματος από διάφανο προς θολό γκρι-καφέ (και όχι έντονο καφέ) αποτέλεσε μία πρώτη ένδειξη διαφοροποίησης της περίπτωσης του pH = 11, πριν τη λήψη των φασμάτων. Επιπλέον, στις 24 h δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των τεσσάρων μικρότερων pH (Διάγραμμα 3.5). Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι υψηλότερη απόδοση σύνθεσης AgNPs εμφανίζουν τα βασικά pH, με σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα για pH = 11 και ακολούθως για pH = 9. Τα υψηλά pH, σύμφωνα και με άλλες μελέτες, επιταχύνουν τον ρυθμό



Διάγραμμα 3.5. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των AgNPs συντεθειμένων σε διαφορετικά pH μετά από χρόνο σύνθεσης (A) 15 min (B) 1 h (C) 3 h (D) 6 h και (E) 24 h

αναγωγής των μεταλλικών ιόντων λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων λειτουργικών ομάδων, όπως οι καρβοξυλομάδες, και των θετικά φορτισμένων ιόντων αργύρου [90], [91]. Επιπλέον, σε όλες τις περιπτώσεις η αύξηση της μέγιστης απορρόφησης σε μικρούς χρόνους είναι σχεδόν γραμμική (μέχρι 6 h), ενώ σε μεγαλύτερους χρόνους συνεχίζει να αυξάνεται με μικρότερο ρυθμό παρουσιάζοντας μία τάση σταθεροποίησης, υποδεικνύοντας ότι το μεγαλύτερο μέρος της σύνθεσης πραγματοποιείται στις πρώτες 6 h για όλες τις τιμές pH (Διάγραμμα 3.6).



Διάγραμμα 3.6. Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των συνθετιμένων AgNPs σε συνάρτηση με τον χρόνο για τα διαφορετικά pH

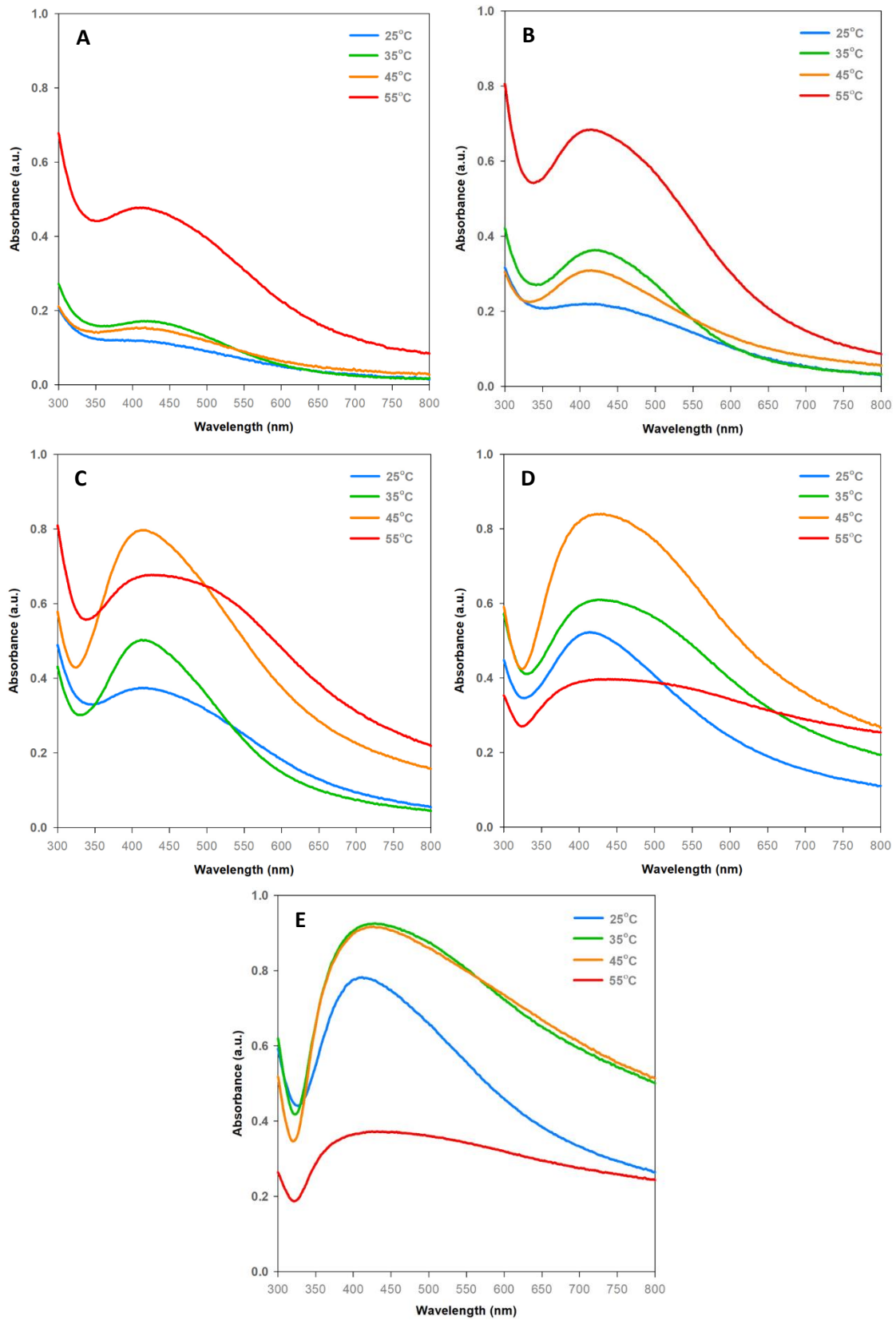
Σε όλες τις εξετασθείσες συνθήκες η κορυφή SPR παρουσιάζεται μεταξύ 400 και 440 nm, υποδεικνύοντας ότι το σχήμα των AgNPs αναμένεται να είναι σφαιρικό και το μέγεθός τους μικρότερο από 100 nm. Όσον αφορά την ομοιογένεια, με την πάροδο του χρόνου το εύρος της ζώνης SPR αυξάνεται, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα Π.Α.3, που σημαίνει ότι αυξάνεται η ετερογένεια των νανοσωματιδίων. Σε μικρούς χρόνους το εύρος της ζώνης είναι μικρό θεωρώντας ότι η ομοιογένεια των νανοσωματιδίων είναι ικανοποιητική. Σε μεγαλύτερους χρόνους και ιδιαίτερα στις 24 h το εύρος είναι μεγαλύτερο, ενώ για pH = 11 το πλάτος είναι αρκετά μεγάλο και επομένως τα νανοσωματίδια αναμένεται να μην είναι ομοιόμορφα. Γενικά, σε όξινα pH ο ρυθμός αναγωγής των μεταλλικών ιόντων είναι πιο αργός σχηματίζοντας λιγότερους πυρήνες κρυστάλλων αργύρου στους οποίους εναποτίθενται τα νέα άτομα αργύρου δημιουργώντας σωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους. Αντιθέτως, όσο αυξάνεται το pH τόσο επιταχύνεται ο ρυθμός αναγωγής των μεταλλικών ιόντων σχηματίζοντας περισσότερες περιοχές πυρήνωσης εξαιτίας της παρουσίας ιόντων OH⁻ και οδηγώντας στη δημιουργία νανοσωματιδίων μικρότερου μεγέθους [92], [93].

Καταλήγοντας, η σύνθεση AgNPs με τη χρήση εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* πραγματοποιείται με υψηλότερη ταχύτητα και αποτελεσματικότερα για τιμή pH = 11 του

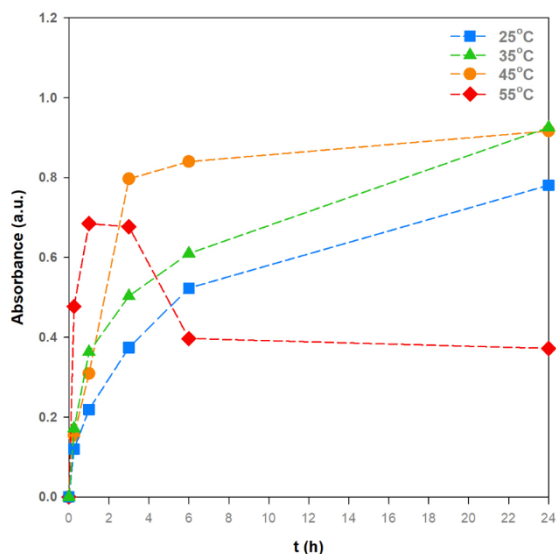
μέσου σύνθεσης. Τα σχηματιζόμενα AgNPs εκτιμάται ότι έχουν σφαιρικό σχήμα, μέγεθος μικρότερο από 100 nm και σχετικά καλή ομοιογένεια. Υψηλά pH οδηγούν στη σύνθεση νανοσωματιδίων μικρότερου μεγέθους συγκριτικά με πιο όξινα pH. Στα ίδια συμπεράσματα έχουν καταλήξει και μελέτες σχετικά με νανοσωματίδια συντεθειμένα από τα μικροφύκη *C. vulgaris* [76] και *Desmodesmus abundans* [94].

3.1.4. Επίδραση θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία είναι ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη σύνθεση AgNPs και χρειάζεται να αριστοποιηθεί για κάθε στέλεχος και μέθοδο που χρησιμοποιείται ξεχωριστά, καθώς τα αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν στον χρόνο σύνθεσης, το μέγεθος και το σχήμα των νανοσωματιδίων [6]. Από τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis διαπιστώνεται ότι για όλες τις θερμοκρασίες εμφανίζεται η χαρακτηριστική για τα AgNPs ζώνη SPR και είναι ευδιάκριτη ήδη από τα πρώτα 15 min για τις θερμοκρασίες των 35°C, 45°C και 55°C και μετά τη 1 h σύνθεσης για τη θερμοκρασία των 25°C (Διάγραμμα 3.7). Με την πάροδο του χρόνου η μέγιστη απορρόφηση αυξάνεται για όλες τις θερμοκρασίες με εξαίρεση τους 55°C που εμφανίζει μέγιστο στη 1 h και στη συνέχεια μειώνεται. Στις 24 h η μέγιστη απορρόφηση φτάνει στην τιμή 0,781 για τους 25°C, στην τιμή 0,926 για τους 35°C, στην τιμή 0,917 για τους 45°C και στην τιμή 0,372 για τους 55°C. Για χρόνους έως 1 h η θερμοκρασία των 55°C παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερη απόδοση σε σχέση με τις υπόλοιπες θερμοκρασίες. Ωστόσο, στις 3 h η μέγιστη απορρόφηση για τους 55°C παραμένει ίδια με αυτή στη 1 h και η αντίστοιχη των 45°C γίνεται υψηλότερη, οπότε η σειρά φθίνουσας απόδοσης είναι αρχικά οι 45°C, μετά οι 55°C και ακολουθούν οι 35°C και οι 25°C. Στις 6 h παρατηρείται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται η μέγιστη απορρόφηση, με εξαίρεση τους 55°C που πλέον εμφανίζει τη χαμηλότερη απόδοση έχοντας μειωθεί σχεδόν στο μισό. Αντίστοιχα είναι τα αποτελέσματα και για τις 24 h με μόνη διαφορά ότι οι θερμοκρασίες των 35°C και 45°C έχουν παρόμοια απορρόφηση (Διάγραμμα 3.7). Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία τόσο μικρότερος είναι ο χρόνος σύνθεσης που απαιτείται, καθώς φτάνει σε ένα μέγιστο και μετά από ένα διάστημα σταθεροποίησης αρχίζει να μειώνεται η μέγιστη απορρόφηση πιθανότατα λόγω συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων και αποσταθεροποίησής τους. Έχει διαπιστωθεί ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται ο ρυθμός αναγωγής των μεταλλικών ιόντων και σύνθεσης των νανοσωματιδίων αλλά υπάρχει μία βέλτιστη θερμοκρασία, καθώς η περαιτέρω αύξησή της οδηγεί σε συσσωμάτωση [95], [96]. Οι παρατηρήσεις αυτές αποτυπώνονται και στο Διάγραμμα 3.8, όπου είναι φανερό ότι σε μικρούς χρόνους η αύξηση της μέγιστης απορρόφησης είναι σχεδόν γραμμική με την κλίση να αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Σε μεγαλύτερους χρόνους για τις θερμοκρασίες των 25°C και 35°C η μέγιστη απορρόφηση συνεχίζει να αυξάνεται με μικρότερο ρυθμό, για τη θερμοκρασία των 45°C παρουσιάζεται μία τάση σταθεροποίησης, ενώ για τη θερμοκρασία των 55°C μειώνεται.



Διάγραμμα 3.7. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των AgNPs συντεθειμένων σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά από χρόνο σύνθεσης (A) 15 min (B) 1 h (C) 3 h (D) 6 h και (E) 24 h



Διάγραμμα 3.8. Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των συνθετιμένων AgNPs σε συνάρτηση με τον χρόνο για τις διαφορετικές θερμοκρασίες

Σε όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν η κορυφή SPR παρουσιάζεται μεταξύ 400 και 440 nm, υποδεικνύοντας ότι το σχήμα των AgNPs αναμένεται να είναι σφαιρικό και το μέγεθός τους μικρότερο από 100 nm. Παρατηρείται ότι σε μικρούς χρόνους το μέγεθός τους είναι μικρό και ανεξάρτητο της θερμοκρασίας, αλλά σε μεγαλύτερους χρόνους με την αύξηση της θερμοκρασίας φαίνεται να αυξάνεται και το μέγεθος των νανοσωματιδίων, πιθανόν λόγω συσσωμάτωσής τους. Παράλληλα, η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί στην αύξηση και της ετερογένειας των AgNPs, καθώς αυξάνεται το εύρος της ζώνης SPR, με τη θερμοκρασία των 25°C να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομοιογένεια (Διάγραμμα 3.7). Φυσικά, η ετερογένεια αυξάνεται και με την πάροδο του χρόνου για κάθε θερμοκρασία, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα Π.Α.4. Αντίστοιχα συμπεράσματα έχουν εξαχθεί από μελέτες σύνθεσης νανοσωματιδίων από το καφέ φύκος *Cystophora moniliformis* [95] και από το κυανοβακτήριο *Plectonema boryanum* [97].

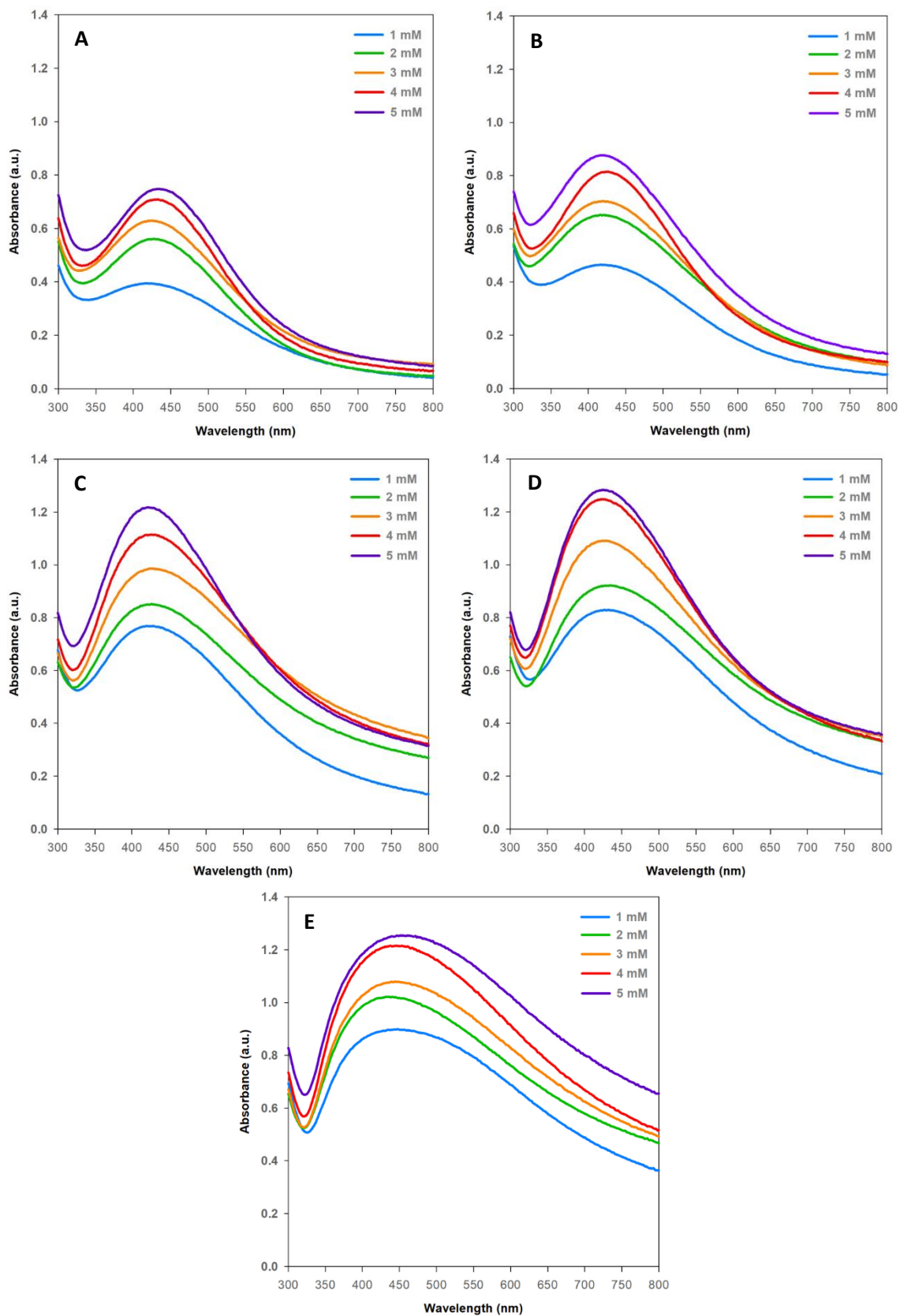
Συνεπώς, η σύνθεση AgNPs με τη χρήση εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* έχει υψηλότερη απόδοση για υψηλότερες θερμοκρασίες (55°C) σε μικρούς χρόνους με το σχηματισμό νανοσωματιδίων που εκτιμάται ότι έχουν σφαιρικό σχήμα, μέγεθος μικρότερο από 100 nm και καλή ομοιογένεια. Ωστόσο, σε μεγαλύτερους χρόνους για υψηλότερες θερμοκρασίες το μέγεθος των νανοσωματιδίων αυξάνεται λόγω συσσωμάτωσης με αποτέλεσμα να είναι προτιμότερες οι χαμηλότερες θερμοκρασίες (25°C), όπου το μέγεθος παραμένει μικρότερο και η ομοιογένεια ικανοποιητικότερη.

3.1.5. Επίδραση συγκέντρωσης του AgNO_3 στο υδατικό διάλυμα

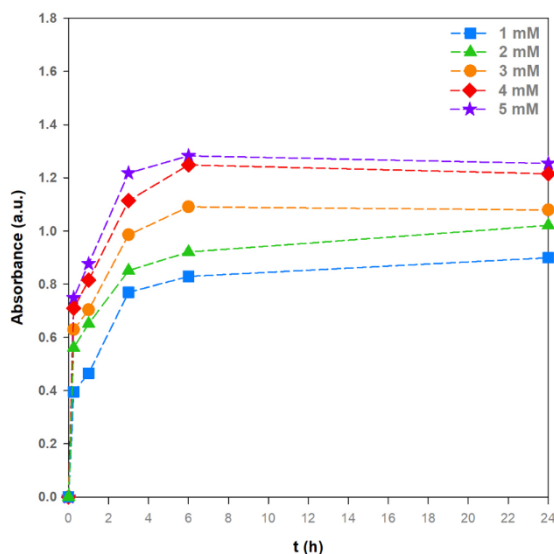
Η συγκέντρωση των ιόντων της πρόδρομης ένωσης που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των AgNPs είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό κυρίως την απόδοση αλλά και τη μορφολογία των νανοσωματιδίων [98]. Από τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis διαπιστώνεται ότι για όλες τις συγκεντρώσεις εμφανίζεται η χαρακτηριστική για τα AgNPs ζώνη SPR και είναι ευδιάκριτη ήδη από τα πρώτα 15 *min* (Διάγραμμα 3.9). Με την πάροδο του χρόνου η μέγιστη απορρόφηση αυξάνεται για όλες τις συγκεντρώσεις και στις 24 *h* φτάνει στην τιμή 0,899 για 1 *mM*, στην τιμή 1,022 για 2 *mM*, στην τιμή 1,079 για 3 *mM*, στην τιμή 1,216 για 4 *mM* και στην τιμή 1,254 για 5 *mM*. Κάθε χρονική στιγμή η μέγιστη απορρόφηση είναι μικρότερη για τη χαμηλότερη συγκέντρωση και αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης. Αυτό επιβεβαιώνεται, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι η ποσότητα των νανοσωματιδίων που συντίθενται εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πρόδρομης ένωσης και υψηλότερες συγκεντρώσεις οδηγούν σε υψηλότερες αποδόσεις. Βέβαια, αυτό ισχύει μόνο για τις περιπτώσεις που η μέθοδος που χρησιμοποιείται δεν περιλαμβάνει ολόκληρα τα κύτταρα του μικροοργανισμού, όπως στην παρούσα διπλωματική εργασία, διότι διαφορετικά μετά από ένα όριο συγκέντρωσης η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώνεται λόγω της κυτταροτοξικότητας των κατιόντων και των νανοσωματιδίων [6], [98]. Επιπλέον, η αύξηση της μέγιστης απορρόφησης για όλες τις συγκεντρώσεις είναι σχεδόν γραμμική για μικρούς χρόνους (μέχρι 3 *h*), ενώ σε μεγαλύτερους χρόνους παρουσιάζει μία τάση σταθεροποίησης συνεχίζοντας να αυξάνεται με πολύ μικρότερο ρυθμό για τις συγκεντρώσεις 1 *mM* και 2 *mM*, αλλά να μειώνεται με πολύ μικρό ρυθμό για τις συγκεντρώσεις 3 *mM*, 4 *mM* και 5 *mM* (Διάγραμμα 3.10). Φαίνεται, λοιπόν, ότι το μεγαλύτερο μέρος της σύνθεσης πραγματοποιείται μέσα στις πρώτες 3 – 6 *h*.

Σε όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν η κορυφή SPR παρουσιάζεται μεταξύ 400 και 450 *nm*, υποδεικνύοντας ότι το σχήμα των AgNPs αναμένεται να είναι σφαιρικό και το μέγεθός τους μικρότερο από 100 *nm*. Για κάθε συγκέντρωση το μέγεθος αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου εμφανίζοντας μεγαλύτερα μεγέθη στις 24 *h*, ενώ φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση και μεταξύ μεγέθους-συγκέντρωσης με την αύξηση της δεύτερης να έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του πρώτου, παρατήρηση που έχει διατυπωθεί και για το μύκητα *Scenedosporium* [99]. Επιπλέον, από τα φάσματα είναι φανερό ότι τα AgNPs παρουσιάζουν καλή ομοιογένεια ανεξαρτήτως συγκέντρωσης μέχρι τις 6 *h*, αλλά στις 24 *h* το εύρος της ζώνης SPR αυξάνεται σημαντικά για όλες τις συγκεντρώσεις υποδηλώνοντας αύξηση της ετερογένειάς τους (Διάγραμμα 3.9). Παράλληλα, με την πάροδο του χρόνου για κάθε συγκέντρωση το εύρος της ζώνης αυξάνεται, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα Π.Α.5, άρα ελαττώνεται η ομοιογένεια των AgNPs.

Συνοψίζοντας, η σύνθεση AgNPs με τη χρήση εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* έχει υψηλότερη απόδοση για υψηλότερη συγκέντρωση, με τα αποτελέσματα για τις τιμές 4 *mM* και 5 *mM* να είναι παρόμοια και συνεπώς να προτιμάται η συγκέντρωση 4 *mM*. Μάλιστα, ο χρόνος σύν-



Διάγραμμα 3.9. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των AgNPs συντεθειμένων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις δ/τος AgNO₃ μετά από χρόνο σύνθεσης (A) 15 min (B) 1 h (C) 3 h (D) 6 h και (E) 24 h

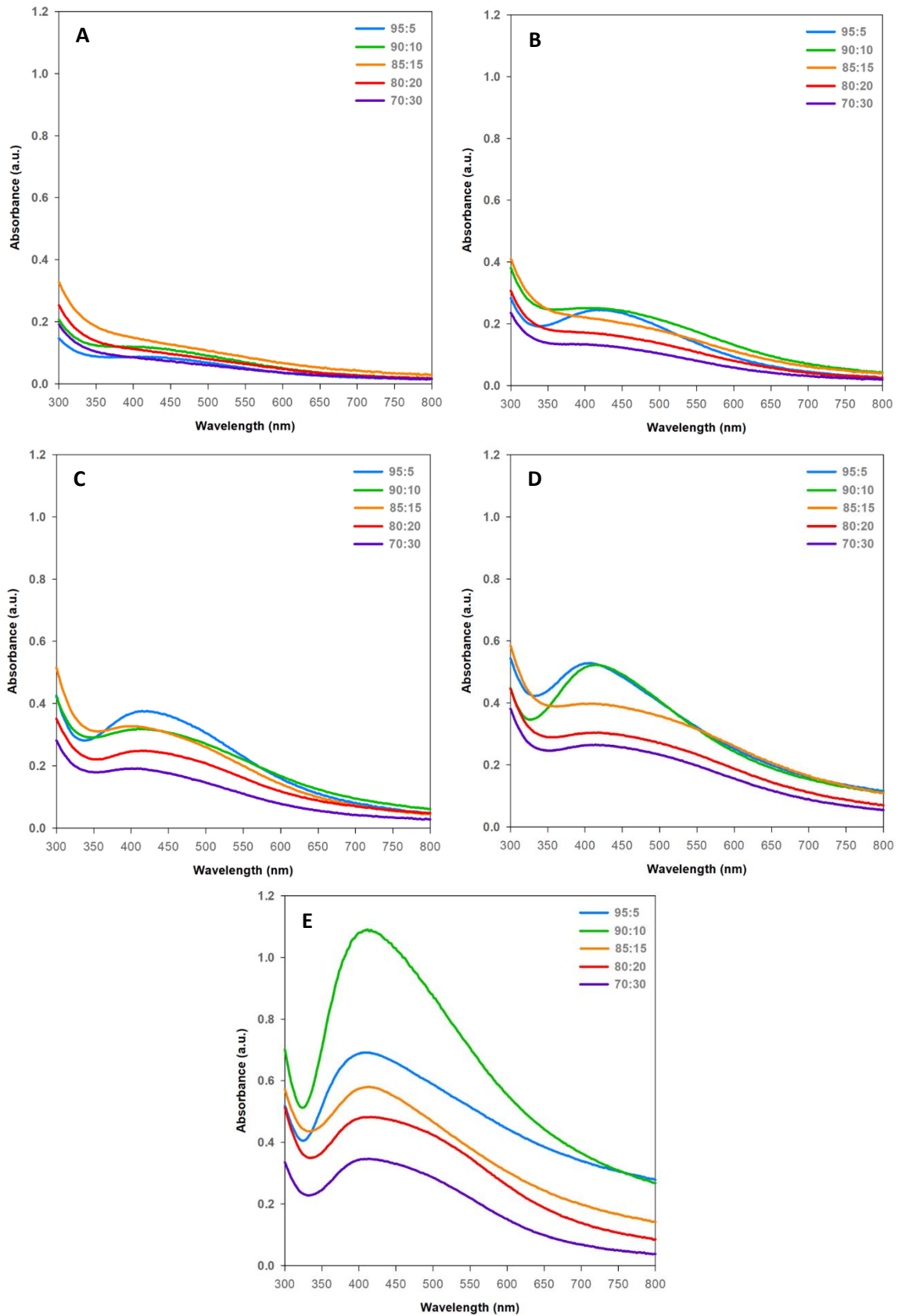


Διάγραμμα 3.10. Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των συνθετιμένων AgNPs σε συνάρτηση με τον χρόνο για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις

θεσης που απαιτείται είναι λίγες ώρες (3 – 6 h) με τα σχηματιζόμενα AgNPs να εκτιμάται ότι έχουν σφαιρικό σχήμα, μέγεθος μικρότερο από 100 nm και καλή ομοιογένεια. Στις μελέτες σύνθεσης AgNPs με τη χρήση του κυανοβακτηρίου *Oscillatoria limnetica* [81], του μικροφύκου *C. vulgaris* [76] και του μύκητα *Scedosporium* [99] εξήχθησαν παρόμοια συμπεράσματα.

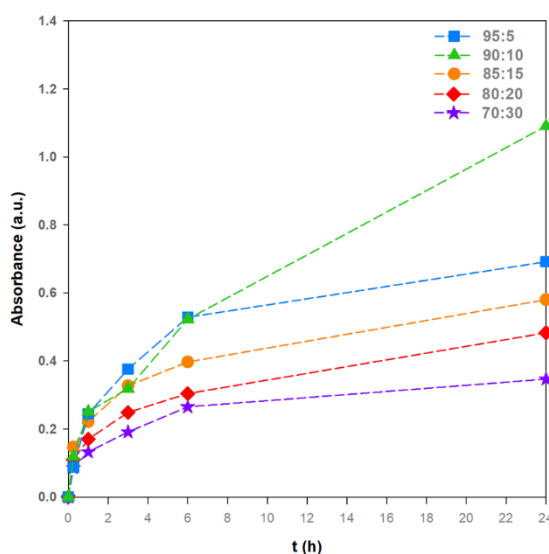
3.1.6. Επίδραση αναλογίας διαλύματος AgNO₃/εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση των AgNPs είναι και η αναλογία όγκων με την οποία αναμιγνύονται το διάλυμα του νιτρικού αργύρου με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας. Από τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis διαπιστώνεται ότι για όλες τις αναλογίες εμφανίζεται η χαρακτηριστική για τα AgNPs ζώνη SPR και είναι ευδιάκριτη ήδη από τη πρώτη μία ώρα για τις αναλογίες 95 / 5 και 90 / 10 v/v, ενώ μετά τις 3 h σύνθεσης για τις αναλογίες 85 / 15, 80 / 20 και 70 / 30 v/v (Διάγραμμα 3.11). Με την πάροδο του χρόνου η μέγιστη απορρόφηση αυξάνεται για όλες τις αναλογίες και στις 24 h φτάνει στην τιμή 0,692 για την αναλογία 95 / 5 v/v, στην τιμή 1,091 για την αναλογία 90 / 10 v/v, στην τιμή 0,580 για την αναλογία 85 / 15 v/v, στην τιμή 0,483 για την αναλογία 80 / 20 v/v και στην τιμή 0,347 για την αναλογία 70 / 30 v/v. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι υπάρχει ένα μέγιστο στο οποίο γίνεται βέλτιστη η απόδοση της σύνθεσης και εμφανίζεται στην αναλογία 90 / 10 v/v. Αρχικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας μπορεί να αυξάνεται η σύνθεση των AgNPs. Ωστόσο, για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από μία συγκέντρωση του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας τα νανοσωματίδια αρχίζουν να συσσωματώνονται ελαττώνοντας την



Διάγραμμα 3.11. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των AgNPs συντεθειμένων σε διαφορετικές κατ' όγκο αναλογίες διαλύματος AgNO₃/εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας μετά από χρόνο σύνθεσης (A) 15 min (B) 1 h (C) 3 h (D) 6 h και (E) 24 h

απόδοση της σύνθεσης. Σε αντίστοιχα συμπεράσματα βέλτιστης αναλογίας έχουν καταλήξει μελέτες αριστοποίησης της σύνθεσης AgNPs, όπως με το πράσινο φύκος *Caulepra serrulata* [100], με το μικροφύκος *Dunaliella salina* [86], με το εκχύλισμα φύλλων του φυτού *Aegle marmelos* [101] και με τον μύκητα *Aspergillus terreus* [102]. Επιπλέον, σε όλες τις περιπτώσεις η αύξηση της μέγιστης απορρόφησης σε μικρούς χρόνους είναι σχεδόν γραμμική (μέχρι 6 h), ενώ σε μεγαλύτερους χρόνους συνεχίζει να αυξάνεται με μικρότερο ρυθμό παρουσιάζοντας μία τάση σταθεροποίησης και σχηματισμού πλατό, με εξαίρεση την περίπτωση της αναλογίας 90 / 10 v/v που μετά τις 6 h συνεχίζει να αυξάνεται σημαντικά (Διάγραμμα 3.12). Το μεγαλύτερο μέρος της σύνθεσης των AgNPs πραγματοποιείται τις πρώτες 6 h για όλες τις αναλογίες, εκτός της αναλογίας 90 / 10 v/v που η σύνθεση συνεχίζεται μέχρι τις 24 h.



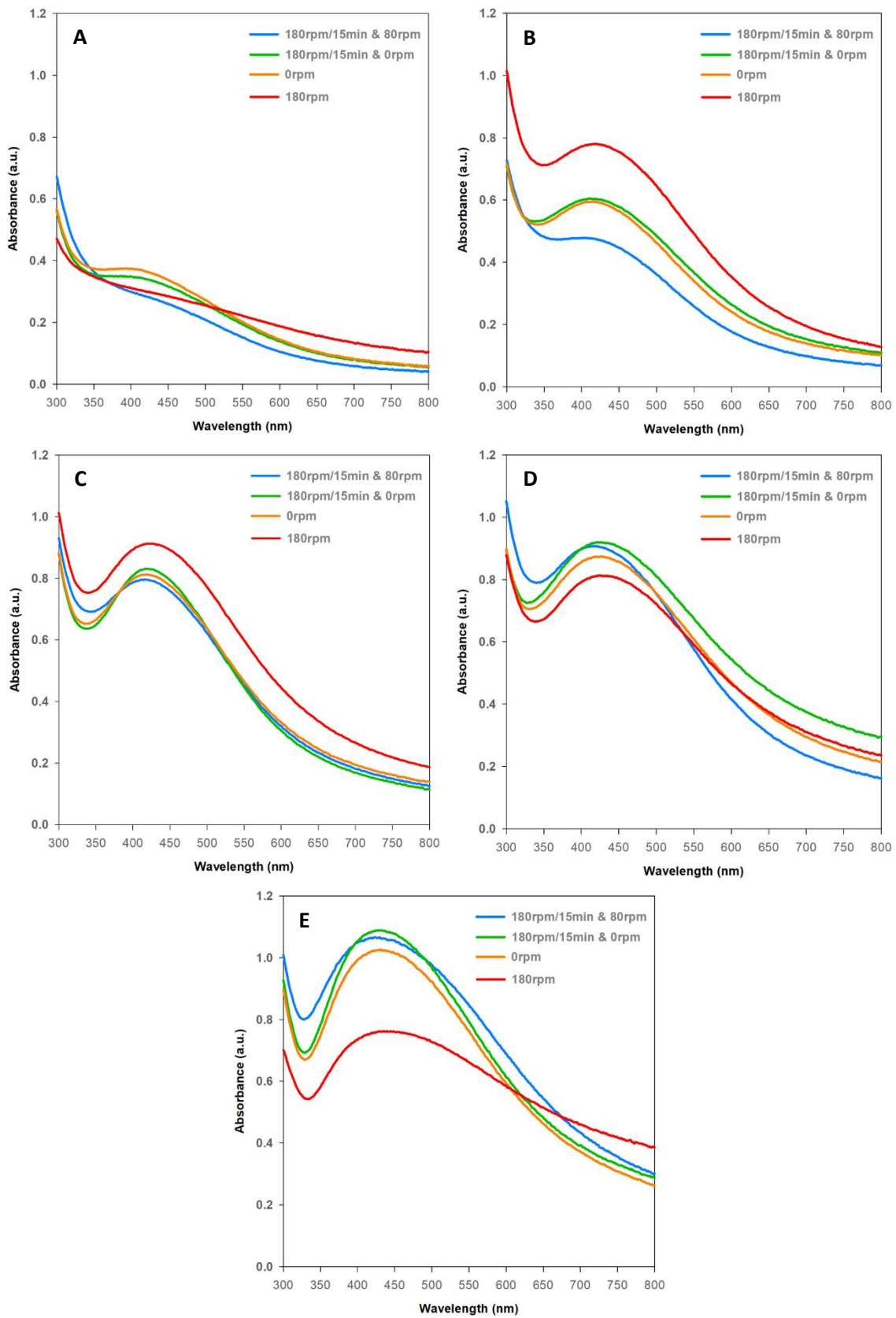
Διάγραμμα 3.12. Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των συνθεθειμένων AgNPs σε συνάρτηση με τον χρόνο για τις διαφορετικές αναλογίες διαλύματος AgNO₃/εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας

Σε όλες τις περιπτώσεις η κορυφή SPR παρουσιάζεται μεταξύ 400 και 430 nm χωρίς σημαντικές διαφορές, υποδεικνύοντας ότι το σχήμα των AgNPs αναμένεται να είναι σφαιρικό και ανεξάρτητο της χρησιμοποιούμενης αναλογίας, όπως και το μέγεθός τους που αναμένεται να είναι μικρότερο από 100 nm σε κάθε περίπτωση. Επιπλέον, από τα φάσματα φαίνεται ότι τα νανοσωματίδια είναι ομοιογενή ανεξαρτήτως αναλογίας (Διάγραμμα 3.11), αν και με την πάροδο του χρόνου το εύρος της ζώνης αυξάνεται, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα Π.Α.6, υποδηλώνοντας ότι αυξάνεται η ετερογένειά τους.

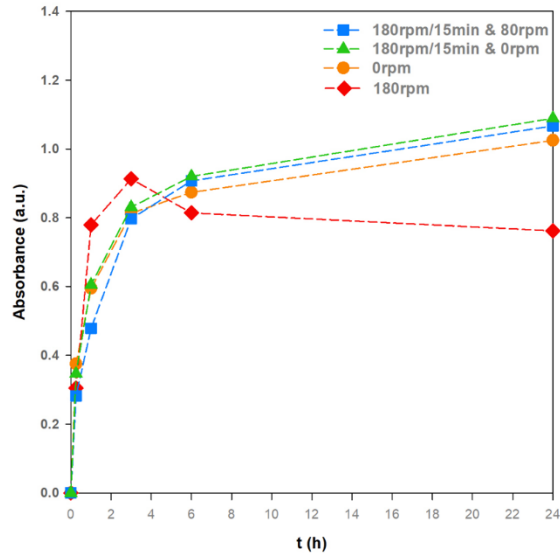
Συνεπώς, η σύνθεση AgNPs με τη χρήση εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* γίνεται βέλτιστη για κατ' όγκο αναλογία διαλύματος του νιτρικού αργύρου/εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας ίση με 90 / 10 v/v στις 24 h σύνθεσης. Τα σχηματιζόμενα νανοσωματίδια αναμένεται να έχουν σφαιρικό σχήμα, μέγεθος μικρότερο από 100 nm και καλή ομοιογένεια, χαρακτηριστικά τα οποία είναι ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη αναλογία.

3.1.7. Επίδραση ανάδευσης

Η ανάδευση ίσως να μην αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση των AgNPs, αλλά συχνά λαμβάνεται υπόψη και εξετάζονται στατικές συνθήκες και συνθήκες ήπιας ή έντονης ανάδευσης [98], χρησιμοποιώντας για παράδειγμα επωαστήρα [103] ή μαγνητικό αναδευτήρα [104]. Από τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis διαπιστώνεται ότι για όλες τις συνθήκες ανάδευσης εμφανίζεται η χαρακτηριστική για τα AgNPs ζώνη SPR και είναι ευδιάκριτη ήδη από την πρώτη 1 h (Διάγραμμα 3.13). Με την πάροδο του χρόνου η μέγιστη απορρόφηση αυξάνεται για όλες τις συνθήκες ανάδευσης με εξαίρεση τη συνθήκη 180 rpm που εμφανίζει μέγιστο στις 3 h και στη συνέχεια μειώνεται. Στις 24 h η μέγιστη απορρόφηση φτάνει στην τιμή 1,067 για τη συνθήκη 180 rpm/15 min & 80 rpm, στην τιμή 1,089 για τη συνθήκη 180 rpm/15 min & 0 rpm, στην τιμή 1,025 για τη συνθήκη 0 rpm και στην τιμή 0,762 για τη συνθήκη 180 rpm. Στα πρώτα 15 min δεν παρατηρείται καμία διαφορά μεταξύ των τεσσάρων συνθηκών. Στη 1 h και στις 3 h η συνθήκη 180 rpm παρουσιάζει ελαφρώς υψηλότερη κορυφή σε σχέση με τις υπόλοιπες, με τις συνθήκες 180 rpm/15 min & 0 rpm και 0 rpm να ακολουθούν με παραπλήσια αποτελέσματα και τη συνθήκη 180 rpm/15 min & 80 rpm να έχει τη χαμηλότερη κορυφή στη 1 h και στη συνέχεια να προσεγγίζει τις δύο προηγούμενες. Αντιθέτως, στις 6 h μειώνεται η μέγιστη απορρόφηση της συνθήκης 180 rpm και εμφανίζει πλέον τη χαμηλότερη κορυφή, ενώ οι άλλες τρεις συνθήκες παρουσιάζουν παραπλήσια κορυφή. Το ίδιο παρατηρείται και στις 24 h, οπότε η μέγιστη απορρόφηση της συνθήκης 180 rpm έχει ελαττωθεί ακόμη περισσότερο απέχοντας κατά πολύ από τα αποτελέσματα των υπόλοιπων τριών συνθηκών (Διάγραμμα 3.13). Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι σε μικρούς χρόνους (3 – 6 h) η απόδοση είναι υψηλότερη για τη συνθήκη 180 rpm, σε αντίθεση με τους μεγαλύτερους χρόνους που παρουσιάζει τη χαμηλότερη απόδοση και συνεπώς προτιμάται μία εκ των υπόλοιπων τριών συνθηκών που παρουσιάζουν παραπλήσια αποτελέσματα. Ενδεχομένως, στην αρχή της σύνθεσης η ισχυρή ανάδευση να βοηθά στην καλή ανάμιξη των βιολογικών μορίων με τα μεταλλικά ιόντα, χωρίς όμως να είναι απαραίτητη (συνθήκη 0 rpm), αλλά στη συνέχεια να απαιτείται πιο ήπια ανάδευση, ώστε τα βιολογικά μόρια του εξωκυτταρικού υγρού να προσδεθούν καλύτερα στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, ενώ η έντονη και παρατεταμένη ανάδευση να οδηγεί σε περισσότερες συγκρούσεις μεταξύ των σωματιδίων και κατά συνέπεια στην αποσταθεροποίησή τους και στον σχηματισμό συσσωματωμάτων [105]. Επιπλέον, σε όλες τις περιπτώσεις η αύξηση της μέγιστης απορρόφησης σε μικρούς χρόνους είναι σχεδόν γραμμική (μέχρι 3 h), ενώ σε μεγαλύτερους χρόνους συνεχίζει να αυξάνεται με μικρότερο ρυθμό παρουσιάζοντας μία τάση σταθεροποίησης και σχηματισμού πλατό, με εξαίρεση τη συνθήκη 180 rpm που μετά τις 3 h αρχίζει να μειώνεται (Διάγραμμα 3.14). Φαίνεται, λοιπόν, ότι το μεγαλύτερο μέρος της σύνθεσης των AgNPs πραγματοποιείται μέσα στις πρώτες 3 h για όλες τις συνθήκες ανάδευσης.



Διάγραμμα 3.13. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των AgNPs συντεθειμένων σε διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης μετά από χρόνο σύνθεσης (A) 15 min (B) 1 h (C) 3 h (D) 6 h και (E) 24 h



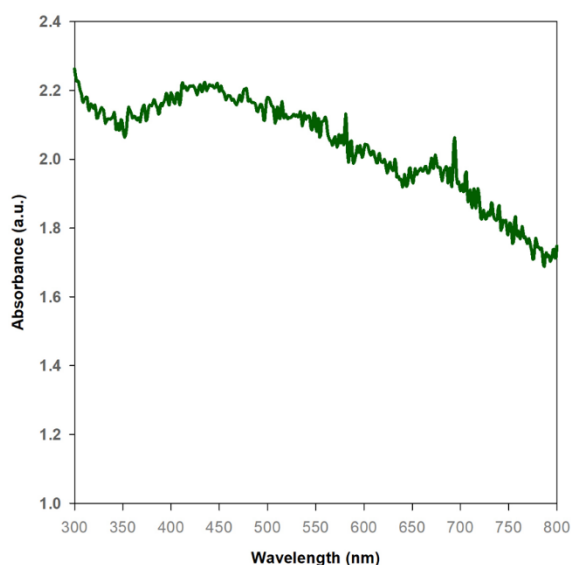
Διάγραμμα 3.14. Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των συνθετιμένων AgNPs σε συνάρτηση με τον χρόνο για τις διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης

Σε όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν η κορυφή SPR παρουσιάζεται μεταξύ 400 και 440 nm, υποδεικνύοντας ότι το σχήμα των AgNPs αναμένεται να είναι σφαιρικό και το μέγεθός τους μικρότερο από 100 nm. Για κάθε συνθήκη ανάδευσης το μέγεθος αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, ενώ η συνθήκη 180 rpm εμφανίζει τα μεγαλύτερα μεγέθη συγκριτικά με τις υπόλοιπες συνθήκες στις 24 h, πιθανόν λόγω συσσωμάτωσης και αποσταθεροποίησης των νανοσωματιδίων [105]. Επιπλέον, από τα φάσματα φαίνεται ότι τα AgNPs παρουσιάζουν καλή ομοιογένεια σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από τη συνθήκη 180 rpm στις 24 h που το εύρος της ζώνης αυξάνεται σημαντικά υποδηλώνοντας αύξηση της ετερογένειας (Διάγραμμα 3.13). Παράλληλα, για κάθε συνθήκη ανάδευσης το εύρος της ζώνης αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα Π.Α.7, δηλαδή ελαττώνεται η ομοιογένεια.

Επομένως, η σύνθεση AgNPs με τη χρήση εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* δεν εξαρτάται ισχυρά από τις συνθήκες ανάδευσης. Φαίνεται ότι αρχικά ευνοείται από την έντονη ανάδευση, αλλά δεν πρέπει να είναι παρατεταμένη, γιατί οδηγεί στην αποσταθεροποίηση των νανοσωματιδίων και στη συσσωμάτωσή τους. Άρα, για μεγάλους χρόνους σύνθεσης απαιτείται ήπια ανάδευση, ενώ και για τις στάσιμες συνθήκες τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά. Τα σχηματιζόμενα AgNPs αναμένεται να έχουν σφαιρικό σχήμα, μέγεθος μικρότερο από 100 nm και καλή ομοιογένεια. Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν με μελέτες σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου υπό ανάδευση με το πράσινο φύκος *Ulva fasciata* [104] αλλά και χωρίς ανάδευση με το μακροφύκος *Chaetomorpha linum* [106].

3.1.8. Χρήση αιθανολικού εκχυλίσματος κυττάρων

Μία άλλη μέθοδος σύνθεσης AgNPs είναι με τη χρήση εκχυλισμένων βιομορίων (π.χ. εκχύλιση κυττάρων με αιθανόλη). Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των κυττάρων του *H. pluvialis* με αιθανόλη (§ 2.8) και το εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε στη σύνθεση AgNPs. Στο φάσμα απορρόφησης UV-Vis εμφανίζεται η χαρακτηριστική ζώνη συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων με $\lambda_{max} = 435 \text{ nm}$ (Διάγραμμα 3.15), υποδεικνύοντας ότι πράγματι και με τη μέθοδο αιθανολικού εκχυλίσματος κυττάρων είναι εφικτή η σύνθεση AgNPs. Σημειώνεται ότι για τη λήψη του φάσματος ως βάση χρησιμοποιήθηκε τυφλό διάλυμα αιθανόλης (μοναδική περίπτωση αντί του υπερκάθαρου νερού), διότι η πρώτη ύλη ήταν το αιθανολικό εκχύλισμα. Το δείγμα που μετρήθηκε ήταν μετά από 24 h σύνθεσης. Αντίστοιχα είναι τα αποτελέσματα και με τη χρήση αλκοολικού εκχυλίσματος κυττάρων άλλων μικροφυκών, όπως κάποια είδη *Chlorella* [77] και του *Laurencia catarinensis* [107].



Διάγραμμα 3.15. Φάσμα απορρόφησης UV-Vis των AgNPs συντεθειμένων με το αιθανολικό εκχύλισμα κυττάρων του μικροφύκου *H. pluvialis* μετά από 24 h σύνθεσης

Ωστόσο, παρατηρείται ότι στο φάσμα υπάρχει αρκετός “θόρυβος” δημιουργώντας πολλές μικρές κορυφές, ενώ εμφανίζεται άλλη μία μικρή ζώνη SPR με $\lambda_{max} \approx 674 \text{ nm}$. Για την ερμηνεία των παρατηρήσεων αυτών απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση με τη διεξαγωγή περισσότερων πειραμάτων.

3.2. Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων αργύρου με DLS

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το μέγεθος, το σχήμα, ο δείκτης πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό των AgNPs είναι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητές τους. Η

μέθοδος της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) είναι μία γρήγορη μέθοδος προσδιορισμού του μέσου μεγέθους, της κατανομής μεγέθους, του δείκτη πολυδιασποράς και του ζ-δυναμικού. Τα δείγματα AgNPs που μετρήθηκαν προέρχονται από 24 h σύνθεσης με τη χρήση εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis*. Τα αποτελέσματα για όλες τις συνθήκες σύνθεσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1 και τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους και ζ-δυναμικού παρατίθενται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: Αποτελέσματα DLS (Διάγραμμα Π.Β.1 και Διάγραμμα Π.Β.2 για τις συνθήκες φως/σκοτάδι, Διάγραμμα Π.Β.3 και Διάγραμμα Π.Β.4 για τα διάφορα *pH*, Διάγραμμα Π.Β.5 και Διάγραμμα Π.Β.6 για τις διάφορες θερμοκρασίες, Διάγραμμα Π.Β.7 και Διάγραμμα Π.Β.8 για τις διάφορες συγκεντρώσεις του διαλύματος νιτρικού αργύρου, Διάγραμμα Π.Β.9 και Διάγραμμα Π.Β.10 για τις διάφορες αναλογίες διαλύματος του νιτρικού αργύρου/εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας και Διάγραμμα Π.Β.11 και Διάγραμμα Π.Β.12 για τις διάφορες συνθήκες ανάδευσης, αντίστοιχα). Είναι φανερό ότι ακολουθείται κανονική κατανομή με τη χαρακτηριστική καμπύλη Gauss, ενώ μία μικρή καμπύλη που εμφανίζεται συχνά υποδηλώνοντας τη παρουσία μεγαλύτερων σωματιδίων αποδίδεται σε τυχόν ακαθαρσίες που υπάρχουν στο δείγμα, καθώς η μέθοδος είναι πολύ ευαίσθητη.

Το μέσο μέγεθος των νανοσωματιδίων κυμαίνεται από 125,0 έως 283,7 nm αποτελώντας ένδειξη μικρής συσσωμάτωσης, η οποία χρήζει περαιτέρω διερεύνησης με άλλες μεθόδους, όπως η ανάλυση TEM. Ο δείκτης πολυδιασποράς ποικίλλει από 0,177 έως 0,418 υποδεικνύοντας ότι σε όλες τις συνθήκες το μέγεθος των AgNPs είναι αρκετά ομοιογενές (Πίνακας 3.1).

Πιο αναλυτικά, στην περίπτωση παρουσίας φωτός το μέσο μέγεθος των AgNPs είναι 189,5 nm και η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς χαμηλή, υποδηλώνοντας καλή ομοιογένεια των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων (Πίνακας 3.1).

Από τη μελέτη επίδρασης του *pH* παρατηρείται ότι το *pH* = 11, το οποίο είχε και τη μεγαλύτερη απόδοση, παρουσιάζει τόσο το μικρότερο μέσο μέγεθος AgNPs όσο και το χαμηλότερο δείκτη πολυδιασποράς, που είναι μάλιστα και ο χαμηλότερος μεταξύ όλων των πειραμάτων (Πίνακας 3.1). Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με την άποψη ότι όσο αυξάνεται το *pH* τόσο επιταχύνεται ο ρυθμός αναγωγής των μεταλλικών ιόντων σχηματίζοντας περισσότερες περιοχές πυρήνωσης εξαιτίας της παρουσίας ιόντων OH^- και οδηγώντας στη δημιουργία νανοσωματιδίων μικρότερου μεγέθους [92], [93].

Με την αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται μία τάση αύξησης του μέσου μεγέθους των AgNPs και του δείκτη πολυδιασποράς, με μικρή εξαίρεση τη θερμοκρασία των 45°C. Στην υψηλότερη θερμοκρασία των 55°C το μέσο μέγεθος των AgNPs και ο δείκτης πολυδιασποράς έχουν τις υψηλότερες τιμές που σημειώθηκαν μεταξύ όλων των πειραμάτων (Πίνακας 3.1), καθώς η υψηλή θερμοκρασία ευνοεί τη συσσωμάτωση [95], [96].

Αναφορικά με τον παράγοντα της συγκέντρωσης του διαλύματος νιτρικού αργύρου, για 1 mM και 2 mM η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς είναι ίδια, η υψηλότερη για τον παράγοντα αυτόν, αλλά μικρότερο είναι το μέσο μέγεθος των AgNPs για τη συγκέντρωση 2 mM (Πίνακας 3.1). Με την αύξηση της συγκέντρωσης σε 3 mM, 4 mM και 5 mM αυξάνεται το μέσο μέγεθος των AgNPs ξεπερνώντας τα 200 nm, συσχέτιση που έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες [99].

Εξετάζοντας την επίδραση της κατ' όγκο αναλογίας του διαλύματος νιτρικού αργύρου/εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας παρατηρείται ότι το μικρότερο μέσο μέγεθος AgNPs εμφανίζει η αναλογία 90 / 10 v/v και το χαμηλότερο δείκτη πολυδιασποράς η αναλογία 70 / 30 v/v, που παρουσιάζει και το αμέσως μικρότερο μέσο μέγεθος (Πίνακας 3.1).

Για τον παράγοντα της ανάδευσης φαίνεται ότι οι συνθήκες 180 rpm/15 min & 0 rpm και 0 rpm επιδεικνύουν το μικρότερο μέσο μέγεθος AgNPs αλλά για τη συνθήκη 0 rpm ο δείκτης πολυδιασποράς είναι αρκετά υψηλότερος και μάλιστα ο υψηλότερος μεταξύ των τεσσάρων συνθηκών ανάδευσης (Πίνακας 3.1). Χαμηλότερος είναι για τη συνθήκη 180 rpm, στην οποία όμως εντοπίζεται το μεγαλύτερο μέσο μέγεθος AgNPs, διότι η έντονη και παρατεταμένη ανάδευση οδηγεί σε περισσότερες συγκρούσεις μεταξύ των σωματιδίων και κατά συνέπεια στην αποσταθεροποίησή τους και στο σχηματισμό συσσωματωμάτων [105].

Πίνακας 3.1. Αποτελέσματα DLS υδατικής διασποράς AgNPs για όλες τις συνθήκες μετά από 24 h σύνθεσης

ΠΕΙΡΑΜΑ	ΣΥΝΘΗΚΗ	Z-Average (d. nm)	PDI	Z-Δυναμικό (mV)
Φως/Σκοτάδι	Φως	189,5	0,226	-40,4 ± 8,41
	5	185,5	0,335	-26,4 ± 5,85
pH	7	199,0	0,291	-26,7 ± 8,12
	8	173,4	0,361	-28,5 ± 6,71
	9	191,9	0,258	-28,6 ± 6,30
	11	147,9	0,177	-18,2 ± 5,15
	25	125,0	0,322	-30,5 ± 6,84
T (°C)	35	188,4	0,377	-30,3 ± 6,51
	45	159,5	0,341	-32,9 ± 6,46
	55	283,7	0,418	-20,6 ± 4,60
Συγκέντρωση δ/τος AgNO ₃ (mM)	1	187,3	0,377	-30,5 ± 5,95
	2	145,4	0,377	-33,0 ± 7,95
	3	210,1	0,31	-32,7 ± 5,22
	4	222,8	0,329	-26,4 ± 5,85
	5	235,1	0,356	-22,9 ± 5,00

Αναλογία δ/τος $AgNO_3$/ Εξ. υγρού καλ. (v/v)	95/5	150,5	0,313	$-34,1 \pm 9,31$
	90/10	125,0	0,322	$-30,5 \pm 6,84$
	85/15	184,8	0,332	$-29,0 \pm 5,50$
	80/20	198,0	0,289	$-27,4 \pm 6,03$
	70/30	136,3	0,224	$-25,3 \pm 5,82$
Ανάδευση (rpm)	180 για 15 min & 80	198,1	0,321	$-31,0 \pm 7,33$
	180 για 15 min & 0	167,3	0,293	$-35,4 \pm 7,83$
	0	170,1	0,372	$-35,9 \pm 7,06$
	180	208,9	0,270	$-26,4 \pm 4,70$

Όσον αφορά το ζ-δυναμικό, οι τιμές που καταγράφηκαν ήταν αρνητικές για όλες τις συνθήκες και κυμάνθηκαν από $-18,2 \pm 5,15$ μέχρι $-40,4 \pm 8,41$ (Πίνακας 3.1). Συμπεραίνεται, δηλαδή, ότι το φορτίο των AgNPs είναι αρνητικό και στις περισσότερες περιπτώσεις μπορούν να χαρακτηριστούν ως πολύ σταθερά (για τιμές μεγαλύτερες από 25 mV κατά απόλυτη τιμή). Για τη συνθήκη του φωτός τα σχηματιζόμενα AgNPs είναι πολύ σταθερά με μικρή τάση συσσωμάτωσης. Μάλιστα, η τιμή του ζ-δυναμικού για τη συνθήκη αυτή είναι η υψηλότερη κατά απόλυτη τιμή που μετρήθηκε μεταξύ όλων των πειραμάτων. Από τη μελέτη επίδρασης του pH παρατηρείται ότι την υψηλότερη σταθερότητα παρουσιάζουν τα AgNPs για $pH = 8$ και $pH = 9$. Ωστόσο, για $pH = 11$ η σταθερότητά τους είναι αρκετά μικρότερη, η μικρότερη κατά απόλυτη τιμή τιμή ζ-δυναμικού που καταγράφηκε, υποδεικνύοντας ότι σε αυτή την περίπτωση τα νανοσωματίδια έχουν μεγαλύτερη τάση συσσωμάτωσης. Για τη θερμοκρασία των $55^\circ C$ εντοπίζεται η δεύτερη μικρότερη κατά απόλυτη τιμή τιμή ζ-δυναμικού, οπότε και σε αυτή την περίπτωση τα AgNPs δεν είναι τόσο σταθερά, ενώ για τις υπόλοιπες θερμοκρασίες είναι πολύ σταθερά. Σχετικά με τον παράγοντα της συγκέντρωσης του διαλύματος νιτρικού αργύρου, για χαμηλές συγκεντρώσεις μέχρι και 3 mM είναι πολύ σταθερά, αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελαττώνεται η σταθερότητά τους. Στη μελέτη επίδρασης της κατ' όγκο αναλογίας του διαλύματος νιτρικού αργύρου/εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας αξιοσημείωτο είναι ότι υπάρχει μία τάση μείωσης της σταθερότητας των AgNPs με την ελάττωση της αναλογίας. Σε όλες, όμως, τις περιπτώσεις παρουσιάζουν υψηλή σταθερότητα. Για τον παράγοντα της ανάδευσης οι συνθήκες 180 rpm/15 min & 0 rpm και 0 rpm παρουσιάζουν τις υψηλότερες κατά απόλυτη τιμή τιμές ζ-δυναμικού υποδεικνύοντας μεγάλη σταθερότητα, ενώ για τη συνθήκη 180 rpm τα AgNPs είναι τα λιγότερο σταθερά μεταξύ των τεσσάρων συνθηκών ανάδευσης.

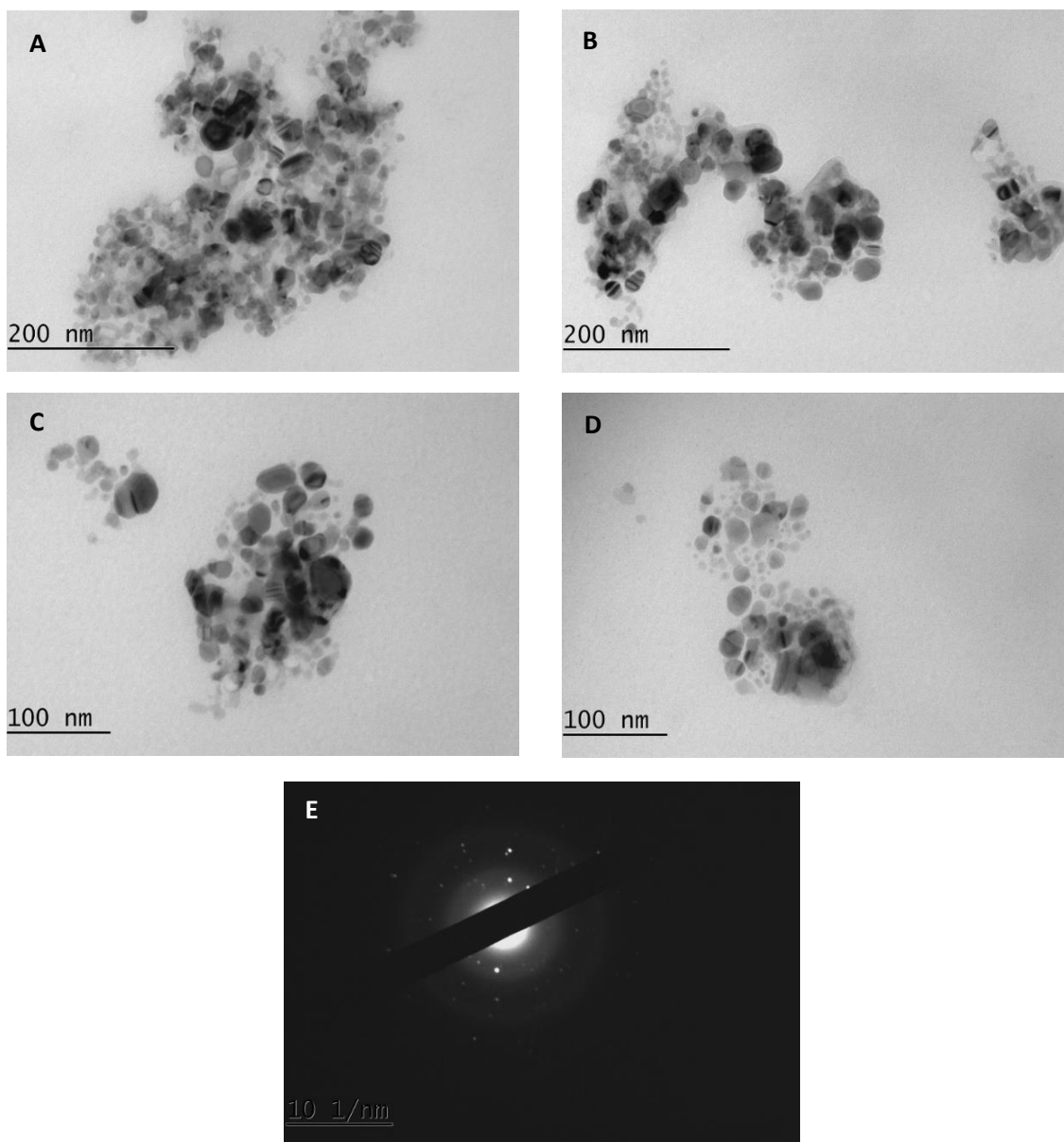
Συνοψίζοντας, το μέγεθος, η ομοιογένεια και η σταθερότητα των AgNPs από τη σύνθεση με τη χρήση εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* επηρεάζονται σημαντικά από τις συνθήκες σύνθεσης. Το φως ευνοεί το σχηματισμό νανοσωματιδίων σχετικά μικρού μέσου μεγέθους με

πολύ καλή ομοιογένεια και υψηλή σταθερότητα. Το pH και η θερμοκρασία αποτελούν δύο παράγοντες με ισχυρή επίδραση στα χαρακτηριστικά των AgNPs. Συγκεκριμένα, σε ισχυρά βασικό περιβάλλον επιτυγχάνεται μικρό μέσο μέγεθος AgNPs και υψηλή ομοιογένεια αλλά λιγότερο σταθερά νανοσωματίδια συγκριτικά με τα υπόλοιπα pH , προσδίδοντας στο $pH = 11$ ένα κρίσιμο μειονέκτημα. Σε $pH = 8$ και $pH = 9$ η σταθερότητα είναι πολύ υψηλότερη με το $pH = 8$ να παρουσιάζει μικρότερο μέσο μέγεθος AgNPs αλλά μεγαλύτερη ετερογένεια συγκριτικά με το $pH = 9$. Η υψηλή θερμοκρασία των $55^{\circ}C$ οδηγεί στη σύνθεση AgNPs με χαμηλότερη σταθερότητα, μεγαλύτερο μέσο μέγεθος και μικρότερη ομοιογένεια, καθιστώντας αποτρεπτική την επιλογή της. Αντίθετα, σε χαμηλότερες θερμοκρασίες τα νανοσωματίδια είναι πολύ πιο σταθερά, αρκετά μικρότερου μεγέθους και καλής ομοιογένειας, ιδιαίτερα για τη θερμοκρασία των $25^{\circ}C$. Ο παράγοντας της συγκέντρωσης του διαλύματος νιτρικού αργύρου είναι εξίσου καίριος, καθώς παρατηρείται ότι για τη συγκέντρωση $2 mM$ το μέσο μέγεθος των AgNPs είναι το μικρότερο και η σταθερότητα η υψηλότερη, αν και παρουσιάζει και τη μικρότερη ομοιογένεια. Γενικά, φαίνεται ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης αυξάνεται το μέσο μέγεθος των AgNPs, ενώ ταυτόχρονα ελαττώνεται η σταθερότητά τους, που δεν είναι επιθυμητά. Αναφορικά με την επίδραση της κατ' όγκο αναλογίας του διαλύματος νιτρικού αργύρου/εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας, για την αναλογία $90 / 10 v/v$ τα AgNPs παρουσιάζουν το μικρότερο μέγεθος με καλή ομοιογένεια και υψηλή σταθερότητα και ακολουθούν τα νανοσωματίδια για την αναλογία $95 / 5 v/v$ με λίγο μεγαλύτερο μέσο μέγεθος αλλά υψηλότερη σταθερότητα. Παρόλο που στην αναλογία $70 / 30 v/v$ τα AgNPs εμφανίζουν υψηλή ομοιογένεια και εξίσου μικρό μέσο μέγεθος, η σταθερότητά τους είναι χαμηλότερη. Τέλος, από τη μελέτη επίδρασης της ανάδευσης καθίσταται σαφές ότι με τη συνθήκη $180 rpm/15 min$ & $0 rpm$ επιτυγχάνεται το μικρότερο μέσο μέγεθος AgNPs, καλή ομοιογένεια και υψηλή σταθερότητα.

Σε αντίστοιχα αποτελέσματα και συμπεράσματα έχουν καταλήξει ερευνητές που χρησιμοποίησαν το DLS για τη μέτρηση του μέσου μεγέθους, του δείκτη πολυδιασποράς και του ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων που συνέθεσαν με τη χρήση εκχυλίσματος κυττάρων του μικροφύκου *Nannochloropsis* sp. [108], του κόκκινου φύκου *Gracilaria birdiae* [109] αλλά και εκχυλίσματος φύλλων *Clinacanthus nutans* [82]. Όμως, όπως έχει επισημανθεί, το μέσο μέγεθος των νανοσωματιδίων που προκύπτει από το DLS είναι συγκρίσιμο με το μέγεθος που μετράται από άλλες τεχνικές μόνο εάν το δείγμα είναι μονομερές, δηλαδή έχει μόνο μία κορυφή, και σφαιρικό ή σχεδόν σφαιρικό, δηλαδή έχει πολύ στενό πλάτος κατανομής. Επομένως, κρίνεται απαραίτητο να προσδιοριστεί το μέγεθός τους και με άλλη τεχνική για ασφαλέστερα συμπεράσματα.

3.3. Ανάλυση TEM

Πιο λεπτομερή μελέτη της μορφολογίας και του μεγέθους των AgNPs πραγματοποιήθηκε με ανάλυση TEM φωτεινού πεδίου και τη λήψη φωτογραφιών (Εικόνα 3.2). Τα νανοσωματίδια παρουσιάζονται με γκρι και μαύρο χρώμα και φαίνεται να είναι κολλημένα αλλά διακριτά μεταξύ τους. Το μέγεθός τους κυμαίνεται περίπου στα 30 – 50 nm και το σχήμα τους είναι σφαιρικό ή ελλειψοειδές. Οι περιοχές με αχνό γκρι χρώμα που τα περιβάλλουν είναι το οργανικό υλικό του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου, το οποίο είναι ισχυρά προσκολλημένο στην επιφάνειά τους και παρά τη χρήση

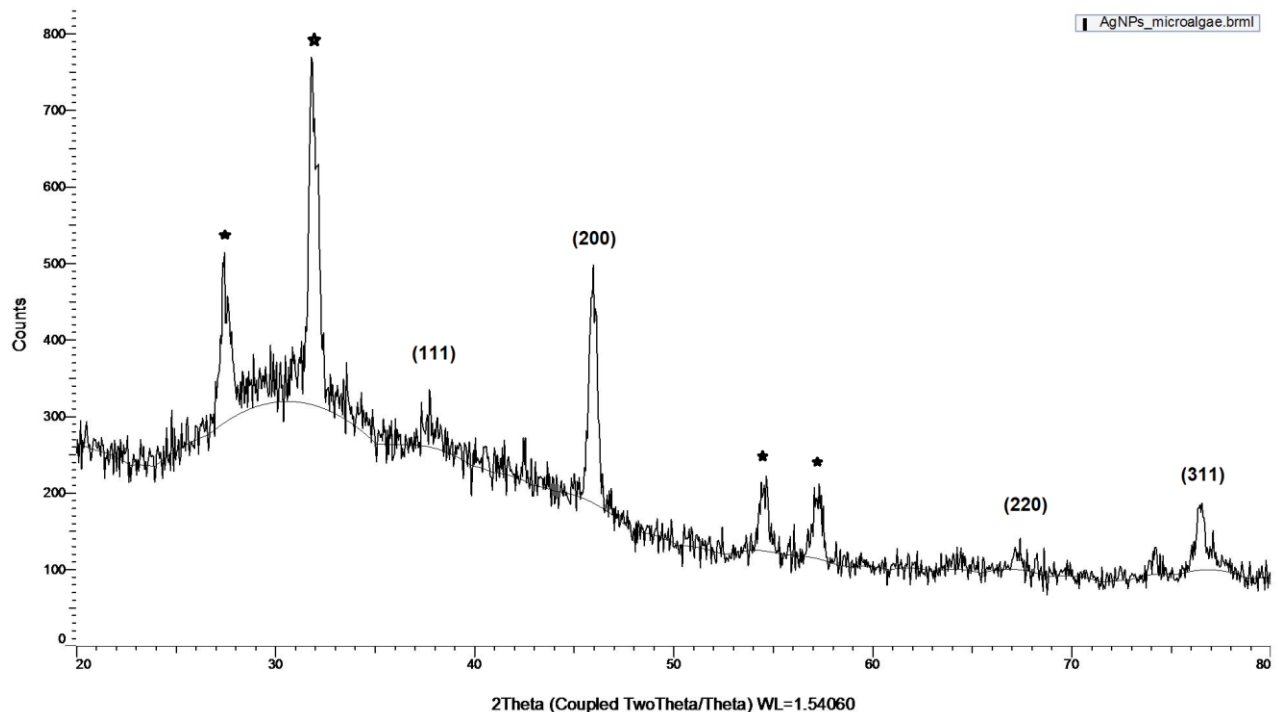


Εικόνα 3.2. Εικόνες φωτεινού πεδίου TEM των AgNPs (A) στα 200 nm (B) στα 200 nm (C) στα 100 nm (D) στα 100 nm (E) Περίθλαση ηλεκτρονίων επιλεγμένης περιοχής (SAED) των AgNPs

υπερήχων πριν τις αναλύσεις δεν καταστρέφεται. Διαπιστώνεται, επομένως, ότι τα AgNPs συσσωματώνονται σε έναν μικρό βαθμό, καθώς σχηματίζονται ή/και εγκλωβίζονται μέσα στα οργανικά βιομόρια, τα οποία δρουν ως αναγωγικοί ή/και σταθεροποιητικοί παράγοντες. Επιπλέον, διακρίνονται και νανοσωματίδια ακόμα μικρότερου μεγέθους ($< 30 \text{ nm}$) που ενδεχομένως βρίσκονται σε προγενέστερο στάδιο της σύνθεσης. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι τα πρωτογενή μικρότερα σφαιρικά AgNPs επικαλυμμένα με οργανικό υλικό συσσωματώνονται σε μικρό βαθμό σχηματίζοντας μεγαλύτερες δομές ακανόνιστου σχήματος που το μέγεθός τους ταιριάζει με το μέσο μέγεθος που προκύπτει από τις μετρήσεις DLS. Συνεπώς, καθίσταται σαφές ότι η μέθοδος DLS δεν επαρκεί, διότι μετράει το μέγεθος των δομών που σχηματίζουν τα νανοσωματίδια και υπεισέρχονται σφάλματα σχετικά με την παραδοχή της σφαιρικότητας των συσσωματωμάτων. Για τον λόγο αυτό το προσδιοριζόμενο μέγεθος που προκύπτει από το DLS είναι μεγαλύτερο συγκριτικά με την ανάλυση TEM, όπως έχει διαπιστωθεί και σε άλλες μελέτες [110], [111]. Αντιθέτως, με την ανάλυση TEM προκύπτουν ασφαλέστερα συμπεράσματα σχετικά με το μέγεθος και τη μορφολογία τους. Ακόμη, σε κάποια νανοσωματίδια διακρίνονται μαύρες παράλληλες γραμμές που δείχνουν τα πλεγματικά επίπεδα, δηλαδή τις πλεγματικές αποστάσεις στο πλέγμα του αργύρου. Όπως φαίνεται από το πρότυπο SAED, τα AgNPs είναι κρυσταλλικά χωρίς άμορφες περιοχές, καθώς σχηματίζονται φωτεινοί οι δακτύλιοι. Σύνθεση AgNPs παρόμοιου μεγέθους έχει πραγματοποιηθεί από το μικροφύκος *Trichodesmium erythraeum* σε σχήμα κυβικό [112], από το καφέ άλγος *Padina ranonia* σε διάφορα σχήματα (σφαιρικό, τριγωνικό, πολυεδρικό, εξαγωνικό) [113] και από τα άλγη *Caulerpa racemosa*, *Hypnea musciformis* και *Sargassum muticum* [114].

3.4. Ανάλυση XRD

Για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικότητας των AgNPs πραγματοποιήθηκε μέτρηση με τη μέθοδο περίθλασης ακτίνων-Χ και λήφθηκε το αντίστοιχο φάσμα (Διάγραμμα 3.16). Οι τέσσερις κορυφές των γωνιών 2θ στις τιμές περίπου $37,5^\circ$, 46° , 67° και $76,5^\circ$ αντιστοιχούν στα κρυσταλλογραφικά επίπεδα του αργύρου (111), (200), (220) και (311), αντίστοιχα. Συγκρίνοντας τις τιμές με γνωστά δεδομένα αποθηκευμένα σε τράπεζα δεδομένων (JCPDS file No. 04-0783) διαπιστώνεται ότι η κρυσταλλική δομή είναι εδροκεντρωμένη κυβική (Face-Centered Cubic, FCC), επιβεβαιώνοντας την κρυσταλλική φύση των AgNPs. Παρόμοια φάσματα XRD έχουν καταγραφεί για AgNPs που η σύνθεσή τους έχει γίνει με τη χρήση του μικροφύκου *Chlorella pyrenoidosa* [115] και του εκχυλίσματος φύλλων *Coleus aromaticus* [116]. Εκτός από τις κορυφές Bragg που είναι αντιπροσωπευτικές της δομής FCC των AgNPs, υπάρχουν επιπλέον κάποιες μη χαρακτηρισμένες κορυφές που είναι σημειωμένες με ένα αστέρι. Αυτές οι κορυφές ενδεχομένως να συνδέονται με την κρυσταλλικότητα της βιο-οργανικής φάσης στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, δηλαδή να οφείλονται στην παρουσία των οργανικών βιομορίων που περιέχονται στο εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου και προσκολλώνται στην επιφάνεια των AgNPs κατά



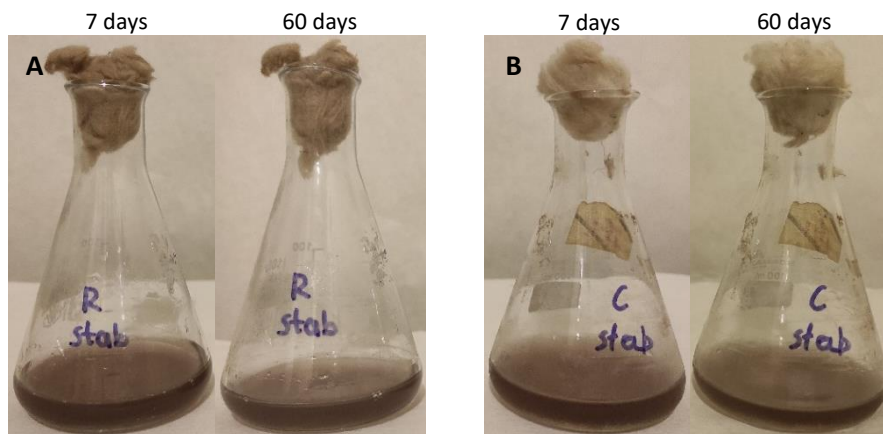
Διάγραμμα 3.16. Φάσμα XRD των συντεθειμένων AgNPs

τη διάρκεια της σύνθεσης δημιουργώντας το *carrying*. Αντίστοιχα αποτελέσματα και συμπεράσματα έχουν εξαχθεί για τη σύνθεση νανοσωματιδίων με εκχύλισμα εδώδιμου μανιταριού *Volvariella volvacea* [117] και εκχύλισμα φλοιού *Melia azedarach* [118].

3.5. Σταθερότητα νανοσωματιδίων αργύρου

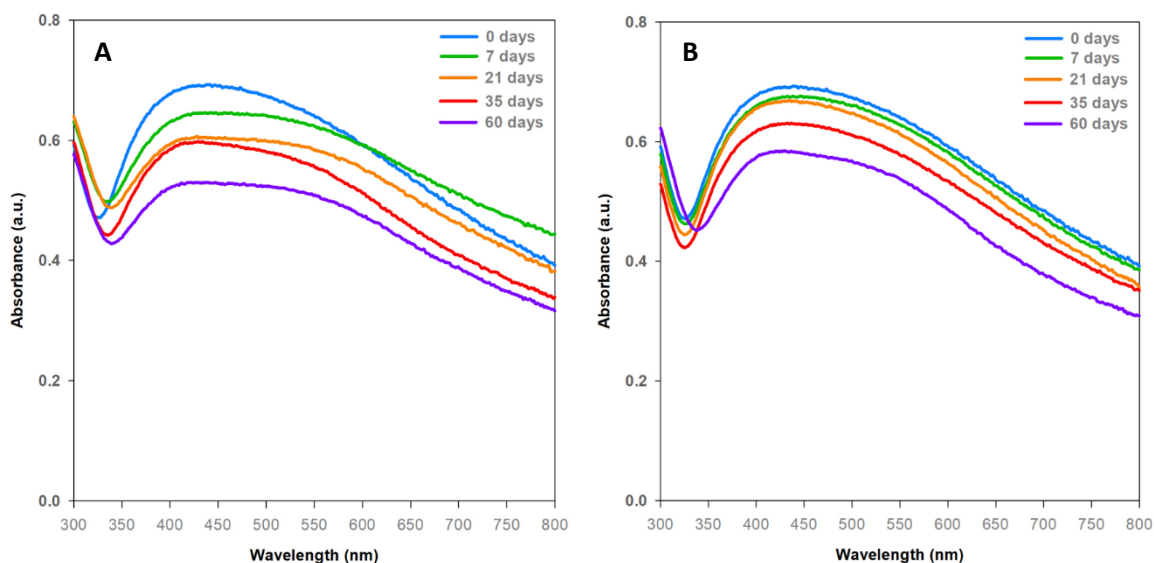
Για τη διερεύνηση της σταθερότητας των AgNPs στην πάροδο του χρόνου διατηρήθηκαν δείγματα νανοσωματιδίων επαναιωρημένα σε υπερκάθαρο νερό σε συνθήκες σκοταδιού και χωρίς ανάδευση. Οι συνθήκες αυτές επιλέχθηκαν, καθώς το φως και η ανάδευση μπορεί να αυξήσουν το ρυθμό συγκρούσεων μεταξύ των νανοσωματιδίων με αποτέλεσμα την ταχύτερη συσσωμάτωσή τους [119]. Πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στη σταθερότητα διατηρώντας δείγματα σε θερμοκρασία ψύξης 4°C και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για χρονικό διάστημα δύο μηνών και λαμβάνοντας δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Από τις φωτογραφίες επιβεβαιώνεται η παρουσία των AgNPs μετά από 60 ημέρες και στις δύο περιπτώσεις (Εικόνα 3.3).

Για τα δείγματα καταγραφόταν το φάσμα απορρόφησης UV-Vis. Από τα φάσματα διαπιστώνεται ότι για όλα τα δείγματα εμφανίζεται η χαρακτηριστική για τα AgNPs ζώνη SPR (Διάγραμμα 3.17). Με την πάροδο του χρόνου η μέγιστη απορρόφηση μειώνεται και για τις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης. Πιο



Εικόνα 3.3. Τα σταθεροποιημένα AgNPs μετά από 7 και 60 ημέρες αποθηκευμένα σε συνθήκες (A) δωματίου και (B) ψύξης

αναλυτικά, την ημέρα 0 η τιμή της μέγιστης απορρόφησης είναι 0,693 και μετά από 60 ημέρες ελαττώνεται στην τιμή 0,530 στις συνθήκες περιβάλλοντος και στην τιμή 0,585 στις συνθήκες ψύξης, δηλαδή κατά 23,5% και 15,9%, αντίστοιχα. Επιπλέον, από τα φάσματα φαίνεται ότι τα AgNPs και στις δύο συνθήκες παρουσιάζουν καλή ομοιογένεια τις πρώτες ημέρες, αλλά με την πάροδο του χρόνου το εύρος της ζώνης αυξάνεται σημαντικά υποδεικνύοντας αύξηση της ετερογένειας ιδιαίτερα στη θερμοκρασία περιβάλλοντος (Διάγραμμα 3.17). Αυτό πιθανόν οφείλεται στη σταδιακή συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων. Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ζ-δυναμικού για τη μελέτη του επιφανειακού φορτίου και της σταθερότητας των νανοσωματιδίων. Την ημέρα 0 η τιμή του ζ-δυναμικού είναι $-36,3 \pm 7,77$ και μετά από 60 ημέρες μειώνεται στην τιμή $-30,8 \pm 7,50$ για τη θερμοκρασία



Διάγραμμα 3.17. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τη σταθερότητα των AgNPs μετά από 7, 21, 35 και 60 ημέρες αποθηκευμένων σε συνθήκες (A) δωματίου και (B) ψύξης

περιβάλλοντος και στην τιμή $-35,5 \pm 7,49$ για τη θερμοκρασία ψύξης. Επομένως, σε χαμηλή θερμοκρασία η ελάττωση της σταθερότητας είναι μικρότερη, αλλά σε κάθε περίπτωση τα AgNPs παραμένουν πολύ σταθερά.

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις συμπεραίνεται ότι η σταθερότητα των AgNPs με τη χρήση εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* διατηρείται καλύτερα σε χαμηλές θερμοκρασίες. Το συμπέρασμα αυτό συνάδει με τα αποτελέσματα από τη μελέτη σταθερότητας AgNPs με τη χρήση εκχυλίσματος του φύκου *Parachlorella kessleri* [119]. Γενικά, η διατήρηση της σταθερότητας ενδέχεται να οφείλεται στις πρωτεΐνες που προσκολλώνται στα AgNPs και περιέχονται στο εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου [120], [121].

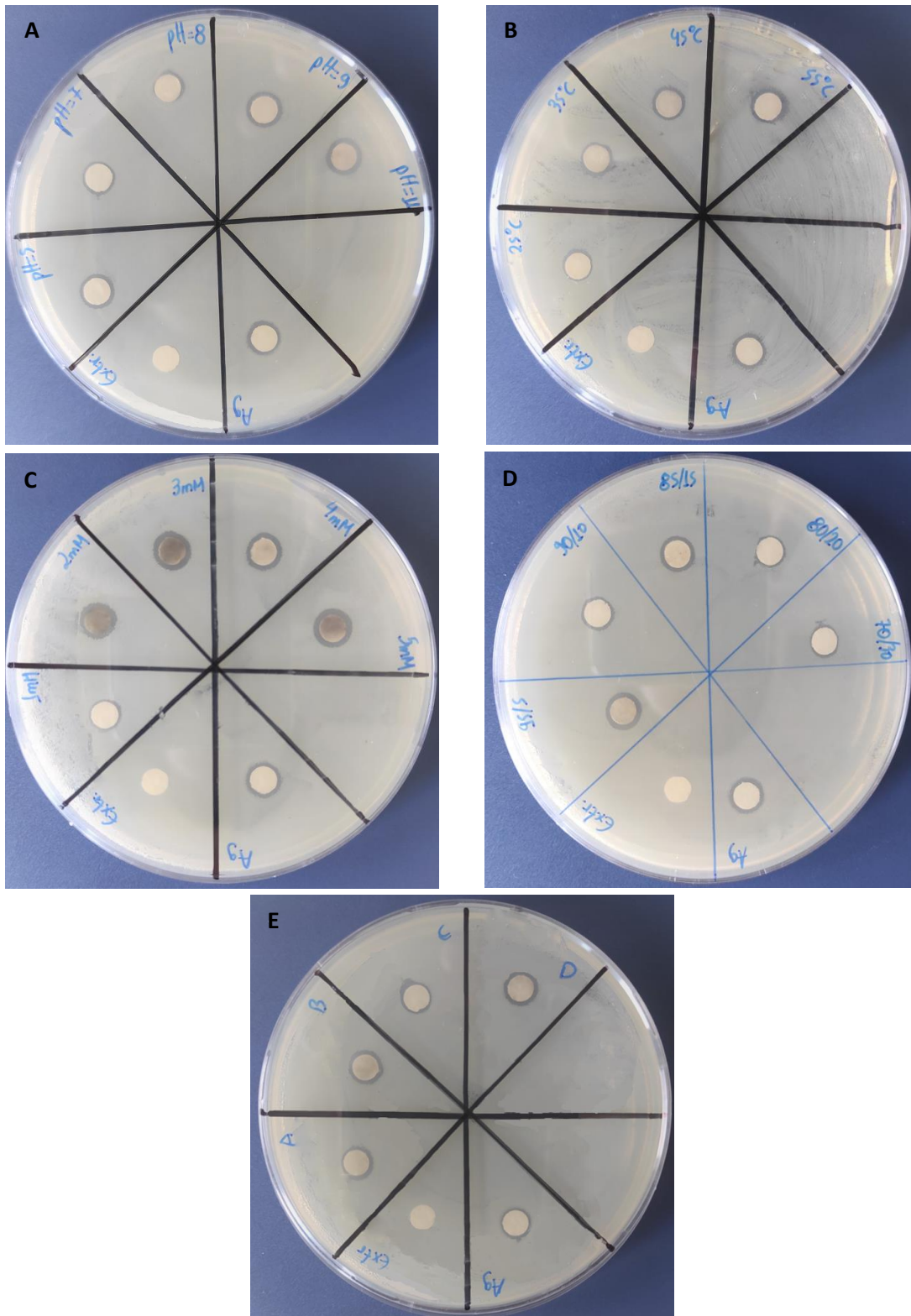
3.6. Αντιβακτηριακές ιδιότητες νανοσωματιδίων αργύρου

Η πιθανή αντιμικροβιακή δράση των AgNPs, η σύνθεση των οποίων πραγματοποιήθηκε με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis*, μελετήθηκε με τη μέθοδο διάχυσης δίσκου έναντι βακτηριακών κυττάρων *E. coli*, όπου η εμφάνιση ζώνης αναστολής αποτελεί απόδειξη της αναστολής της ανάπτυξης του βακτηρίου. Η εκτίμηση έγινε ποιοτικά με οπτική παρατήρηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής, συγκρίνοντας την επίδραση κάθε συνθήκης που μελετήθηκε. Το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου που χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό δείγμα δεν παρουσιάζει ζώνη αναστολής επιβεβαιώνοντας ότι δε διαθέτει αντιβακτηριακές ιδιότητες, ενώ για το διάλυμα νιτρικού αργύρου η ζώνη αναστολής είναι εμφανής αποδεικνύοντας την αντιβακτηριακή δράση του αργύρου. Σε γενικές γραμμές, τα AgNPs που συντέθηκαν υπό τις διάφορες συνθήκες σύνθεσης είχαν τουλάχιστον την ίδια ή και μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση συγκριτικά με τον άργυρο (Εικόνα 3.4).

Πιο αναλυτικά, από τη μελέτη επίδρασης του *pH* παρατηρείται ότι η διάμετρος της ζώνης αναστολής αυξάνεται για υψηλότερες τιμές του *pH*, με τη μεγαλύτερη να εμφανίζεται για $pH = 11$. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να συσχετιστεί με το μέγεθος των AgNPs, καθώς το μικρό μέγεθος είναι επιθυμητό για την πιο εύκολη διείσδυσή τους στις κυτταρικές μεμβράνες των βακτηρίων και όπως διαπιστώθηκε από τις μετρήσεις DLS μικρότερου μεγέθους είναι τα AgNPs για $pH = 11$ (Πίνακας 3.1).

Αναφορικά με τον παράγοντα της θερμοκρασίας, με την αύξησή της φαίνεται να αυξάνεται και η διάμετρος της ζώνης αναστολής. Η θερμοκρασία των $55^{\circ}C$ παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση παρά το μεγάλο μέγεθος των AgNPs, όπως προέκυψε από τις μετρήσεις DLS (Πίνακας 3.1). Ωστόσο, η αντιβακτηριακή δράση για τις θερμοκρασίες των $35^{\circ}C$ και $45^{\circ}C$ είναι επαρκής.

Εξετάζοντας την επίδραση της συγκέντρωσης του διαλύματος νιτρικού αργύρου, είναι φανερό ότι η ζώνη αναστολής για τις συγκεντρώσεις από 2 mM μέχρι 5 mM είναι παρόμοια και εμφανώς μεγαλύτερη από




Εικόνα 3.4. Αντιμικροβιακή δράση των AgNPs συντεθειμένων σε (A) διαφορετικά pH (5, 7, 8, 9 & 11) (B) διαφορετικές θερμοκρασίες (25°C, 35°C, 45°C & 55°C) (C) διαφορετικές συγκεντρώσεις δ/τος AgNO₃ (1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM & 5 mM) (D) διαφορετικές κατ' όγκο αναλογίες διαλύματος AgNO₃/εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας (95/5, 90/10, 85/15, 80/20 & 70/30) και (E) διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης (A: 180 rpm/15 min & 80 rpm, B: 180 rpm/15 min & 0 rpm, C: 0 rpm & D: 180 rpm) έναντι του βακτηρίου *E. coli* με τη μέθοδο της διάχυσης δίσκου

του τυφλού δείγματος αργύρου και της συγκέντρωσης 1 mM. Συνεπώς, η συγκέντρωση καθίσταται ίσως ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει τις αντιβακτηριακές ιδιότητες, που είναι λογικό λόγω του μεγαλύτερου αριθμού AgNPs που είναι διαθέσιμα να εισχωρήσουν στις βακτηριακές μεμβράνες.

Από τη μελέτη επίδρασης της κατ' όγκο αναλογίας του διαλύματος νιτρικού αργύρου/εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας προκύπτει ότι τα AgNPs για την αναλογία 95 / 5 v/v εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ζώνη αναστολής, η οποία είναι μεγαλύτερη και από τη ζώνη του τυφλού δείγματος αργύρου. Αντίθετα, για τις μικρότερες αναλογίες 80 / 20 v/v και 70 / 30 v/v η ζώνη αναστολής είναι οριακά διακριτή.

Οι συνθήκες ανάδευσης δε φαίνεται να επηρεάζουν την αντιβακτηριακή δράση των AgNPs, καθώς η ζώνη αναστολής που σχηματίζεται είναι παρόμοια για τις τέσσερις συνθήκες. Επίσης, είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη ζώνη του τυφλού δείγματος αργύρου.

Επομένως, το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* μπορεί να θεωρηθεί μία εξαιρετική επιλογή για τη σύνθεση AgNPs με στόχο την αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων *E. coli*. Έχει διαπιστωθεί ότι αντιβακτηριακή δράση έναντι κυττάρων *E. coli* παρουσιάζουν και AgNPs που η σύνθεσή τους έχει πραγματοποιηθεί με το πράσινο φύκος *Spirogyra varians* [122], τα μικροφύκη *Chaetoceros calcitrans*, *Chlorella salina*, *Isochrysis galbana* και *Tetraselmis gracilis* [123], το κυανοβακτήριο *Spirulina platensis* [124] και το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* [125].



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:
Συμπεράσματα και
Μελλοντικές Προκλήσεις

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Συμπεράσματα και Μελλοντικές Προκλήσεις

4.1. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα σύνθεσης AgNPs με τη χρήση του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis*. Η μελέτη αφορούσε την επίδραση διαφόρων συνθηκών στη σύνθεση των νανοσωματιδίων, τα χαρακτηριστικά τους και τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες. Οι παράγοντες που διερευνήθηκαν ήταν η σύνθεση σε φως ή σκοτάδι, το *pH* του υδατικού διαλύματος νιτρικού αργύρου, η θερμοκρασία σύνθεσης, η συγκέντρωση του νιτρικού αργύρου στο υδατικό διάλυμα, η κατ' όγκο αναλογία του διαλύματος νιτρικού αργύρου με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας και η ανάδευση. Η σύνθεση των AgNPs μελετήθηκε με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Πληροφορίες για το μέγεθος, το σχήμα, τη διασπορά και τη σταθερότητα αντλήθηκαν από μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) και από εικόνες TEM, ενώ για τη κρυσταλλικότητα από το φάσμα περίθλασης ακτίνων-Χ (XRD). Η αντιμικροβιακή δράση των AgNPs εξετάστηκε ποιοτικά με τη μέθοδο διάχυσης δίσκου έναντι κυττάρων του βακτηρίου *E. coli*.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας των τεσσάρων μικροφυκών *H. pluvialis*, *N. oceanica*, *C. vulgaris* και *S. almeriensis*, ως βιολογικό μέσο για τη σύνθεση των AgNPs. Η σύνθεση επιτεύχθηκε για τα μικροφύκη *H. pluvialis*, *C. vulgaris* και *S. almeriensis*. Τα νανοσωματίδια που σχηματίστηκαν στις τρεις περιπτώσεις αναμένεται να είναι σφαιρικά, με μέγεθος μικρότερο από 100 nm και με καλή ομοιογένεια, όπως προέκυψε από τη μελέτη των φασμάτων UV-Vis. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι η σύνθεση με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* ήταν ταχύτερη και η ποσότητα των AgNPs που σχηματίστηκαν μεγαλύτερη συγκριτικά με τα μικροφύκη *C. vulgaris* και *S. almeriensis*. Επιπλέον, αποδείχτηκε ότι η σύνθεση είναι δυνατή και με τη χρήση αλκοολικού εκχυλίσματος των κυττάρων του μικροφύκου *H. pluvialis* χωρίς, όμως, να μελετηθεί περισσότερο στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Η σύνθεση AgNPs υπό συνεχή φωτισμό οδήγησε στην παραγωγή νανοσωματιδίων μέσου μέγεθους 189,5 nm, πολύ καλής ομοιογένειας (τιμή δείκτη πολυδιασποράς 0,226) και υψηλής σταθερότητας (τιμή ζ-δυναμικού $-40,4 \pm 8,41$), όπως προέκυψε από τις μετρήσεις DLS. Αντιθέτως, από τη μελέτη των φασμάτων UV-Vis προέκυψε ότι απουσία φωτός δεν υπήρχε η χαρακτηριστική για τα AgNPs ζώνη SPR, υποδεικνύοντας ότι δεν είναι εφικτή η σύνθεση στον χρόνο που μελετήθηκε (24 h).

Το *pH* του μέσου σύνθεσης αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος και το σχήμα των νανοσωματιδίων, γιατί το ηλεκτρικό φορτίο των βιομορίων που λειτουργούν ως αναγωγικοί και σταθεροποιητικοί παράγοντες αλλάζει σημαντικά σε διαφορετικές συνθήκες *pH* μεταβάλλοντας την ικανότητά τους να ανάγουν τα μεταλλικά ιόντα και να προσδένονται στην επιφάνεια του αργύρου. Σε υψηλά *pH* επιταχύνεται ο ρυθμός αναγωγής των μεταλλικών ιόντων, εξαιτίας των

ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων λειτουργικών ομάδων, όπως οι καρβοξυλομάδες, και των θετικά φορτισμένων ιόντων αργύρου, και κατ' επέκταση σχηματίζονται περισσότερες περιοχές πυρήνωσης λόγω της παρουσίας ιόντων OH^- οδηγώντας στη δημιουργία νανοσωματιδίων μικρότερου μεγέθους. Υψηλότερη απόδοση, μικρότερο μέσο μέγεθος AgNPs και χαμηλότερος δείκτης πολυδιασποράς καταγράφηκαν για $pH = 11$. Παρ' όλα αυτά παρατηρήθηκε ότι η σταθερότητα των AgNPs για το pH αυτό ήταν αρκετά μικρότερη. Το αμέσως χαμηλότερο pH που μελετήθηκε, το $pH = 9$, εμφάνισε την αμέσως επόμενη καλύτερη απόδοση, μέσο μέγεθος AgNPs 191,9 nm με πολύ καλή ομοιογένεια (τιμή δείκτη πολυδιασποράς 0,258) και υψηλή σταθερότητα (τιμή ζ-δυναμικού $-28,6 \pm 6,30$), όπως προέκυψε από τις μετρήσεις DLS.

Η θερμοκρασία επηρεάζει σημαντικά τη σύνθεση των νανοσωματιδίων, καθώς με την αύξησή της αυξάνεται ο ρυθμός αναγωγής των μεταλλικών ιόντων και σύνθεσης των νανοσωματιδίων αλλά παρατηρήθηκε ότι παράλληλα αυξάνεται και το μέσο μέγεθος, η ετερογένεια και η τάση συσσωμάτωσης των AgNPs. Η θερμοκρασία των $45^\circ C$ παρουσίασε υψηλή απόδοση και μέσο μέγεθος AgNPs 159,5 nm με καλή ομοιογένεια (τιμή δείκτη πολυδιασποράς 0,341) και υψηλή σταθερότητα (τιμή ζ-δυναμικού $-32,9 \pm 6,46$), όπως προέκυψε από τις μετρήσεις DLS. Περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε στην ταχύτερη σύνθεση μεγαλύτερης ποσότητας AgNPs αλλά όχι με αντίστοιχα χαρακτηριστικά λόγω του φαινομένου της συσσωμάτωσης.

Η συγκέντρωση των ιόντων της πρόδρομης ένωσης που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των AgNPs είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό κυρίως την απόδοση αλλά και τη μορφολογία των νανοσωματιδίων. Η αύξηση της συγκέντρωσης του νιτρικού αργύρου οδήγησε στην ταχύτερη σύνθεση μεγαλύτερης ποσότητας AgNPs αλλά μεγαλύτερου μέσου μεγέθους και χαμηλότερης σταθερότητας. Συνεκτιμώντας όλα τα χαρακτηριστικά και δίνοντας μεγαλύτερη βαρύτητα στο μέγεθος και τη σταθερότητα, ως βέλτιστη συγκέντρωση προσδιορίστηκε η συγκέντρωση 2 mM. Τα σχηματιζόμενα AgNPs είχαν μέσο μέγεθος 145,4 nm, υψηλή σταθερότητα (τιμή ζ-δυναμικού $-33,0 \pm 7,95$) και σχετικά καλή ομοιογένεια (τιμή δείκτη πολυδιασποράς 0,377), όπως προέκυψε από τις μετρήσεις DLS.

Η απόδοση της σύνθεσης και η σταθερότητα των νανοσωματιδίων είναι συνάρτηση της κατ' όγκο αναλογίας διαλύματος του νιτρικού αργύρου/εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου. Η αναλογία 90 / 10 v/v παρουσίασε την υψηλότερη απόδοση και ταυτόχρονα μέσο μέγεθος AgNPs 125,0 nm με καλή ομοιογένεια (τιμή δείκτη πολυδιασποράς 0,322) και υψηλή σταθερότητα (τιμή ζ-δυναμικού $-30,5 \pm 6,84$), όπως προέκυψε από τις μετρήσεις DLS.

Από τη μελέτη επίδρασης των συνθηκών ανάδευσης στη σύνθεση νανοσωματιδίων φαίνεται ότι στην αρχή της σύνθεσης η ισχυρή ανάδευση συμβάλλει στην καλή ανάμιξη των βιολογικών μορίων με τα

μεταλλικά ιόντα αλλά στη συνέχεια απαιτείται πιο ήπια ανάδευση, ώστε τα βιολογικά μόρια του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας να προσδεθούν καλύτερα στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Αντίθετα, η έντονη και παρατεταμένη ανάδευση οδηγεί σε περισσότερες συγκρούσεις μεταξύ των νανοσωματιδίων και κατά συνέπεια στον σχηματισμό συσσωματωμάτων και στην αποσταθεροποίησή τους. Για τη συνθήκη 180 rpm/15 min & 0 rpm επιτεύχθηκε υψηλή απόδοση, μέσο μέγεθος AgNPs 167,3 nm με καλή ομοιογένεια (τιμή δείκτη πολυδιασποράς 0,293) και υψηλή σταθερότητα (τιμή ζ-δυναμικού $-35,4 \pm 7,83$), όπως προέκυψε από τις μετρήσεις DLS.

Συμπερασματικά, από τη μελέτη προέκυψε ότι οι βέλτιστες συνθήκες για τη σύνθεση των AgNPs είναι ο συνεχής φωτισμός, το pH ίσο με 9 στο υδατικό διάλυμα νιτρικού αργύρου, η θερμοκρασία των 45°C, η 2 mM συγκέντρωση του νιτρικού αργύρου στο υδατικό διάλυμα, η 90 / 10 κατ' όγκο αναλογία του διαλύματος νιτρικού αργύρου με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας και η συνθήκη ανάδευσης 180 rpm/15 min & 0 rpm. Τα AgNPs έχουν αρνητικό επιφανειακό φορτίο και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων μπορούν να χαρακτηριστούν ως μετρίως ή πολύ σταθερά (τιμές ζ-δυναμικού από $-18,2 \pm 5,15$ μέχρι $-40,4 \pm 8,41$) με ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους (τιμές δείκτη πολυδιασποράς από 0,177 έως 0,418).

Η μορφολογία και το μέγεθος των AgNPs προσδιορίστηκε με ανάλυση TEM φωτεινού πεδίου. Το σχήμα τους προσδιορίστηκε ως σφαιρικό ή ελλειψοειδές και το μέγεθός τους περίπου 30 – 50 nm, ενώ παρατηρήθηκε ότι τα νανοσωματίδια συσσωματώνονται σε έναν μικρό βαθμό, καθώς σχηματίζονται ή/και εγκλωβίζονται μέσα στο οργανικό υλικό του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis*. Σε αυτό οφείλεται και το γεγονός ότι το μέσο μέγεθος που μετρήθηκε με το DLS είναι κατά πολύ μεγαλύτερο συγκριτικά με αυτό που προσδιορίζεται με την ανάλυση TEM. Ακόμη, από την περίθλαση ηλεκτρονίων επιλεγμένης περιοχής (SAED) φαίνεται ότι τα AgNPs είναι κρυσταλλικά χωρίς άμορφες περιοχές.

Η κρυσταλλικότητα των νανοσωματιδίων αργύρου προσδιορίστηκε και με τη μέθοδο περίθλασης ακτίνων-X (XRD) και διαπιστώθηκε ότι η κρυσταλλική δομή είναι εδροκεντρωμένη κυβική (Face-Centered Cubic, FCC), επιβεβαιώνοντας την κρυσταλλική φύση των AgNPs. Επιπλέον, εντοπίστηκαν και κάποιες μη χαρακτηρισμένες κορυφές που ενδεχομένως οφείλονται στην παρουσία των οργανικών βιομορίων που περιέχονται στο εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* και προσκολλώνται στην επιφάνεια των AgNPs κατά τη διάρκεια της σύνθεσης δημιουργώντας το capping.

Η σταθερότητα των AgNPs διερευνήθηκε σε δύο θερμοκρασίες (4°C και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος) για χρονικό διάστημα δύο μηνών. Μετά το πέρας των δύο μηνών παρατηρήθηκε μείωση της μέγιστης απορρόφησής τους κατά 15,9% και 23,5%, αντίστοιχα, αύξηση της ετερογένειάς τους, πιθανόν λόγω

σταδιακής συσσωμάτωσης, ενώ η σταθερότητά τους διατηρήθηκε υψηλή. Επομένως, φαίνεται η σταθερότητα των AgNPs να διατηρείται καλύτερα σε χαμηλές θερμοκρασίες (4°C).

Η πιθανή αντιμικροβιακή δράση των AgNPs μελετήθηκε ποιοτικά με τη μέθοδο διάχυσης δίσκου έναντι βακτηριακών κυττάρων *E. coli*. Το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας δε διαθέτει αντιβακτηριακές ιδιότητες, αλλά όλα τα AgNPs που συντέθηκαν υπό τις διάφορες συνθήκες σύνθεσης εμφάνισαν ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του βακτηρίου, υποδεικνύοντας τουλάχιστον την ίδια ή και μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση συγκριτικά με τον άργυρο.

Εν κατακλείδι, συμπεραίνεται ότι το μικροφύκος *H. pluvialis* αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο υποψήφιο για τη πράσινη σύνθεση AgNPs, ιδιαίτερα με τη χρήση του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου, παρουσιάζοντας εξαιρετικές αντιβακτηριακές ιδιότητες έναντι βακτηριακών κυττάρων *E. coli*. Στα πλαίσια της λογικής της εκμετάλλευσης του συνόλου μίας καλλιέργειας, καθώς και λόγω της απλότητας της μεθόδου αναδεικνύονται ακόμη περισσότερο τα οφέλη που θα μπορούσε να έχει η περαιτέρω έρευνα και μία πιθανή κλιμάκωση της σύνθεσης.

4.2. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα διπλωματική εργασία ήταν ενθαρρυντικά για τη σύνθεση AgNPs με τη χρήση του εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis*, καθιστώντας σαφές ότι αποτελεί ένα υποσχόμενο υποψήφιο μικροφύκος για την πράσινη σύνθεση AgNPs. Στις προτάσεις για περαιτέρω έρευνα περιλαμβάνονται:

- ❖ Η μελέτη και άλλων παραγόντων που πιθανόν να επηρεάζουν την απόδοση της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά (μέγεθος, σχήμα, σταθερότητα) των σχηματιζόμενων AgNPs, όπως η ένταση του χρησιμοποιούμενου φωτός ως πηγή φωτεινής ενέργειας, η σύνθεση υπό συνθήκες βαθμίδωσης θερμοκρασίας και η φάση ανάπτυξης του μικροφύκου (εκθετική, φάση επιβράδυνσης της ανάπτυξης).
- ❖ Η μαθηματική μοντελοποίηση της σύνθεσης με τη βοήθεια του κατάλληλου πειραματικού σχεδιασμού
- ❖ Η διερεύνηση της σύνθεσης του carrying, δηλαδή των οργανικών μορίων που καλύπτουν τα AgNPs και δρουν ως σταθεροποιητικοί παράγοντες. Προς αυτή την κατεύθυνση μπορεί να πραγματοποιηθεί ανάλυση των συντεθειμένων AgNPs με τη μέθοδο FTIR.
- ❖ Η μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης των AgNPs σε περισσότερα θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια και ο ποσοτικός προσδιορισμός της με τη μέτρηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής.
- ❖ Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των AgNPs.

- ❖ Η διερεύνηση της αντιμυκητιασικής, της αντιοξειδωτικής και της φωτοκαταλυτικής δράσης (π.χ. στην αποικοδόμηση χρωστικών) των AgNPs. Επιπλέον, θα μπορούσε να διερευνηθεί η χρήση τους σε συστήματα στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων (drug delivery system), στην επούλωση πληγών, σε (βιο)αισθητήρες και στην επεξεργασία λυμάτων.
- ❖ Η διερεύνηση της δυνατότητας σύνθεσης AgNPs με το ίδιο μικροφύκος με τη χρήση εκχυλίσματος κυττάρων ή καλλιέργειας ζωντανών κυττάρων.
- ❖ Η διερεύνηση της δυνατότητας σύνθεσης νανοσωματιδίων διαφορετικών μετάλλων, όπως χρυσού, και διμετάλλων, όπως χρυσού/αργύρου, με το μικροφύκος *H. pluvialis*.

The background of the page features abstract, flowing green lines that originate from the left side and curve downwards and to the right. The lines vary in opacity and color, ranging from a vibrant lime green to a pale, almost white green, creating a sense of movement and depth. The overall composition is clean and modern.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(9), 1534
- [2] Chaudhary, R., Nawaz, K., Khan, A. K., Hano, C., Abbasi, B. H., Anjum, S. (2020). An Overview of the Algae-Mediated Biosynthesis of Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Biomolecules*, *10* (11), 1498
- [3] Joudeh, N., Linke, D. (2022). Nanoparticle Classification, Physicochemical Properties, Characterization, and Applications: A Comprehensive Review for Biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, *20* (1)
- [4] Xu, L., Wang, Y. Y., Huang, J., Chen, C. Y., Wang, Z.-X., Xie, H. (2020). Silver Nanoparticles: Synthesis, Medical Applications and Biosafety. *Theranostics*, *10* (20), 8996-9031
- [5] Burduşel, A. C., Gherasim, O., Grumezescu, A. M., Mogoantă, L., Ficăi, A., Andronescu, E. (2018). Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An up-to-Date Overview. *Nanomaterials*, *8* (9), 681
- [6] Chugh, D., Viswamalya, V. S., Das, B. (2021). Green Synthesis of Silver Nanoparticles with Algae and the Importance of Capping Agents in the Process. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *19* (1)
- [7] Abeer Mohammed, A. B., Abd Elhamid, M. M., Khalil, M. K., Ali, A. S., Abbas, R. N. (2022). The Potential Activity of Biosynthesized Silver Nanoparticles of *Pseudomonas Aeruginosa* as an Antibacterial Agent against Multidrug-Resistant Isolates from Intensive Care Unit and Anticancer Agent. *Environmental Sciences Europe*, *34* (1)
- [8] What is nanotechnology? In: National Nanotechnology Initiative. Retrieved January 26, 2023, from <https://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>
- [9] Khan, S., Mansoor, S., Rafi, Z., Kumari, B., Shoaib, A., Saeed, M., Alshehri, S., Ghoneim, M. M., Rahamathulla, M., Hani, U., Shakeel, F. (2022). A Review on Nanotechnology: Properties, Applications, and Mechanistic Insights of Cellular Uptake Mechanisms. *Journal of Molecular Liquids*, *348*, 118008
- [10] Pabbati, R., Kondakindi, V.R., Shaik, F. (2021). Applications of Nanomaterials in Biomedical Engineering. In: Maddela, N.R., Chakraborty, S., Prasad, R. (eds) *Nanotechnology for Advances in Medical Microbiology. Environmental and Microbial Biotechnology*. Springer, Singapore
- [11] Logothetidis, S. (2012). *Nanomedicine and Nanobiotechnology*. NanoScience and Technology. Springer, Berlin, Heidelberg
- [12] Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., Danquah, M. K. (2018). Review on Nanoparticles and Nanostructured Materials: History, Sources, Toxicity and Regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *9*, 1050-1074

- [13] Malakar, A., Kanel, S. R., Ray, C., Snow, D. D., Nadagouda, M. N. (2021). Nanomaterials in the Environment, Human Exposure Pathway, and Health Effects: A Review. *Science of The Total Environment*, 759, 143470
- [14] Teleanu, D., Chircov, C., Grumezescu, A., Volceanov, A., Teleanu, R. (2018). Impact of Nanoparticles on Brain Health: An up to Date Overview. *Journal of Clinical Medicine*, 7 (12), 490
- [15] Hong, Y., Huh, Y. M., Yoon, D. S., Yang, J. (2012). Nanobiosensors based on localized surface plasmon resonance for biomarker detection. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 1-13
- [16] Oldenburg, S. Silver Nanomaterials: Properties & Applications. In: Merck. Retrieved January 30, 2023, from <https://www.sigmaaldrich.cn/CN/en/technical-documents/technical-article/materials-science-and-engineering/biosensors-and-imaging/silver-nanomaterials-properties>
- [17] Pithawalla, Y. B., El-Shall, M. S., Deevi, S. C., Ström, V., Rao, K. V. (2001). Synthesis of Magnetic Intermetallic Feal Nanoparticles from a Non-Magnetic Bulk Alloy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105 (11), 2085-2090
- [18] Guo, D., Xie, G., Luo, J. (2013). Mechanical Properties of Nanoparticles: Basics and Applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 47 (1), 013001
- [19] Shima, P. D., Philip, J., & Raj, B. (2009). Role of microconvection induced by Brownian motion of nanoparticles in the enhanced thermal conductivity of stable nanofluids. *Applied Physics Letters*, 94(22), 223101
- [20] Eastman, J. A., Choi, S. U. S., Li, S., Yu, W., & Thompson, L. J. (2001). Anomalously increased effective thermal conductivities of ethylene glycol-based nanofluids containing copper nanoparticles. *Applied Physics Letters*, 78(6), 718-720
- [21] Jun, Y., Seo, J., & Cheon, J. (2008). Nanoscaling Laws of Magnetic Nanoparticles and Their Applicabilities in Biomedical Sciences. *Accounts of Chemical Research*, 41(2), 179-189
- [22] Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2007). *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*. Αθήνα: Κωσταράκη
- [23] Fultz, B., Howe, J. (2013). The TEM and Its Optics. In: *Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials*. Graduate Texts in Physics. Springer, Berlin, Heidelberg
- [24] Κυριακίδης, Γ., Μπίνας, Β. (2014). *Ηλεκτρονική Μικροσκοπία*. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο
- [25] Xie, Z. X., Tzeng, W. C., & Huang, C. L. (2016). One-Pot Synthesis of Icosahedral Silver Nanoparticles by Using a Photoassisted Tartrate Reduction Method under UV Light with a Wavelength of 310 nm. *ChemPhysChem*, 17(16), 2551-2557
- [26] Mukherji, S.; Bharti, S.; Shukla, G. (2018). Synthesis and Characterization of Size- and Shape-Controlled Silver Nanoparticles. *Physical Sciences Reviews*, 4 (1)
- [27] Bhattacharjee, S. (2016). DLS and Zeta potential – what they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337-351
- [28] Malvern Instruments Ltd (2004). *Zetasizer Nano Series User Manual*. United Kingdom

- [29] Epp, J. (2016). X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization. *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*, 81-124
- [30] Zeta potential. In: Wikipedia. Retrieved December 12, 2022, from https://en.wikipedia.org/wiki/Zeta_potential
- [31] Mukherjee, A., Sarkar, D., Sasmal, S. (2021). A review of green synthesis of metal nanoparticles using algae. *Frontiers in Microbiology*, 12, 693899
- [32] Alexander, J. W. (2009). History of the Medical Use of Silver. *Surgical Infections*, 10(3), 289-292
- [33] Falconer, J. L., & Grainger, D. W. (2017). 1.4 Silver Antimicrobial Biomaterials. *Comprehensive Biomaterials II*, 79-91
- [34] Chernousova, S., & Epple, M. (2012). Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(6), 1636-1653
- [35] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 24470, Silver Nitrate. Retrieved February 2, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Silver-Nitrate>
- [36] Htwe, Y. Z. N., Abdullah, M. K., Mariatti, M. (2022). Water-Based Graphene/AgNps Hybrid Conductive Inks for Flexible Electronic Applications. *Journal of Materials Research and Technology*, 16, 59-73
- [37] Hao, Y., Song, J., Yang, F., Hao, Y., Sun, Q., Guo, J., ... Zhu, F. (2015). Improved performance of organic solar cells by incorporating silica-coated silver nanoparticles in the buffer layer. *Journal of Materials Chemistry C*, 3(5), 1082-1090
- [38] Rajkumar, R., Ezhumalai, G., & Gnanadesigan, M. (2021). A green approach for the synthesis of silver nanoparticles by *Chlorella vulgaris* and its application in photocatalytic dye degradation activity. *Environmental Technology & Innovation*, 21, 101282
- [39] Mo, F., Zhou, Q., He, Y. Nano-AG. (2022). Environmental Applications and Perspectives. *Science of The Total Environment*, 829, 154644
- [40] Gupta, N., Upadhyaya, C.P., Singh, A., Abd-Elsalam, K.A., Prasad, R. (2018). *Applications of Silver Nanoparticles in Plant Protection*. In: Abd-Elsalam, K., Prasad, R. (eds) Nanobiotechnology Applications in Plant Protection. Nanotechnology in the Life Sciences. Springer, Cham
- [41] Istiqola, A., & Syafiuddin, A. (2020). A review of silver nanoparticles in food packaging technologies: Regulation, methods, properties, migration, and future challenges. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 67(11), 1942-1956
- [42] Liao, C., Li, Y., Tjong, S. (2019). Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (2), 449
- [43] Lee, S., Jun, B.-H. (2019). Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (4), 865

- [44] Rai, M., Yadav, A., Gade, A. (2009). Silver Nanoparticles as a New Generation of Antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27 (1), 76-83
- [45] Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., Chu, C. H. (2020). The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15, 2555-2562
- [46] Khan, I., Saeed, K., Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12 (7), 908-931
- [47] Rafique, M., Sadaf, I., Rafique, M. S., Tahir, M. B. (2016). A Review on Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45 (7), 1272-1291
- [48] Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., Ikram, S. (2016). A Review on Plants Extract Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles for Antimicrobial Applications: A Green Expertise. *Journal of Advanced Research*, 7 (1), 17-28
- [49] Lazarus, L. L., Riche, C. T., Malmstadt, N., Brutchey, R. L. (2012). Effect of Ionic Liquid Impurities on the Synthesis of Silver Nanoparticles. *Langmuir*, 28 (45), 15987-15993
- [50] Richter, K., Campbell, P. S., Baecker, T., Schimitzek, A., Yaprak, D., Mudring, A.-V. (2013). Ionic Liquids for the Synthesis of Metal Nanoparticles. *physica status solidi (b)*, 250 (6), 1152-1164
- [51] Barsanti, L. & Gualtieri, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC Press, Boca Raton
- [52] Carlsson, S. A., Beilen, J. Möller, R., Clayton, D. (2007). *MICRO- AND MACRO-ALGAE: UTILITY FOR INDUSTRIAL APPLICATIONS*. CPL Press, UK
- [53] Brennan, L., Owende, P. (2010). Biofuels from Microalgae-a Review of Technologies for Production, Processing, and Extractions of Biofuels and Co-Products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (2), 557-577
- [54] Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S. (2010). Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (1), 217-232
- [55] Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N. A., Sridhar, S., Rengasamy, R. (2008). A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae. *Critical Reviews in Microbiology*, 34 (2), 77-88
- [56] Bitog, J. P., Lee, I.-B., Lee, C.-G., Kim, K.-S., Hwang, H.-S., Hong, S.-W., Seo, I.-H., Kwon, K.-S., Mostafa, E. (2011). Application of Computational Fluid Dynamics for Modeling and Designing Photobioreactors for Microalgae Production: A Review. *Computers and Electronics in Agriculture*, 76 (2), 131-147
- [57] AlgaeBase. Retrieved February 7, 2023, from <https://www.algaebase.org/>
- [58] Culture Collection of algae & protozoa. CCAP 34/7 Haematococcus lacustris. Retrieved February 7, 2023, from <https://www.ccap.ac.uk/catalogue/strain-34-7>

- [59] Culture Collection of algae & protozoa. CCAP 849/10 *Nannochloropsis oceanica*. Retrieved February 7, 2023, from <https://www.ccap.ac.uk/catalogue/strain-849-10>
- [60] Algae Research and Supply. ALGAE RESEARCH SUPPLY: ALGAE CULTURE CHLORELLA VULGARIS. Retrieved February 7, 2023, from <https://algaeresearchsupply.com/products/algae-culture-chlorella-vulgaris>
- [61] Culture Collection of algae & protozoa. CCAP 276/41 *Scenedesmus* sp.. Retrieved February 7, 2023, from <https://www.ccap.ac.uk/catalogue/strain-276-41>
- [62] Oslan, S. N., Shoparwe, N. F., Yusoff, A. H., Rahim, A. A., Chang, C. S., Tan, J. S., Oslan, S. N., Arumugam, K., Ariff, A. B., Sulaiman, A. Z., Mohamed, M. S. (2021). A Review on *Haematococcus Pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin. *Biomolecules*, 11 (2), 256
- [63] Ma, X.-N., Chen, T.-P., Yang, B., Liu, J., Chen, F. (2016). Lipid Production from *Nannochloropsis*. *Marine Drugs*, 14 (4), 61
- [64] Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, Composition, Production, Processing and Applications of *Chlorella Vulgaris*: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278
- [65] Sarawak Biodiversity Center. *Scenedesmus* sp.. Retrieved February 7, 2023, from <https://www.sbc.org.my/programmes/187-english-categories/programmes/r-d-laboratories/algae-research/featured-algae/866-scenedesmus>
- [66] Ritu, J. R., Ambati, R. R., Ravishankar, G. A., Shahjahan, M., Khan, S. (2022). Utilization of Astaxanthin from Microalgae and Carotenoid Rich Algal Biomass as a Feed Supplement in Aquaculture and Poultry Industry: An Overview. *Journal of Applied Phycology*, 35 (1), 145-171
- [67] Abou El-Nour, K. M. M., Eftaiha, A., Al-Warthan, A., Ammar, R. A. A. (2010). Synthesis and Applications of Silver Nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 3 (3), 135-140
- [68] Dahoumane, S. A., Mechouet, M., Alvarez, F. J., Agathos, S. N., Jeffryes, C. (2016). Microalgae: An Outstanding Tool in Nanotechnology. *Bionatura*, 1 (4)
- [69] Patel, V., Berthold, D., Puranik, P., & Gantar, M. (2015). Screening of cyanobacteria and microalgae for their ability to synthesize silver nanoparticles with antibacterial activity. *Biotechnology Reports*, 5, 112-119
- [70] Savvidou, M. G., Ferraro, A., Hristoforou, E., Mamma, D., Kekos, D., & Kolisis, F. N. (2020). Incorporation of magnetic nanoparticles into protoplasts of microalgae *Haematococcus pluvialis*: A tool for biotechnological applications. *Molecules*, 25(21), 5068
- [71] Savvidou, M. G., Boli, E., Logothetis, D., Lymperopoulou, T., Ferraro, A., Louli, V., ... Kolisis, F. N. (2020). A study on the effect of macro- and micro- nutrients on *Nannochloropsis oceanica* growth, fatty acid composition and magnetic harvesting efficiency. *Plants*, 9(5), 660

- [72] Savvidou, M. G., Dardavila, M. M., Georgiopoulou, I., Louli, V., Stamatis, H., Kekos, D., & Voutsas, E. (2021). Optimization of microalga *Chlorella vulgaris* magnetic harvesting. *Nanomaterials*, 11(6), 1614
- [73] Savvidou, M. G., Ferraro, A., Schinas, P., Mamma, D., Kekos, D., Hristoforou, E., & Kollis, F. N. (2021). Magnetic immobilization and growth of *Nannochloropsis oceanica* and *Scenedesmus almeriensis*. *Plants*, 11(1), 72
- [74] Zhang, Y., Ren, L., Chu, H., Zhou, X. & Yao, T. (2019). Optimization for *Scenedesmus obliquus* cultivation: The effects of temperature, light intensity and pH on growth and biochemical composition. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 47(4), 614-620
- [75] Sezonov, G., Joseleau-Petit Danièle, & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746-8749
- [76] Rajkumar, R., Ezhumalai, G., & Gnanadesigan, M. (2021). A green approach for the synthesis of silver nanoparticles by *Chlorella vulgaris* and its application in photocatalytic dye degradation activity. *Environmental Technology & Innovation*, 21, 101282
- [77] Kashyap, M., Samadhiya, K., Ghosh, A., Anand, V., Shirage, P. M., & Bala, K. (2019). Screening of microalgae for biosynthesis and optimization of Ag/AgCl nano hybrids having antibacterial effect. *RSC Advances*, 9(44), 25583-25591
- [78] Mondal AH, Yadav D, Ali A, et al (2020) Anti-bacterial and anti-candidal activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Citrobacter spp.*. MS5 culture supernatant. *Biomolecules* 10, 944
- [79] Chowdhury, S., Basu, A., Kundu, S. (2014). Green Synthesis of Protein Capped Silver Nanoparticles from Phytopathogenic Fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with Antimicrobial Properties against Multidrug-Resistant Bacteria. *Nanoscale Research Letters*, 9 (1).
- [80] Tamuly, C., Hazarika, M., Borah, S. C., Das, M. R., Boruah, M. P. (2013). In Situ Biosynthesis of AG, AU and Bimetallic Nanoparticles Using *Piper pedicellatum* C.DC: Green Chemistry Approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 627-634
- [81] Hamouda, R. A., Hussein, M. H., Abo-Elmagd, R. A., & Bawazir, S. S. (2019). Synthesis and biological characterization of silver nanoparticles derived from the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Scientific reports*, 9(1), 1-17
- [82] Mat Yusuf, S. N., Che Mood, C. N., Ahmad, N. H., Sandai, D., Lee, C. K., Lim, V. (2020). Optimization of Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles from Flavonoid-Rich *Clinacanthus nutans* Leaf and Stem Aqueous Extracts. *Royal Society Open Science*, 7 (7), 200065
- [83] Martínez-Castañón, G. A., Niño-Martínez, N., Martínez-Gutierrez, F., Martínez-Mendoza, J. R., Ruiz, F. (2008). Synthesis and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles with Different Sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 10 (8), 1343-1348
- [84] Chopade, B. A., Singh, R., Wagh, P., Wadhvani, S., Gaidhani, S., Kumbhar, A., Bellare, J. (2013). Synthesis, Optimization, and Characterization of Silver Nanoparticles from *Acinetobacter*

Calcoaceticus and Their Enhanced Antibacterial Activity When Combined with Antibiotics. *International Journal of Nanomedicine*, 4277

- [85] Agnihotri, S., Mukherji, S. (2014). Size-Controlled Silver Nanoparticles Synthesized over the Range 5–100 Nm Using the Same Protocol and Their Antibacterial Efficacy. *RSC Adv.*, 4 (8), 3974-3983
- [86] Singh, A. K., Tiwari, R., Kumar, V., Singh, P., Khadim, S. R., Tiwari, A., ... & Asthana, R. K. (2017). Photo-induced biosynthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of *Dunaliella salina* and their anticancer potential. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 166, 202-211
- [87] Bao, Z., Cao, J., Kang, G., Lan, C. Q. (2018). Effects of Reaction Conditions on Light-Dependent Silver Nanoparticle Biosynthesis Mediated by Cell Extract of Green Alga *Neochloris oleoabundans*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26 (3), 2873-2881
- [88] Mohamed, R. M., Fawzy, E. M., Shehab, R. A., Abdel-Salam, M. O., Salah El Din, R. A., Abd El Fatah, H. M. (2022). Production, Characterization, and Cytotoxicity Effects of Silver Nanoparticles from Brown Alga (*Cystoseira myrica*). *Journal of Nanotechnology*, 2022, 1-11
- [89] Hasan, M., Ullah, I., Zulfiqar, H., Naeem, K., Iqbal, A., Gul, H., Ashfaq, M., Mahmood, N. (2018). Biological Entities as Chemical Reactors for Synthesis of Nanomaterials: Progress, Challenges and Future Perspective. *Materials Today Chemistry*, 8, 13-28
- [90] Zhao, X., Xia, Y., Li, Q., Ma, X., Quan, F., Geng, C., Han, Z. (2014). Microwave-Assisted Synthesis of Silver Nanoparticles Using Sodium Alginate and Their Antibacterial Activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 444, 180-188
- [91] Navarro Gallón, S. M., Alpaslan, E., Wang, M., Larese-Casanova, P., Londoño, M. E., Atehortúa, L., Pavón, J. J., Webster, T. J. (2019). Characterization and Study of the Antibacterial Mechanisms of Silver Nanoparticles Prepared with Microalgal Exopolysaccharides. *Materials Science and Engineering: C*, 99, 685-695
- [92] Deepak, V., Kalishwaralal, K., Pandian, S. R., Gurunathan, S. (2011). An Insight into the Bacterial Biogenesis of Silver Nanoparticles, Industrial Production and Scale-Up. *Metal Nanoparticles in Microbiology*, 17-35
- [93] Chitra, K., Annadurai, G. (2014). Antibacterial Activity of Ph-Dependent Biosynthesized Silver Nanoparticles against Clinical Pathogen. *BioMed Research International*, 2014, 1-6
- [94] Mora-Godínez, S., Abril-Martínez, F., Pacheco, A. (2022). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Microalgae Acclimated to High CO₂. *Materials Today: Proceedings*, 48, 5-9
- [95] Prasad, T. N., Kambala, V. S., Naidu, R. (2012). Phyconanotechnology: Synthesis of Silver Nanoparticles Using Brown Marine Algae *Cystophora moniliformis* and Their Characterisation. *Journal of Applied Phycology*, 25 (1), 177-182

- [96] Riaz, M., Mutreja, V., Sareen, S., Ahmad, B., Faheem, M., Zahid, N., Jabbour, G., Park, J. (2021). Exceptional Antibacterial and Cytotoxic Potency of Monodisperse Greener Agnps Prepared under Optimized Ph and Temperature. *Scientific Reports*, 11 (1)
- [97] Sathishkumar, M., Sneha, K., Yun, Y.-S. (2010). Immobilization of Silver Nanoparticles Synthesized Using *Curcuma longa* Tuber Powder and Extract on Cotton Cloth for Bactericidal Activity. *Bioresource Technology*, 101 (20), 7958-7965
- [98] Rahman, A., Kumar, S., Nawaz, T. (2020). Biosynthesis of Nanomaterials Using Algae. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, 265-279
- [99] Panchangam, R. L., Upputuri, R. T. (2019). In Vitro Biological Activities of Silver Nanoparticles Synthesized from *Scedosporium Sp.* Isolated from Soil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55
- [100] Aboelfetoh, E. F., El-Shenody, R. A., Ghobara, M. M. (2017). Eco-Friendly Synthesis of Silver Nanoparticles Using Green Algae (*Caulerpa Serrulata*): Reaction Optimization, Catalytic and Antibacterial Activities. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189 (7)
- [101] Christopher, J. S. G., Saswati, B., Ezilrani, P. S. (2015). Optimization of Parameters for Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Leaf Extract of *Aegle Marmelos*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58 (5), 702-710
- [102] Lotfy, W. A., Alkersh, B. M., Sabry, S. A., Ghozlan, H. A. (2021). Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Aspergillus Terreus*: Characterization, Optimization, and Biological Activities. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9
- [103] Elamawi, R. M., Al-Harbi, R. E., Hendi, A. A. (2018). Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using *Trichoderma longibrachiatum* and Their Effect on Phytopathogenic Fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28 (1)
- [104] El-Rafie, H. M., El-Rafie, M. H., Zahran, M. K. (2013). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Polysaccharides Extracted from Marine Macro Algae. *Carbohydrate Polymers*, 96 (2), 403-410
- [105] Villalpando, M., Rosas, G. (2019). Effect of Magnetic Stirring on the Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Lavandula angustifolia* Plant Extract. *Microscopy and Microanalysis*, 25 (S2), 1976-1977
- [106] Kannan, R. R., Arumugam, R., Ramya, D., Manivannan, K., Anantharaman, P. (2012). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Marine Macroalga *Chaetomorpha linum*. *Applied Nanoscience*, 3 (3), 229-233
- [107] Abdel-Raouf, N., Alharbi, R. M., Al-Enazi, N. M., Alkhulaifi, M. M., Ibraheem, I. B. (2018). Rapid Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using the Marine Red Alga *Laurencia catarinensis* and Their Characterization. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7 (1), 150-157

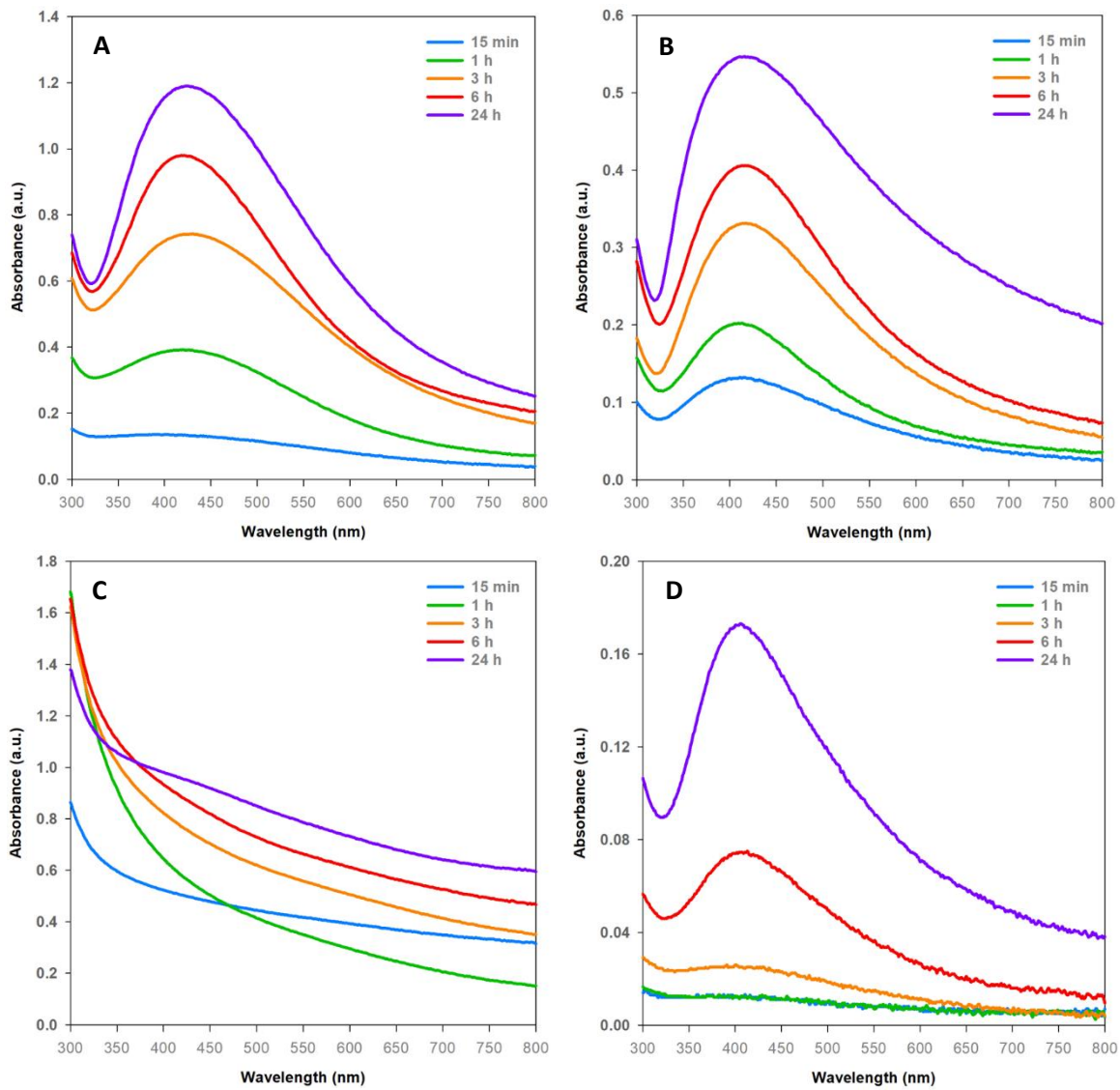
- [108] Gnanakani, P. E., Santhanam, P., Premkumar, K., Eswar Kumar, K., Dhanaraju, M. D. (2019). *Nannochloropsis* Extract–Mediated Synthesis of Biogenic Silver Nanoparticles, Characterization and in Vitro Assessment of Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20 (8), 2353-2364
- [109] de Aragão, A. P., de Oliveira, T. M., Quelemes, P. V., Perfeito, M. L., Araújo, M. C., Santiago, J. de, Cardoso, V. S., Quaresma, P., de Souza de Almeida Leite, J. R., da Silva, D. A. (2019). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using the Seaweed *Gracilaria Birdiae* and Their Antibacterial Activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 12 (8), 4182-4188
- [110] Corciovă, A., Mircea, C., Burlec, A. F., Fifere, A., Moleavin, I. T., Sarghi, A., Tuchiluş, C., Ivănescu, B., Macovei, I. (2022). Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using a *Lythrum Salicaria* Extract and in Vitro Exploration of Their Biological Activities. *Life*, 12 (10), 1643
- [111] Kulikouskaya, V., Hileuskaya, K., Kraskouski, A., Kozerzhets, I., Stepanova, E., Kuzminski, I., You, L., Agabekov, V. (2022). Chitosan-Capped Silver Nanoparticles: A Comprehensive Study of Polymer Molecular Weight Effect on the Reaction Kinetic, Physicochemical Properties, and Synergetic Antibacterial Potential. *SPE Polymers*, 3 (2), 77-90
- [112] Sathishkumar, R. S., Sundaramanickam, A., Srinath, R., Ramesh, T., Saranya, K., Meena, M., Surya, P. (2019). Green Synthesis of Silver Nanoparticles by Bloom Forming Marine Microalgae *Trichodesmium erythraeum* and Its Applications in Antioxidant, Drug-Resistant Bacteria, and Cytotoxicity Activity. *Journal of Saudi Chemical Society*, 23 (8), 1180-1191
- [113] Abdel-Raouf, N., Al-Enazi, N. M., Ibraheem, I. B., Alharbi, R. M., Alkhulaifi, M. M. (2019). Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Using of the Marine Brown Alga *Padina pavonia* and Their Characterization. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26 (6), 1207-1215
- [114] Negi, S., Singh, V. (2018). Algae: A Potential Source for Nanoparticle Synthesis. *Journal of Applied and Natural Science*, 10 (4), 1134-1140
- [115] Aziz, N., Faraz, M., Pandey, R., Shakir, M., Fatma, T., Varma, A., Barman, I., Prasad, R. (2015). Facile algae-derived route to biogenic silver nanoparticles: Synthesis, antibacterial, and photocatalytic properties. *Langmuir*, 31, 11605-11612
- [116] Vanaja, M., & Annadurai, G. (2012). *Coleus aromaticus* leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. *Applied Nanoscience*, 3(3), 217-223
- [117] Daizy, P. (2009). Biosynthesis of Au, Ag and Au–Ag nanoparticles using edible mushroom extract. *Spectrochimica Acta Part A*, 7, 374-381
- [118] Pani, A., Lee, J. H., & Yun, S.-I. (2016). Autoclave mediated one-pot-one-minute synthesis of AgNPs and Au–Ag nanocomposite from *Melia azedarach* bark extract with antimicrobial activity against food pathogens. *Chemistry Central Journal*, 10(1)

- [119] Velgosova, O., Čižmárová, E., Málek, J., Kavuličova, J. (2017). Effect of Storage Conditions on Long-Term Stability of Ag Nanoparticles Formed via Green Synthesis. *International Journal of Minerals, Metallurgy, and Materials*, 24 (10), 1177-1182
- [120] Gole, A., Dash, C., Ramakrishnan, V., Sainkar, S. R., Mandale, A. B., Rao, M., Sastry, M. (2001). Pepsin–Gold Colloid Conjugates: Preparation, Characterization, and Enzymatic Activity. *Langmuir*, 17 (5), 1674-1679
- [121] Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Ahmad, A., Khan, M. I., Kumar, R., Sastry, M. (2002). Extracellular Synthesis of Gold Nanoparticles by the Fungus *Fusarium oxysporum*. *ChemBioChem*, 3 (5), 461
- [122] Salari, Z., Danafar, F., Dabaghi, S., Ataei, S. A. (2016). Sustainable Synthesis of Silver Nanoparticles Using Macroalgae *Spirogyra Varians* and Analysis of Their Antibacterial Activity. *Journal of Saudi Chemical Society*, 20 (4), 459-464
- [123] Merin, D. D., Prakash, S., Bhimba, B. V. (2010). Antibacterial Screening of Silver Nanoparticles Synthesized by Marine Micro Algae. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3 (10), 797-799
- [124] Sharma, G., Jasuja, N. D., Kumar, M., Ali, M. I. (2015). Biological Synthesis of Silver Nanoparticles by Cell-Free Extract of *Spirulina Platensis*. *Journal of Nanotechnology*, 2015, 1-6
- [125] Ebrahiminezhad, A., Bagheri, M., Taghizadeh, S.-M., Berenjian, A., Ghasemi, Y. (2016). Biomimetic Synthesis of Silver Nanoparticles Using Microalgal Secretory Carbohydrates as a Novel Anticancer and Antimicrobial. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7 (1), 015018

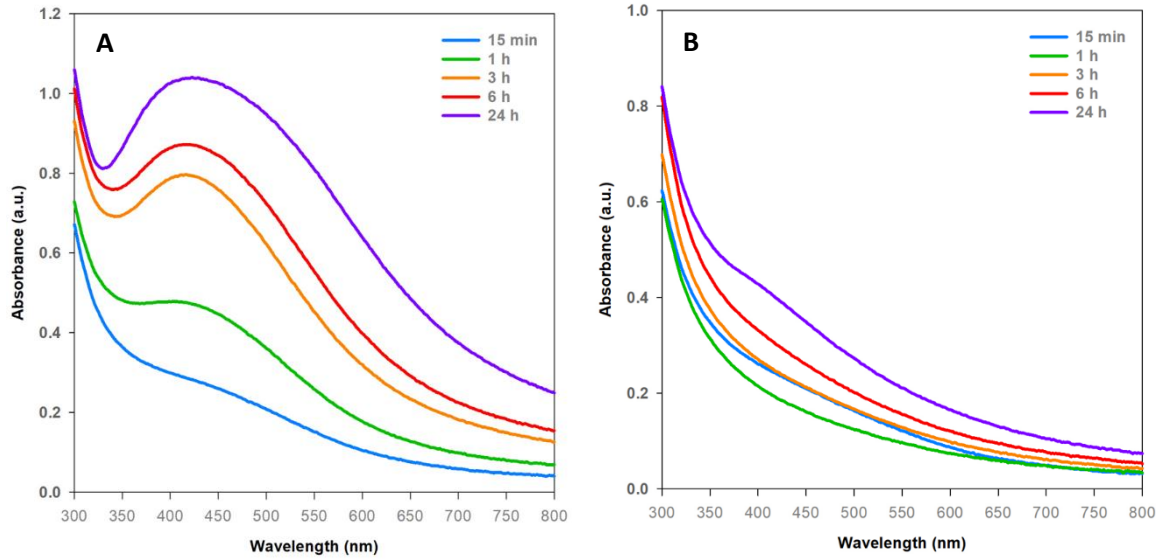
The background of the page is an abstract, flowing design in various shades of green. The colors range from light, almost white-green to deep, vibrant green. The lines are smooth and curved, creating a sense of movement and fluidity. The overall effect is clean, modern, and organic.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

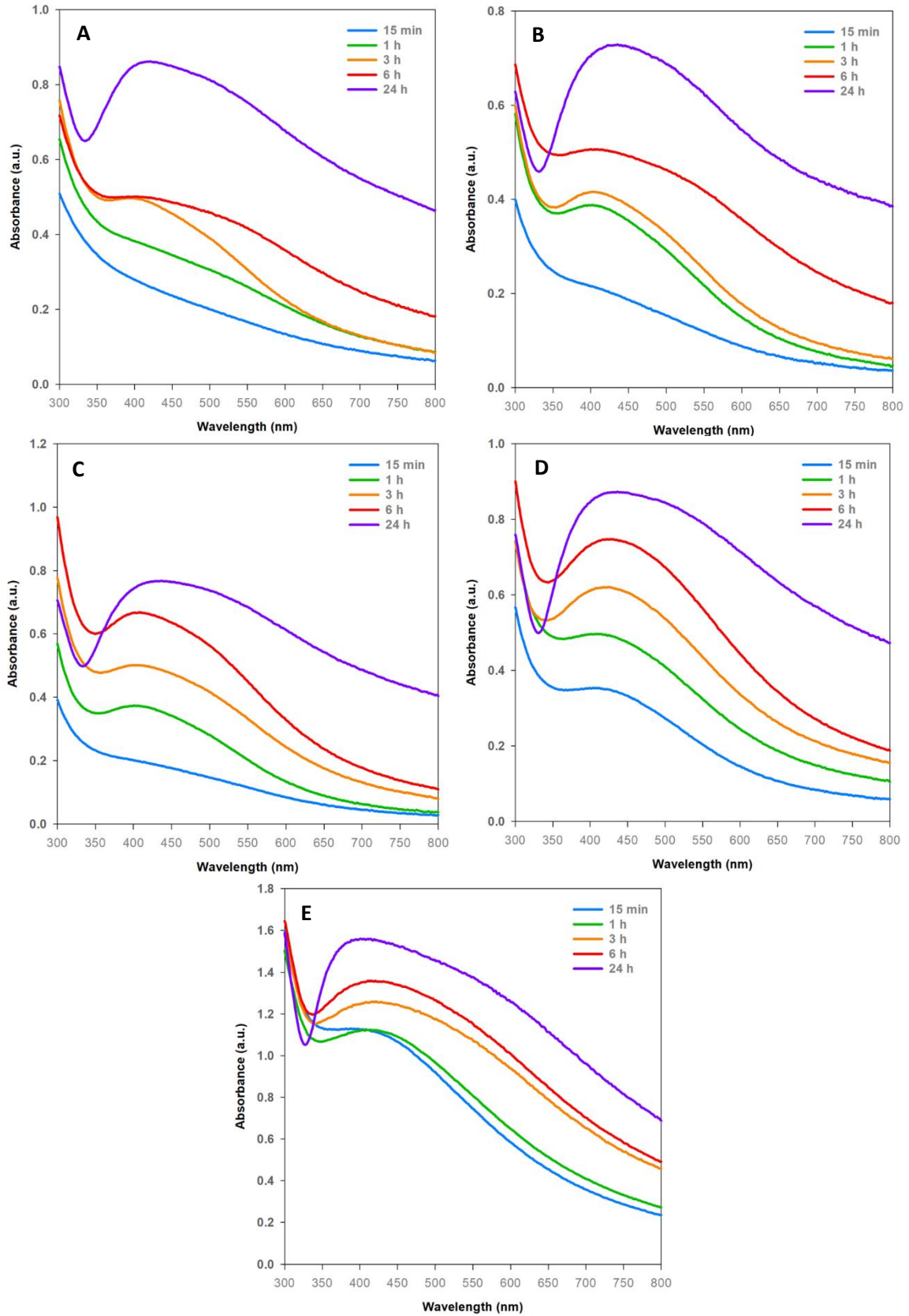
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: Φάσματα απορρόφησης UV-Vis



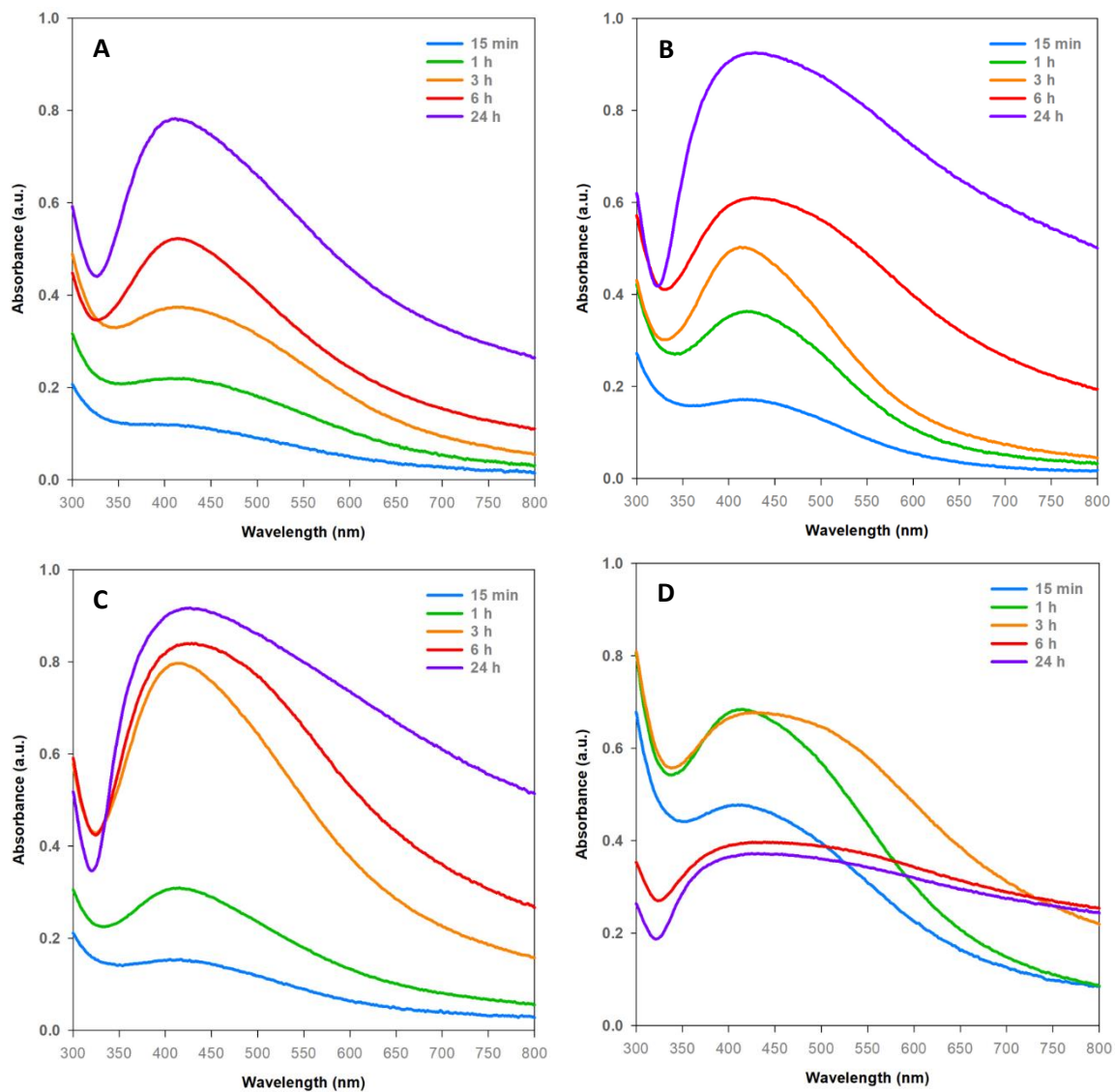
Διάγραμμα Π.Α.1. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε συνάρτηση με το χρόνο των AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου (A) *H. pluvialis* (B) *C. vulgaris* (C) *N. oceanica* και (D) *S. almeriensis* σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm



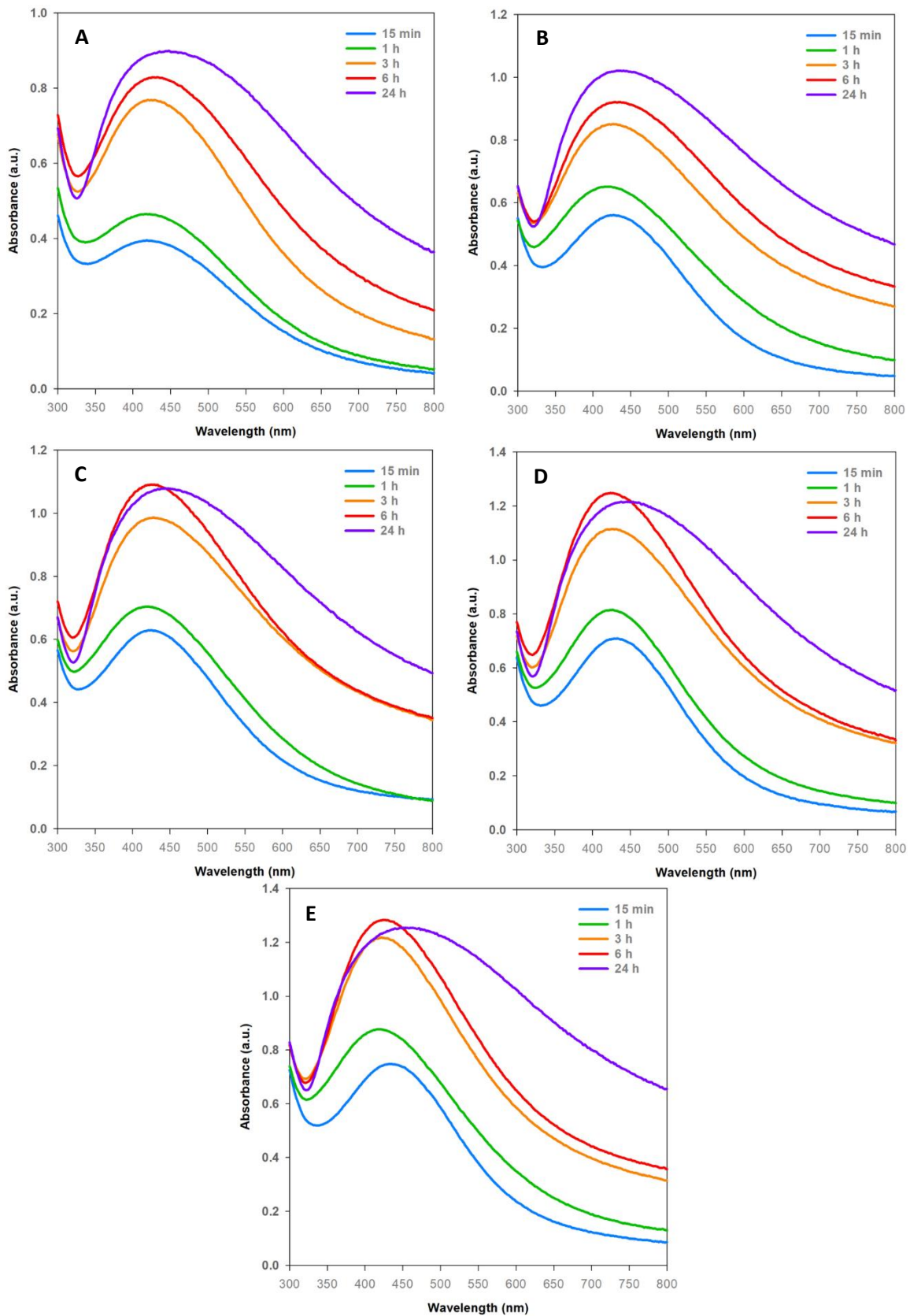
Διάγραμμα Π.Α.2. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε συνάρτηση με το χρόνο των AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροβύκου *H. pluvialis* (A) στο φως και (B) στο σκοτάδι σε συνθήκες pH=8, T=25°C, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm



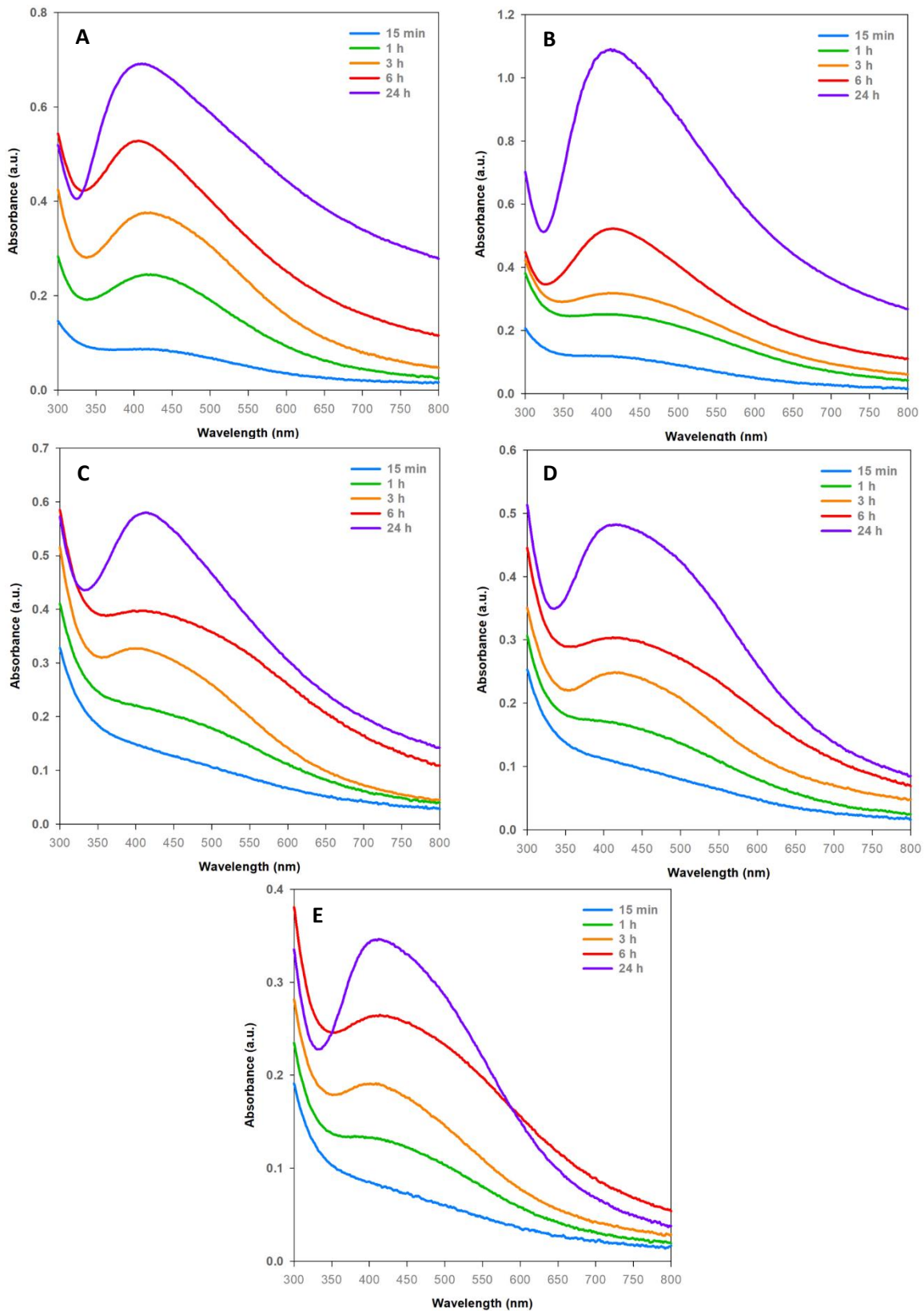
Διάγραμμα Π.Α.3. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε συνάρτηση με το χρόνο των AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροβύκου *H. pluvialis* σε συνθήκες φωτός, $T=25^{\circ}\text{C}$, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και (A) pH=5 (B) pH=7 (C) pH=8 (D) pH=9 (E) pH=11



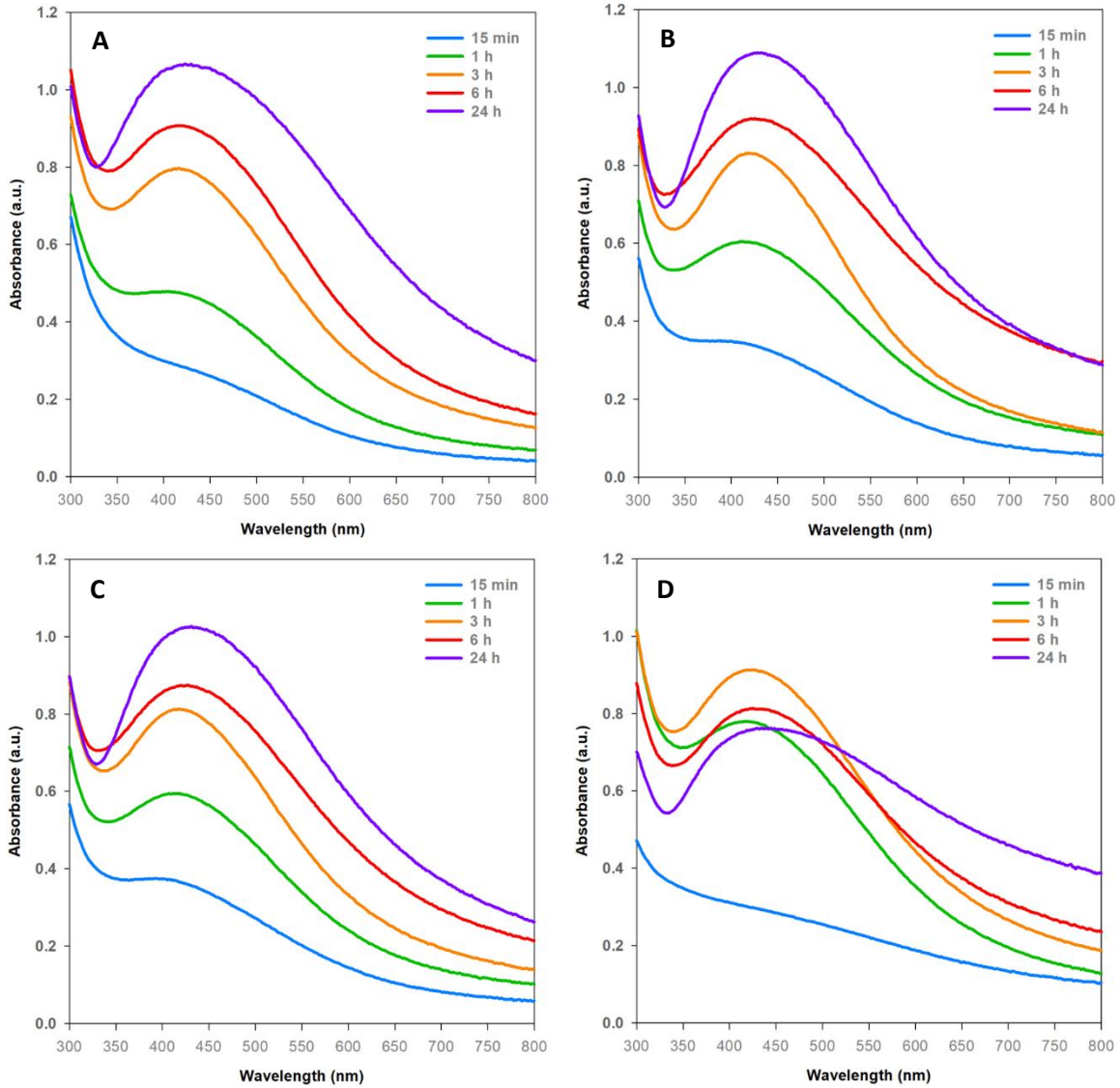
Διάγραμμα Π.Α.4. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε συνάρτηση με το χρόνο των AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* σε συνθήκες φωτός, pH=8, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και θερμοκρασίας (A) 25°C (B) 35°C (C) 45°C (D) 55°C



Διάγραμμα Π.Α.5. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε συνάρτηση με το χρόνο των AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και συγκέντρωσης δ/τος AgNO₃ (A) 1 mM (B) 2 mM (C) 3 mM (D) 4 mM (E) 5 mM



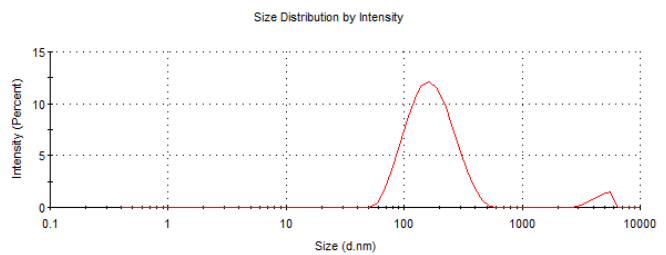
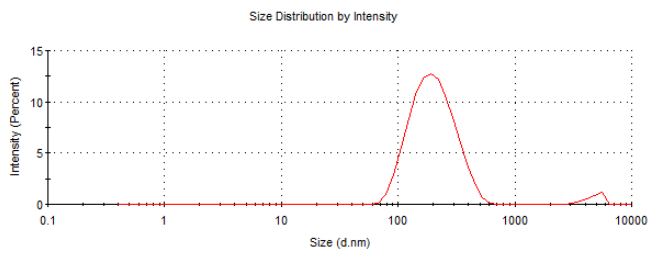
Διάγραμμα Π.Α.6. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε συνάρτηση με το χρόνο των AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 1 mM, 180 grm/15 min & 80 grm και κατ' όγκο αναλογίας δ/τος AgNO₃/εξ. υγρού καλλιέργειας (A) 95/5 (B) 90/10 (C) 85/15 (D) 80/20 (E) 70/30



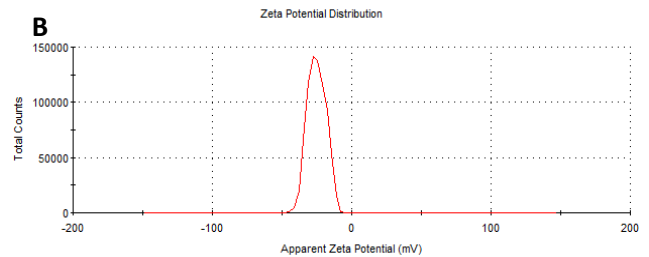
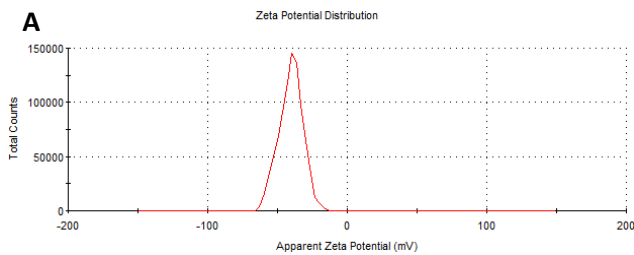
Διάγραμμα Π.Α.7. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis σε συνάρτηση με το χρόνο των AgNPs συνθετιμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 1 mM, 90/10 και ανάδευσης (A) 180 rpm/15 min & 80 rpm (B) 180 rpm/15 min & 0 rpm (C) 0 rpm (D) 180 rpm

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: Αποτελέσματα DLS

A				B					
	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):		
Z-Average (d.nm):	189.5	Peak 1: 211.1	96.9	88.65	Z-Average (d.nm):	162.1	Peak 1: 179.0	95.6	78.13
Pdl:	0.226	Peak 2: 4737	3.1	787.2	Pdl:	0.252	Peak 2: 4703	4.4	781.9
Intercept:	0.912	Peak 3: 0.000	0.0	0.000	Intercept:	0.933	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality:	Good				Result quality:	Good			



Διάγραμμα Π.Β.1. Κατανομή μεγέθους AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* (A) στο φως και (B) στο σκοτάδι σε συνθήκες pH=8, T=25°C, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm μετά από 24 h σύνθεσης

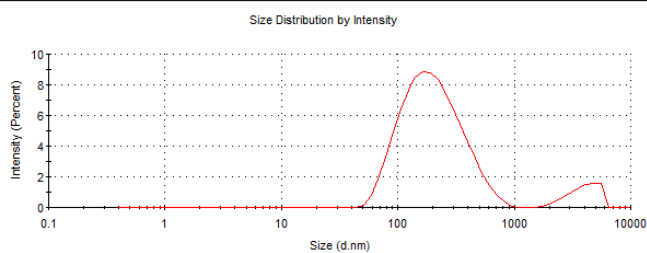


Διάγραμμα Π.Β.2. Κατανομή ζ-δυναμικού AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* (A) στο φως και (B) στο σκοτάδι σε συνθήκες pH=8, T=25°C, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm μετά από 24 h σύνθεσης

A

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 185.5	Peak 1: 224.6	91.5	136.4
Pdl: 0.338	Peak 2: 4003	8.5	1090
Intercept: 0.815	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

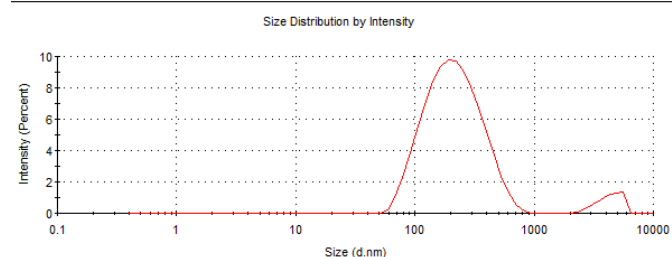
Result quality : Good



B

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 199.0	Peak 1: 233.5	94.4	124.8
Pdl: 0.291	Peak 2: 4348	5.6	947.3
Intercept: 0.923	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

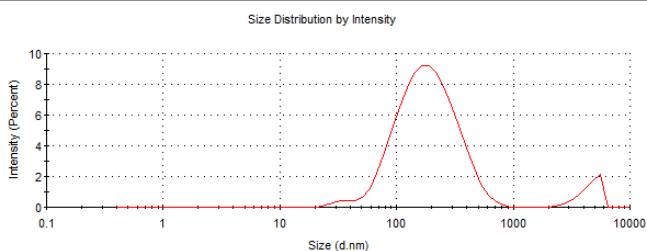
Result quality : Good



C

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 173.4	Peak 1: 208.3	91.8	119.1
Pdl: 0.361	Peak 2: 4556	6.6	903.1
Intercept: 0.830	Peak 3: 35.40	1.6	6.233

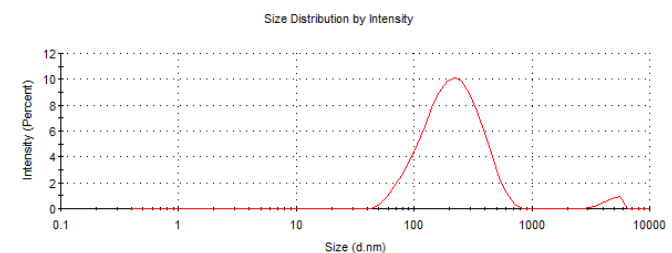
Result quality : Good



D

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 191.9	Peak 1: 234.7	97.4	123.1
Pdl: 0.258	Peak 2: 4756	2.6	746.9
Intercept: 0.926	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

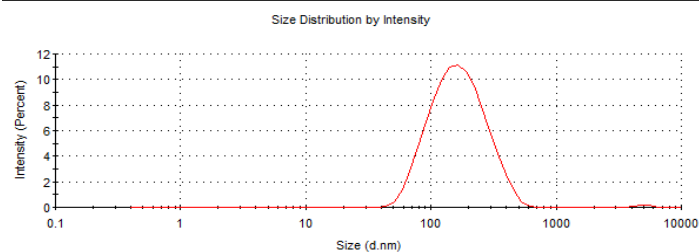
Result quality : Good



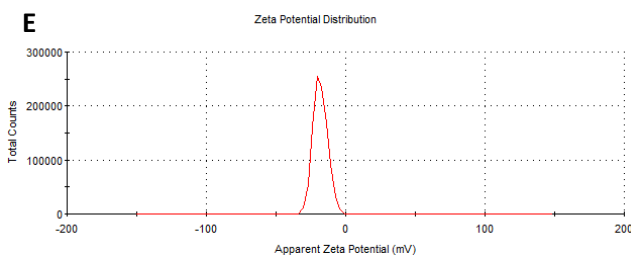
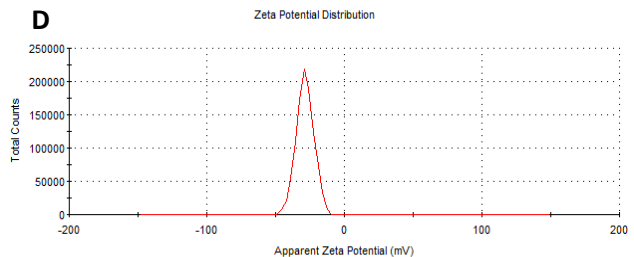
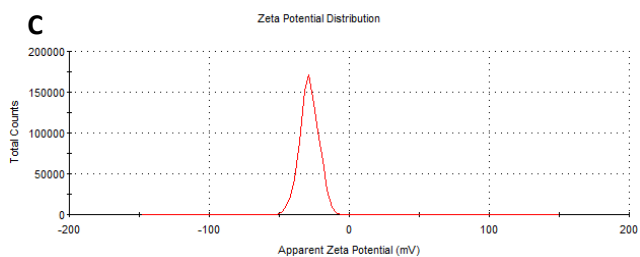
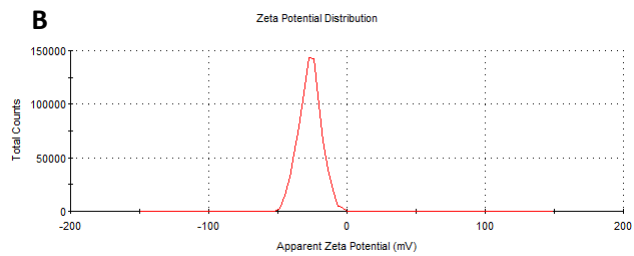
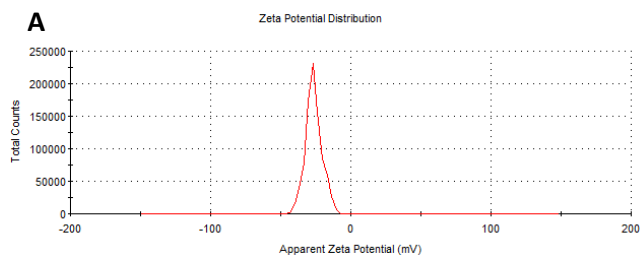
E

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 145.4	Peak 1: 181.4	99.5	90.07
Pdl: 0.214	Peak 2: 4827	0.5	711.1
Intercept: 0.899	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Good



Διάγραμμα Π.Β.3. Κατανομή μεγέθους AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* σε συνθήκες φωτός, T=25°C, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και (A) pH=5 (B) pH=7 (C) pH=8 (D) pH=9 (E) pH=11 μετά από 24 h σύνθεσης

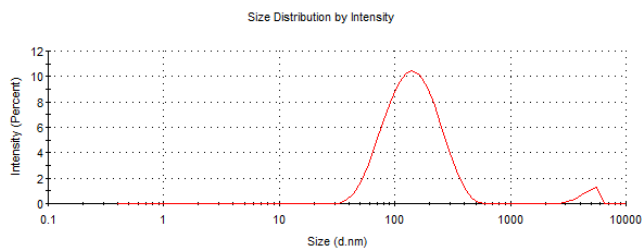


Διάγραμμα Π.Β.4. Κατανομή ζ-δυναμικού AgNPs συνθετιμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* σε συνθήκες φωτός, T=25°C, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και (A) pH=5 (B) pH=7 (C) pH=8 (D) pH=9 (E) pH=11 μετά από 24 h σύνθεσης

A

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 125.0	Peak 1: 156.4	96.4	78.69
Pdl: 0.322	Peak 2: 4737	3.6	760.2
Intercept: 0.842	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

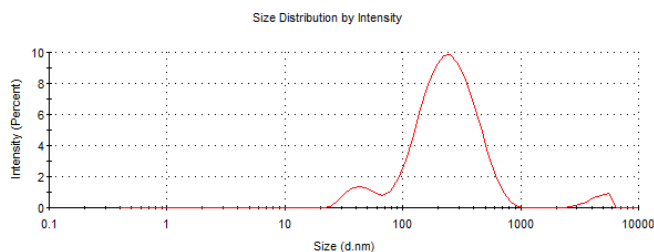
Result quality : **Good**



B

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 188.4	Peak 1: 270.5	90.0	138.7
Pdl: 0.377	Peak 2: 45.73	7.1	12.04
Intercept: 0.857	Peak 3: 4605	3.0	826.6

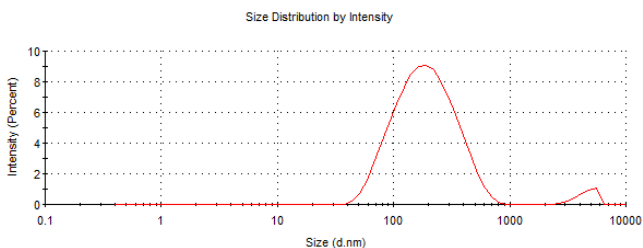
Result quality : **Good**



C

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 159.5	Peak 1: 213.9	96.6	125.1
Pdl: 0.341	Peak 2: 4606	3.4	826.7
Intercept: 0.891	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

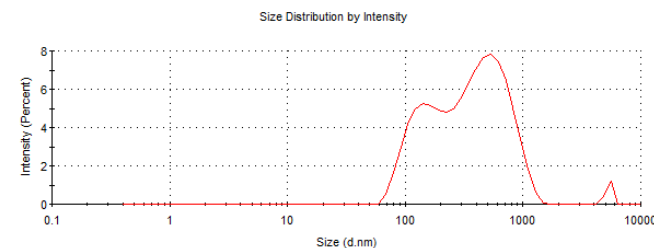
Result quality : **Good**



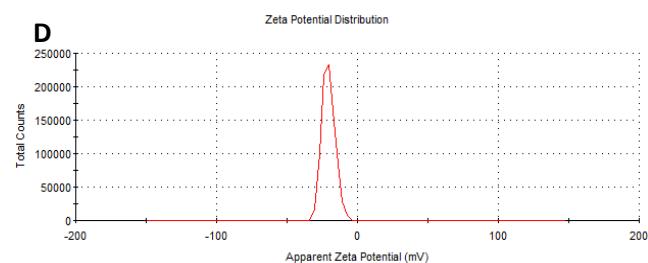
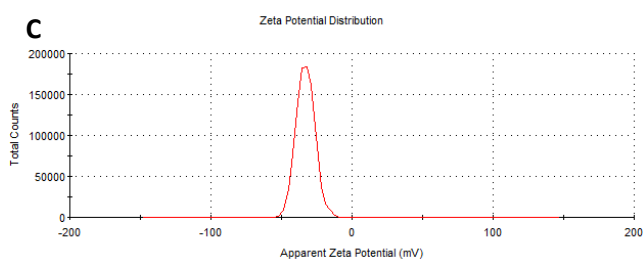
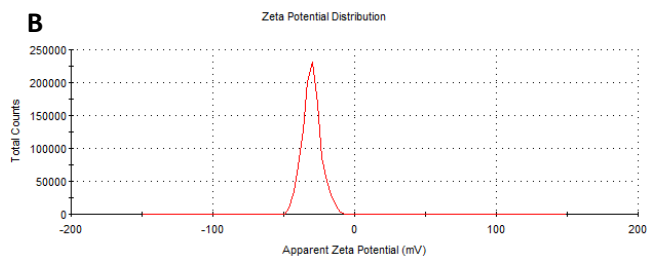
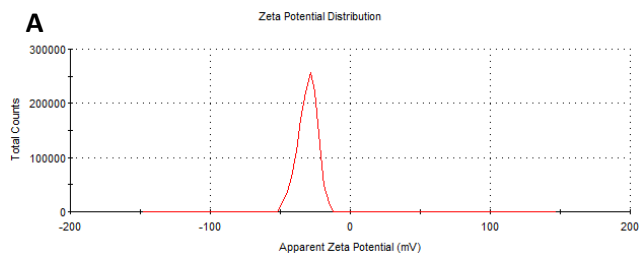
D

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 283.7	Peak 1: 523.1	65.7	237.0
Pdl: 0.418	Peak 2: 147.4	32.9	44.09
Intercept: 0.829	Peak 3: 5377	1.5	324.7

Result quality : **Good**



Διάγραμμα Π.Β.5. Κατανομή μεγέθους AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* σε συνθήκες φωτός, pH=8, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και θερμοκρασίας (A) 25°C (B) 35°C (C) 45°C (D) 55°C μετά από 24 h σύνθεσης

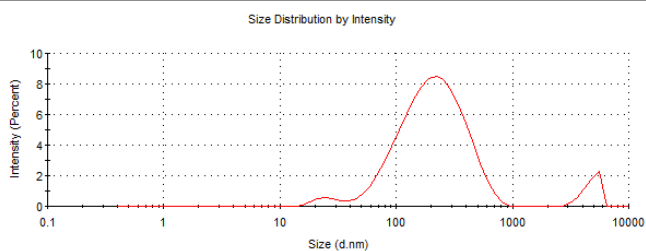


Διάγραμμα Π.Β.6. Κατανομή ζ-δυναμικού AgNPs συνθετιμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* σε συνθήκες φωτός, pH=8, 1 mM, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και θερμοκρασίας (A) 25°C (B) 35°C (C) 45°C (D) 55°C μετά από 24 h σύνθεσης

A

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 187.3	Peak 1: 237.1	91.4	139.2
Pdl: 0.377	Peak 2: 4793	5.9	733.8
Intercept: 0.833	Peak 3: 26.31	2.7	6.292

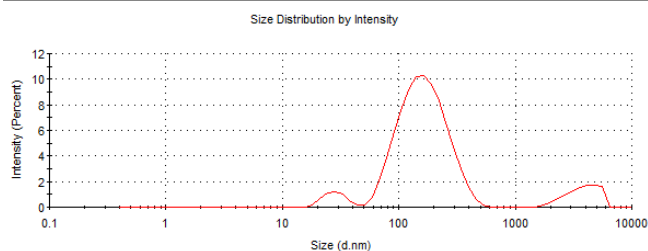
Result quality : Good



B

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 145.4	Peak 1: 174.7	85.1	80.37
Pdl: 0.377	Peak 2: 3881	10.0	1116
Intercept: 0.867	Peak 3: 28.36	4.9	6.051

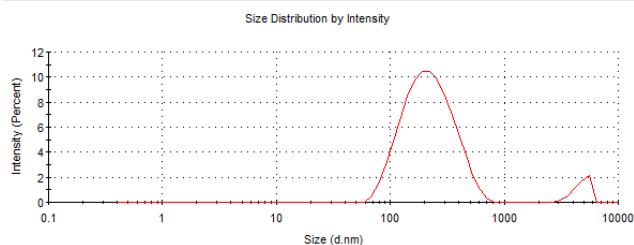
Result quality : Good



C

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 210.1	Peak 1: 236.5	94.3	116.0
Pdl: 0.310	Peak 2: 4805	5.7	724.3
Intercept: 0.855	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

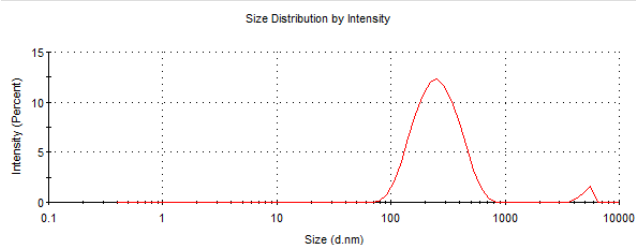
Result quality : Good



D

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 222.8	Peak 1: 270.9	97.3	116.8
Pdl: 0.329	Peak 2: 5173	2.7	489.1
Intercept: 0.648	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

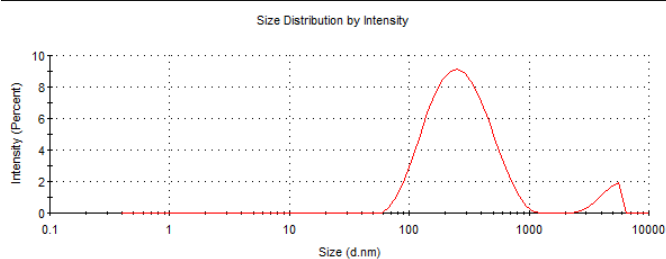
Result quality : Good



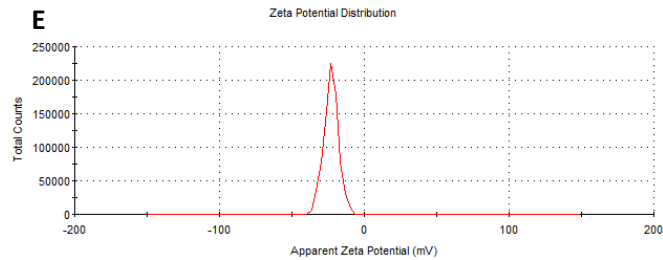
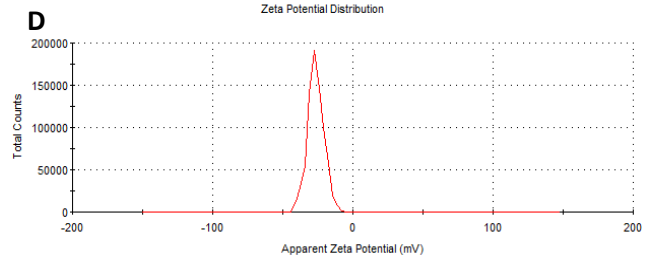
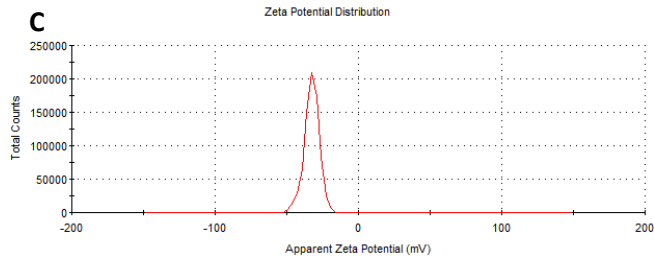
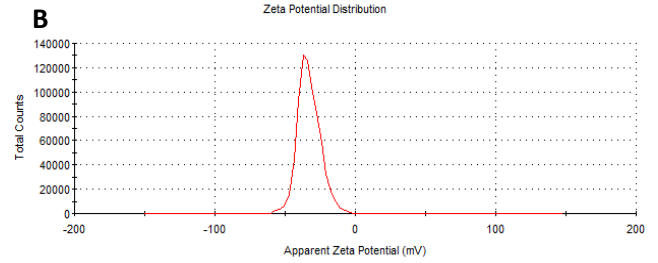
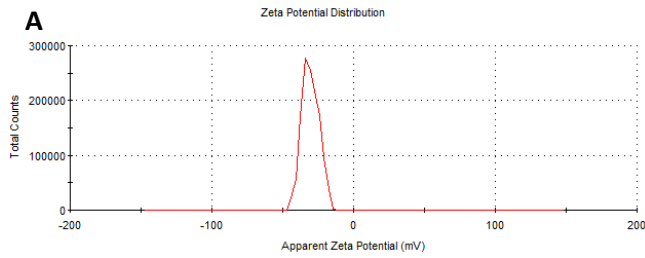
E

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 235.1	Peak 1: 292.4	94.0	166.8
Pdl: 0.356	Peak 2: 4599	6.0	832.4
Intercept: 0.851	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Good

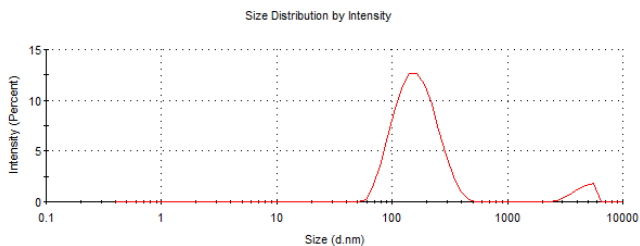


Διάγραμμα Π.Β.7. Κατανομή μεγέθους AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και συγκέντρωσης δ/τος AgNO₃ (A) 1 mM (B) 2 mM (C) 3 mM (D) 4 mM (E) 5 mM μετά από 24 h σύνθεσης

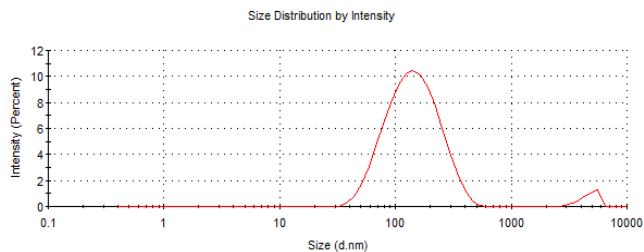


Διάγραμμα Π.Β.8. Κατανομή ζ-δυναμικού AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 90/10, 180 rpm/15 min & 80 rpm και συγκέντρωσης δ/τος AgNO₃ (A) 1 mM (B) 2 mM (C) 3 mM (D) 4 mM (E) 5 mM μετά από 24 h σύνθεσης

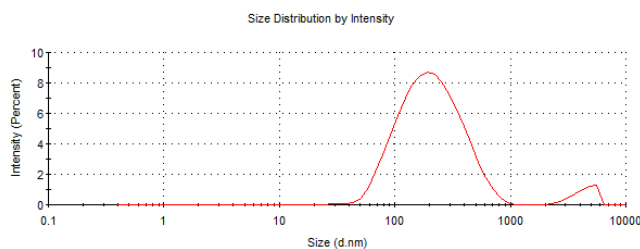
	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
A			
Z-Average (d.nm): 150.5	Peak 1: 170.2	94.0	68.93
Pdl: 0.313	Peak 2: 4542	6.0	856.2
Intercept: 0.840	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			



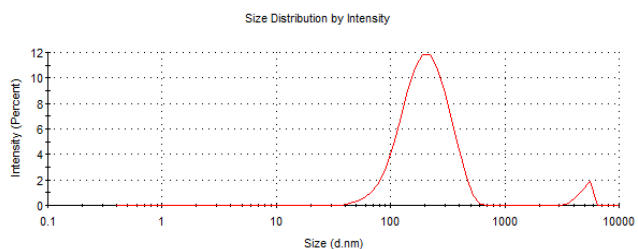
	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
B			
Z-Average (d.nm): 125.0	Peak 1: 156.4	96.4	78.69
Pdl: 0.322	Peak 2: 4737	3.6	760.2
Intercept: 0.842	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			



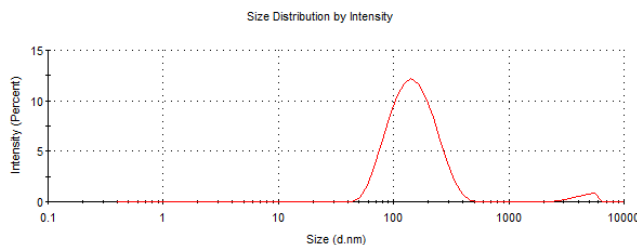
	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
C			
Z-Average (d.nm): 184.8	Peak 1: 235.7	95.0	144.1
Pdl: 0.332	Peak 2: 4422	4.8	930.4
Intercept: 0.902	Peak 3: 31.16	0.2	4.879
Result quality : Good			



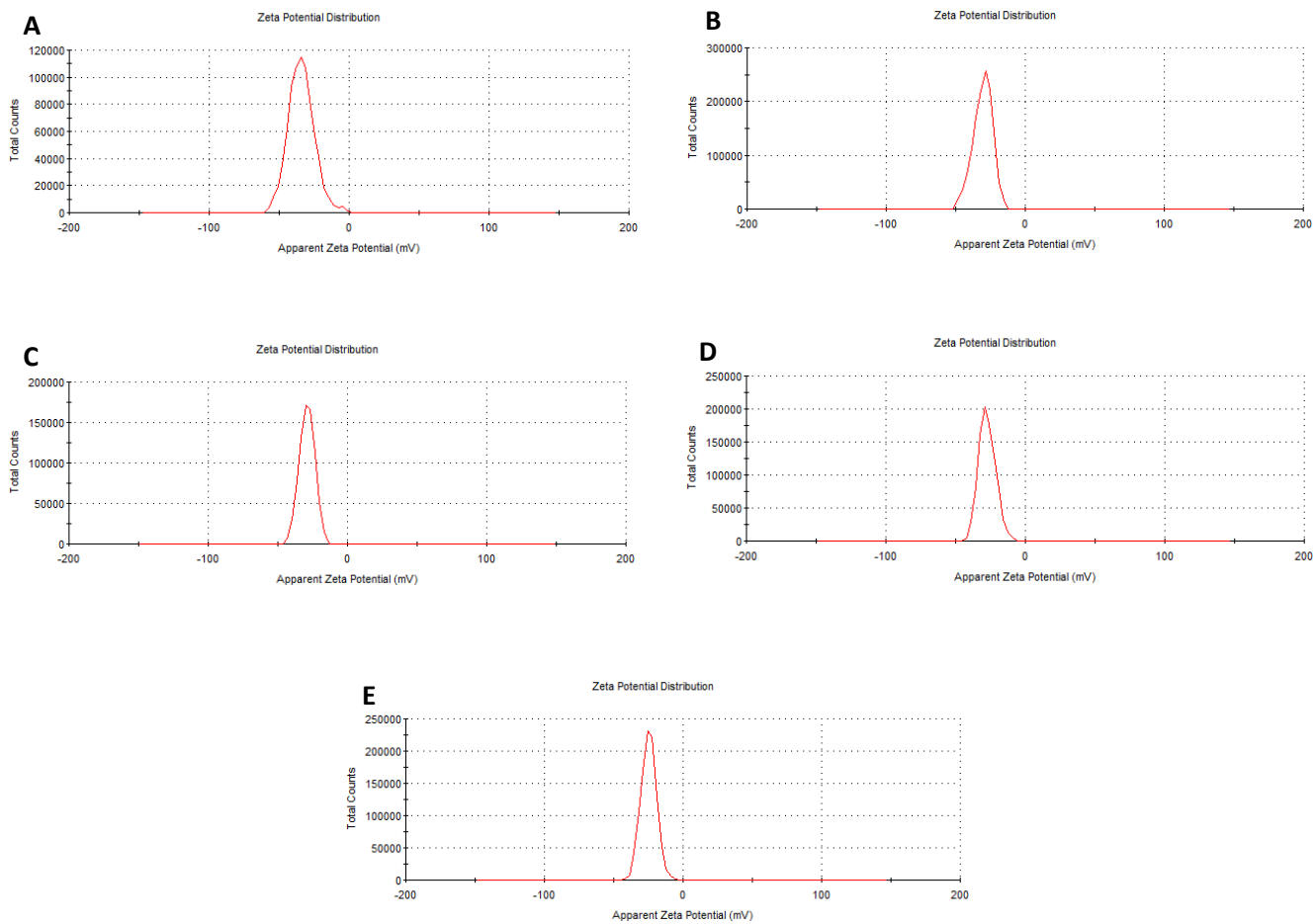
	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
D			
Z-Average (d.nm): 198.0	Peak 1: 216.0	96.1	95.66
Pdl: 0.289	Peak 2: 5012	3.9	603.4
Intercept: 0.936	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			



	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
E			
Z-Average (d.nm): 136.3	Peak 1: 157.1	97.0	68.76
Pdl: 0.224	Peak 2: 4549	3.0	877.2
Intercept: 0.833	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			



Διάγραμμα Π.Β.9. Κατανομή μεγέθους AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 1 mM, 180 rpm/15 min & 80 rpm και κατ' όγκο αναλογίας δ/τος AgNO₃/εξ. υγρού καλλιέργειας (A) 95/5 (B) 90/10 (C) 85/15 (D) 80/20 (E) 70/30 μετά από 24 h σύνθεσης

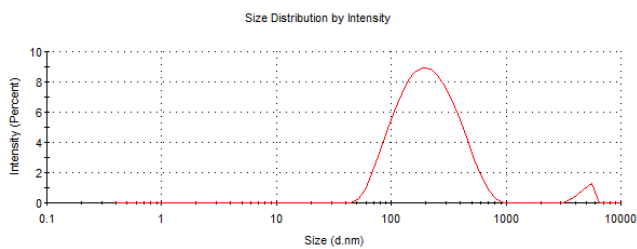


Διάγραμμα Π.Β.10. Κατανομή ζ-δυναμικού AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 1 mM, 180 rpm/15 min & 80 rpm και κατ' όγκο αναλογίας δ/τος AgNO₃/εξ. υγρού καλλιέργειας (A) 95/5 (B) 90/10 (C) 85/15 (D) 80/20 (E) 70/30 μετά από 24 h σύνθεσης

A

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 186.2	Peak 1: 234.7	97.0	136.5
Pdl: 0.321	Peak 2: 4914	3.0	664.1
Intercept: 0.867	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

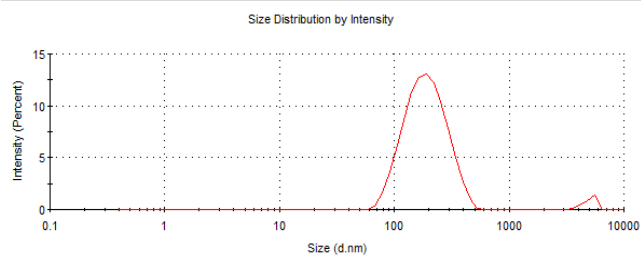
Result quality: Good



B

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 167.3	Peak 1: 199.2	97.2	80.19
Pdl: 0.293	Peak 2: 4999	2.8	609.0
Intercept: 0.874	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

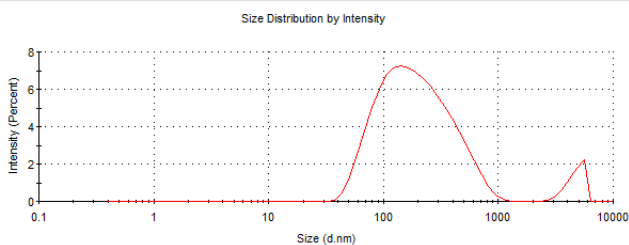
Result quality: Good



C

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 170.1	Peak 1: 229.0	94.0	167.2
Pdl: 0.372	Peak 2: 4747	6.0	761.9
Intercept: 0.838	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

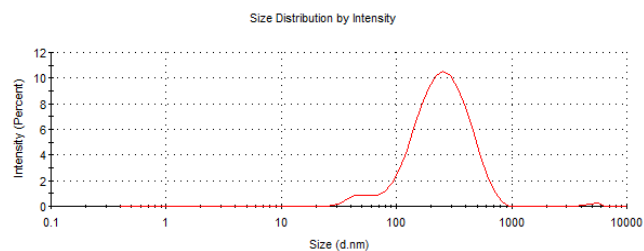
Result quality: Good



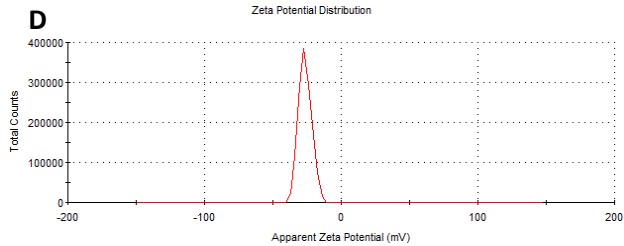
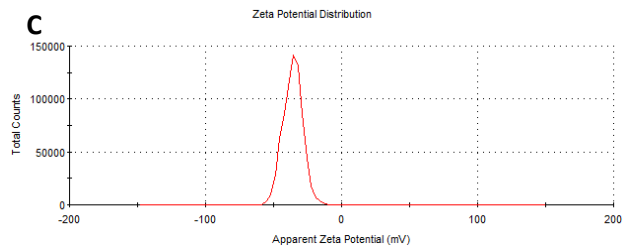
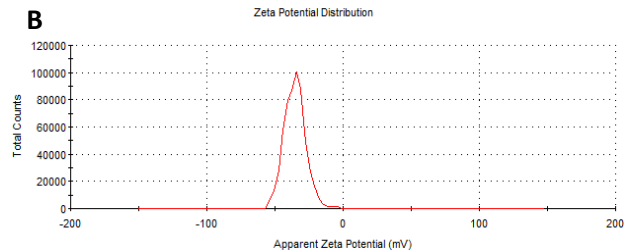
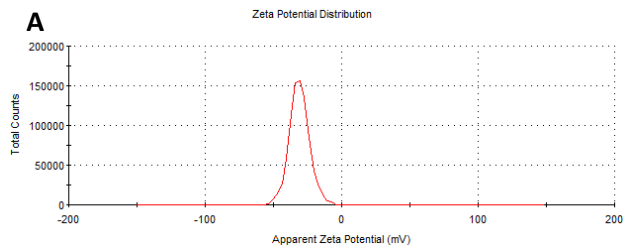
D

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 208.9	Peak 1: 276.4	95.8	140.9
Pdl: 0.270	Peak 2: 46.69	3.5	9.086
Intercept: 0.807	Peak 3: 5011	0.6	603.1

Result quality: Good



Διάγραμμα Π.Β.11. Κατανομή μεγέθους AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 1 mM, 90/10 και ανάδευσης (A) 180 rpm/15 min & 80 rpm (B) 180 rpm/15 min & 0 rpm (C) 0 rpm (D) 180 rpm μετά από 24 h σύνθεσης



Διάγραμμα Π.Β.12. Κατανομή ζ-δυναμικού AgNPs συντεθειμένων με το εξωκυτταρικό υγρό καλλιέργειας του μικροφύκου *H. pluvialis* σε συνθήκες φωτός, pH=8, T=25°C, 1 mM, 90/10 και ανάδευσης (A) 180 rpm/15 min & 80 rpm (B) 180 rpm/15 min & 0 rpm (C) 0 rpm (D) 180 rpm μετά από 24 h σύνθεσης