

УДК 544.774.4 : 541.182.4 / .65 : 546.562-31

СИНТЕЗ ТА АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ НАНОЧАСТИНОК CuO, СТАБІЛІЗОВАНИХ РАМНОЛІПІДНИМ БІОКОМПЛЕКСОМ МІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ

Л. Базиляк^{1*}, А. Киця^{1,2}, П. Лютий^{2,3}, В. Дожджаник¹,
А. Прокопало¹, Н. Щеглова¹, О. Карпенко¹, О. Кунтий³

¹Відділення фізико-хімії горючих копалин
Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка НАН України,
вул. Наукова, 3а, 79060, м. Львів, Україна
e-mail: bazyljak.L.I@nas.gov.ua

²Фізико-механічний інститут ім. Г. В. Карпенка НАН України,
вул. Наукова, 5, 79060, м. Львів, Україна

³Національний університет “Львівська політехніка”
вул. Степана Бандери, 12, 79013, м. Львів, Україна

Синтезовані концентровані колоїдні розчини оксиду міді, стабілізовані рамноліпідним біокомплексом (РБК), який є низькомолекулярним вторинним метаболітом бактерії роду *Pseudomonas sp. PS-17* і одночасно забезпечує задовільну стабілізацію колоїдних розчинів оксиду міді та є нетоксичним. Наночастинки оксиду міді (CuO-NPs) отримували за реакцією розкладу свіжоприготованого гідроксиду міді в лужному середовищі в присутності РБК. Отримані CuO-NPs досліджені з використанням сканівної електронної мікроскопії, спектроскопії в УФ-видимому діапазоні, а також методу X-променевої дифракції. Встановлено, що отримані CuO-NPs формують агломерати неправильної форми розмірами 35–90 нм. За X-променевими дифрактограмами розраховано розміри кристалітів синтезованих CuO-NPs. Визначено, що розмір кристалітів зменшується від 12 до 5 нм з ростом вихідної концентрації РБК. Досліджено антимікробну активність отриманого концентрованого золю стосовно двох тестових мікроорганізмів *Agrobacterium tumefaciens* та *Xanthomonas campestris*. Виявлено, що отримані CuO-NPs проявляють достатньо високу антимікробну активність стосовно зазначених мікроорганізмів, а значення мінімальної інгібувальної концентрації (МІК) та мінімальної бактерицидної концентрації (МБК) становлять 20 та 40 мкг/мл, відповідно.

Ключові слова: наночастинки оксидів міді, зелений синтез, антимікробна активність.

DOI: <https://doi.org/10.30970/vch.6201.311>

1. Вступ

Серед найбільш досліджуваних наночастинок металів, які сьогодні широко використовують як субстанції для створення оригінальних лікарських препаратів, високочутливих діагностичних засобів, медикаментів для лікування та профілактики багатьох інфекційних та неінфекційних захворювань, наночастинки срібла та міді заслуговують на особливу увагу [1–3], оскільки характеризуються яскраво вираженими біоцидними властивостями, і завдяки їхній бактерицидній, бактериостатичній та імуномодулюючій діях

активно застосовують у створенні виробів медичного призначення, синтетичних тканин та пакувальних матеріалів з протимікробною активністю, у виготовленні пристроїв для знезараження води [4–5] та ін. Водночас зацікавленість дослідників до вивчення методів синтезу, характеристик та практичного застосування наночастинок срібла і міді впродовж останніх десятиріч значно підвищується у зв'язку з тим, що широке використання синтетичних антимікробних препаратів приводить до розвитку антибіотичної резистентності патогенних штамів мікроорганізмів.

Загальновідомо [6], що наночастинок срібла є перспективним протимікробним, протизапальним та імуномодуючим агентом. Водночас мідь розглядають як життєво необхідний, так званий “есенціальний” мікроелемент, який є кофактором більш ніж тридцяти ензимних систем у живих організмах, забезпечуючи численні процеси життєдіяльності організму та його стійкості до різноманітних бактеріальних інфекцій та інвазій, а самі наночастинок міді є потужним протимікробним агентом і можуть бути використані у створенні ефективного медикаменту для лікування інфекційних захворювань [7]. Хоча мідь, порівняно зі сріблом, має менш виражені антисептичні властивості [8], лабораторні дослідження за затвердженими протоколами Агентства з охорони навколишнього середовища США довели здатність міді до знищення багатьох бактерій упродовж 2 год. контакту з ефективністю більш ніж 99,9 % [9].

Основними вимогами до компонентів антимікробних препаратів біомедичного призначення (зокрема у виготовленні бактерицидних розчинів, бандажів тощо) є їх гідрофільність та низька токсичність. Відповідно, актуальними є проблеми синтезу гідрофільних наночастинок на основі міді, агрегативно стійких у широкому інтервалі рН, причому завдання відтвореного отримання таких наночастинок далеко не вирішена проблема. Гідрофільність є особливо цінною властивістю для практичного використання наночастинок в аналітичній хімії, біології та медицині, оскільки практично всі об'єкти досліджень, дотичні до зазначених вище областей, передбачають наявність саме водного середовища. Забезпечення виконання таких вимог досягають підбором стабілізуючого агента, методів синтезу та прекурсорів.

Для синтезу наночастинок на основі міді розроблено широкий спектр як фізичних, так і хімічних способів; водночас особливо перспективними з екологічної точки зору методами отримання колоїдних розчинів є так звані “зелені” способи синтезу [10–14], суть яких полягає у використанні природних біологічно-активних речовин, які завдяки своїй поліфункціональній природі відіграють подвійну роль – стабілізують отримані колоїдні розчини, а також можуть підсилювати антимікробну активність неорганічного компонента. Перспективним класом поліфункціональних речовин можна вважати біогенні поверхнево-активні речовини (біоПАР), а саме продукти мікробного синтезу, які сьогодні широко досліджують і вважають екологічно чистою альтернативою до синтетичних поверхнево-активних речовин (ПАР) [15–16]. Такі біоПАР часто також володіють протимікробною і противірусною активностями [17], а тому їх комбінація з наночастинками на основі міді дозволить поєднати і підсилити властивості обох компонентів для створення сучасних екологічно безпечних препаратів з антимікробною дією. Серед широкого спектра перспективних мікроорганізмів-продуцентів ПАР особливої уваги заслуговують представники роду *Pseudomonas*, які синтезують позаклітинні поверхнево-активні гліколіпіди з високою поверхневою, емульгуювальною та піноутворювальною активностями [18]. Вперше утворення сурфактантів (рамноліпідів) культурою *Pseudomonas aeruginosa* показано ще у 1949 р. [19].

Однак, незважаючи на надзвичайно високу активність дослідників у цьому напрямі, багато аспектів щодо синтезу наночастинок на основі міді залишається невивченими, зокрема, актуальними є дослідження з вивчення впливу природи біоПАР на характеристики отримуваних наночастинок, зокрема їх розмір, форму тощо, а також вплив морфології і складу наночастинок на їхні антимікробні властивості.

Мета нашої праці – отримати концентровані колоїдні розчини оксиду міді в присутності біогенної поверхнево-активної речовини – рамноліпідного біокомплексу, синтезованого культурою *Pseudomonas sp. PS-17*, яка одночасно забезпечує задовільну стабілізацію колоїдних розчинів міді і є нетоксичною, вивчити вплив концентрації РБК на характеристики отримуваних CuO-NPs, а також дослідити їхню антимікробну дію.

2. Матеріали та методика експерименту

Сульфат міді 5-водний $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich, 99,9 %) використаний як прекурсор для синтезу CuO-NPs.

Регулятором рН середовища під час синтезу CuO-NPs слугував натрій гідроксид (стандарт-титр, “Харківреахім”).

Рамноліпідний біокомплекс (РБК), який є низькомолекулярним вторинним метаболітом бактерій роду *Pseudomonas sp. PS-17*, використаний як стабілізуючий агент отримуваних CuO-NPs. Такий комплекс є поверхнево-активним продуцентом біосинтезу культури *Pseudomonas sp. PS-17* з колекції мікроорганізмів Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л. М. Литвиненка НАН України, реєстраційний номер у Депозитарії ІМВ ім. Д. К. Заболотного *Pseudomonas sp. ІМВ В-7434*. Культивування штаму *Pseudomonas sp. PS-17* проводили в лабораторних умовах в колбах Ерленмеєра з використанням ротаційної качалки (WL-2000, JV Electronic, Польща) (220 об/хв) при 30 °С впродовж п’яти діб на оптимізованому рідкому середовищі, джерелом вуглецю в якому був гліцерин (30 г/л) [20]. Супернатант культуральної рідини (СКР) отримували центрифугуванням при 6 000 об/хв упродовж 20 хв. Поверхнево-активний РБК, що складається з рамноліпідів і полісахариду (4 : 1), виділяли із СКР осадженням розчином HCl при рН = 3 [21].

CuO-NPs отримували при 80 °С в скляному реакторі, обладнаному магнітною мішалкою та зворотним холодильником. До 85 мл розчину РБК заданої концентрації послідовно додавали 10 мл 0,1 М розчину CuSO_4 та 5 мл 2 М розчину NaOH, отриману реакційну суміш витримували за постійного перемішування впродовж 3 год.

CuO-NPs виділяли з розчину центрифугуванням реакційної суміші при 10 000 хв⁻¹ упродовж 30 хв. з використанням центрифуги K24D (MLW, Німеччина).

Спектри поглинання CuO-NPs досліджено з використанням однопроменевого спектрофотометра УФ-видимого діапазону Uv-mini-1240 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan).

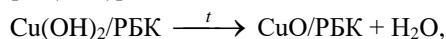
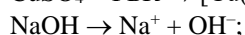
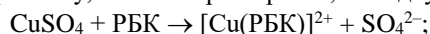
Дослідження форми і розміру синтезованих CuO-NPs проводили за методом сканівної електронної мікроскопії з використанням сканівного електронного мікроскопа EVO-40XVP (Carl Zeiss) з системою енергодисперсійного рентгенівського мікроаналізу INCA Energy 350 (з опцією кількісного аналізу елементів у діапазоні від бору до плутонію). Зразки для СЕМ-досліджень готували висушуванням 1 μL розчину CuO-NPs на полірованій кремнієвій пластині за пониженого тиску, після чого підкладку з відповідним зразком поміщали в камеру мікроскопа. Розмір CuO-NPs оцінювали з використанням програми AxioVision V 4.8.2.0.

X-променевий аналіз синтезованих CuO–NPs проводили з використанням порошкового дифрактометра ДРОН–3.0 з Cu–K α випромінюванням. Для отримання X-променевих дифрактограм CuO–NPs відділяли з реакційної суміші центрифугуванням при 10 000 об./хв з використанням центрифуги K24D (MLW, Німеччина). Отримані дані аналізували повнопрофільним уточненням за методом Рітвельда з використанням програмного пакета WinCSD [22].

Антимікробну активність синтезованих CuO–NPs оцінювали за значеннями мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). МІК – це найнижча концентрація антимікробних препаратів, яка пригнічує ріст досліджуваних мікроорганізмів (у цьому випадку – грам-негативних фітопатогенних бактерій *Agrobacterium tumefaciens* та *Xanthomonas campestris*) після їхньої інкубації в мікропланшеті з круглим дном з 24 лунками за температури 37 °C впродовж 20 год. Для того, щоб визначити мінімальну бактерицидну концентрацію (МБК), субкультури висівають на агарових пластинах на середовищі без інгібіторів з кожної пробірки з серії досліджень МІК, після інкубації при 37 °C впродовж 20 год. [23].

3. Результати досліджень та їх обговорення

CuO–NPs отримували за реакцією розкладу свіжоприготованого гідроксиду міді в лужному середовищі в присутності 1, 2 та 5 г/л РБК. Зважаючи на методику проведення експерименту, хімічні перетворення, які відбуваються в системі, можна описати як:



де Cu(OH) $_2$ /РБК та CuO/РБК – частинки гідроксиду та оксиду міді з адсорбованим на їхній поверхні РБК.

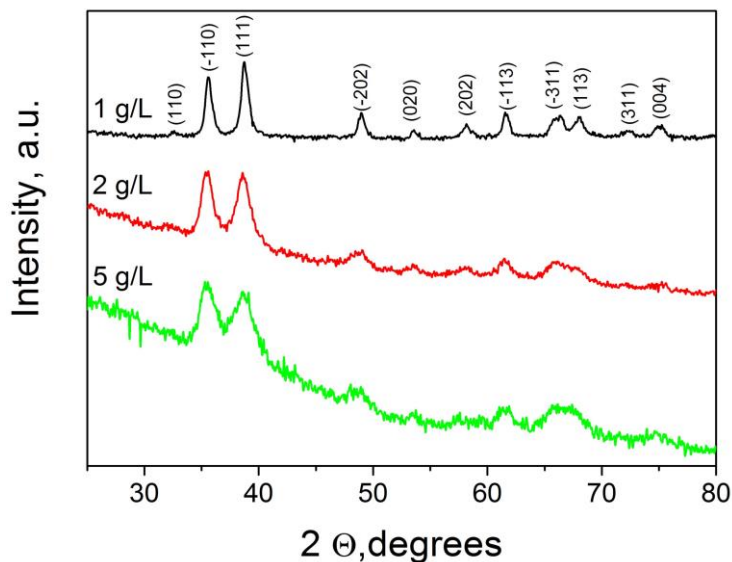


Рис. 1. X-променеві дифрактограми CuONPs, синтезованих за різних вихідних концентрацій РБК
Fig. 1. X-ray diffraction patterns of CuONPs obtained at different starting concentrations of RBC

Отримані осадки досліджено з використанням методу X-променевої дифракції (рис. 1). Виявлено, що дифракційні піки у дослідженому інтервалі 2Θ відповідають моноклінній фазі CuO, розраховані параметри кристалічних комірок для отриманих зразків наведено в табл. 1. Варто зазначити, що на дифрактограмах не виявлено додаткових неідентифікованих піків, що свідчить про відсутність в отриманих осадах нецільових продуктів, зокрема Cu₂O та Cu(OH)₂.

Таблиця 1

Параметри кристалічної ґратки та розмір кристалітів (*L*) синтезованих CuO-NPs

Table 1

Lattice parameters and size of crystallites (*L*) of synthesized CuONPs

C(РБК)	<i>a</i> , Å	<i>b</i> , Å	<i>c</i> , Å	β	<i>V</i> , Å ³	<i>L</i> , нм
1 г/л	4,682(3)	3,426(2)	5,141(3)	99,12(2)	81,4(2)	12,3
2 г/л	4,668(7)	3,414(5)	5,120(7)	99,17(4)	80,6(4)	6,7
5 г/л	4,72(1)	3,409(7)	5,14(1)	99,58(7)	81,5(5)	4,9

Водночас з ростом концентрації РБК, на дифрактограмах простежується суттєве розширення піків, тому за рівнянням Шеррера [24] розраховано розмір кристалітів в утворених CuO-NPs (табл. 1). Як і варто було очікувати, розмір кристалітів CuO-NPs зменшується з ростом концентрації РБК, причому найсуттєвіше зменшення *L* простежується в діапазоні концентрацій від 1 до 2 г/л, що свідчить про високу ефективність біокомплексу як стабілізатора наночастинок.

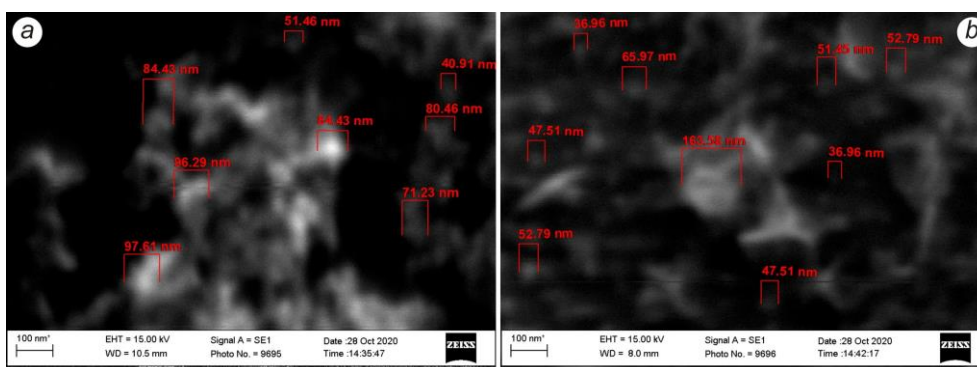


Рис. 2. SEM-зображення CuO-NPs, отриманих за вихідних концентрацій РБК 1 (а) та 2 (б) г/л. Кратність збільшення – 200 000

Fig. 2. SEM-images of CuO-NPs obtained at starting concentrations of RBC 1 (a) and 5 (b) g/L. Magnification 200k

З використанням SEM (рис. 2) визначено, що CuO кристалізується у вигляді частинок переважно неправильної форми розмірами 35–90 нм, причому полідисперсність CuO-NPs знижується з ростом концентрації РБК. Так, за концентрації РБК 1 г/л розмір частинок знаходиться в межах від 40 до 90 нм, а за концентрації 5 г/л – переважна більшість частинок характеризується розміром 35–55 нм. Додатково варто зазначити, що: 1) зважаючи на розмір кристалітів CuO, визначених на основі X-променевої дифракції, утворені CuO-NPs можна вважати агломератами, які складаються з блоків з розмірами 5–12 нм; 2) окремі великі агломерати з розмірами 100–200 нм, які можна відмітити на SEM-зображеннях, утворюються, ймовірно, під час підготовки зразків для досліджень (висушуванні колоїдного розчину на підкладці).

Загальновідомо, що CuO є напівпровідником *p*-типу, тому таким наночастинкам CuO-NPs притаманне явище поверхневого плазмонного резонансу. Нами досліджені спектральні характеристики отриманих колоїдних розчинів оксиду міді (рис. 3).

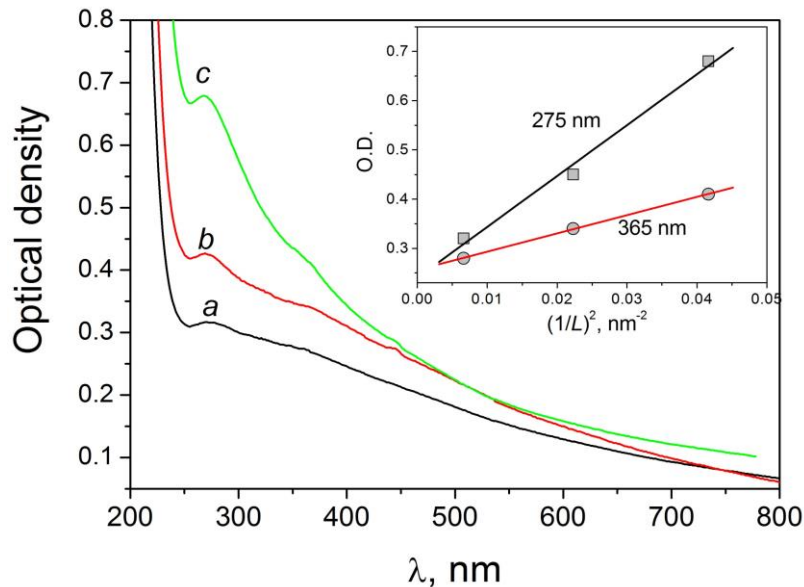


Рис. 3. Спектри поглинання колоїдних розчинів CuO, отриманих у присутності 1 г/л (а), 2 г/л (b) та 5 г/л (c) РБК. Вставка – залежність оптичної густини розчинів при 275 нм та 365 нм від розмірів кристалітів CuO

Fig. 1. Absorption spectra of colloid solutions of CuO, obtained in the presence of 1 g/L (a), 2 g/L (b) and 5 g/L (c) RBC. Insertion is the dependence of the optical density of solutions at 275 nm and 365 nm on the size of CuO crystallites

Виявлено, що електронні спектри золів CuO-NPs характеризуються наявністю інтенсивної смуги поглинання при 275 нм, а також слабковираженого “плеча” в діапазоні довжин хвиль 300–400 нм. Такі спектри поглинання CuO-NPs є типовими для колоїдних розчинів оксиду міді. Зокрема, в [25] показано, що золі нанопластинок CuO розмірами 60–200 нм характеризуються двома смугами поглинання при 290 та 365 нм, водночас зі зменшенням розмірів частинок та кристалітів CuO інтенсивність смуги поглинання при 365 нм знижується і практично зникає, а для короткохвильової смуги протікає гіпсохромний зсув [26].

Як бачимо з рис. 3, інтенсивність поглинання колоїдних розчинів CuO нелінійно зростає зі збільшенням концентрації РБК. Такий ефект, імовірно, можна пояснити наступним чином. Згідно з теорією Мі [27] коефіцієнт екстинкції (C_{ext}) малих частинок описується рівнянням:

$$C_{ext} = \frac{24\pi^2 r \epsilon_M^{1.5}}{\lambda} \cdot \frac{\epsilon_2}{(\epsilon_1 + 2\epsilon_M)^2 + \epsilon_2^2}, \quad (1)$$

де r – радіус частинки; λ – довжина хвилі падаючого світла; ϵ_M – діелектрична проникність середовища; ϵ_1 і ϵ_2 – значення дійсної і уявної діелектричної проникності металу, які залежать від частоти електромагнітного випромінювання.

Зважаючи на однакову вихідну концентрацію CuSO_4 в реакційній суміші, концентрація CuO-NPs у колоїдних розчинах буде обернено пропорційна до розміру частинок у кубі:

$$C(\text{CuONPs}) \sim (1/L)^3. \quad (2)$$

Якщо об'єднати (1) і (2) з рівнянням Бугера–Ламберта–Бера, отримаємо:

$$\text{O.D.} \sim (1/L)^2. \quad (3)$$

Як бачимо з рис. 3, отримані дані задовільно лінеаризуються (коефіцієнт кореляції 0,99) в координатах рівняння (3), що підтверджує наведені вище міркування, однак такі припущення потребують більш детального дослідження.

Відомо, що наночастинки оксиду міді проявляють задовільні антимікробні властивості, а механізм мікробіцидної дії CuO-NPs пояснюють “*ефектом троянського коня*” (*Trojan-horse type mechanism*) [28]. CuO-NPs проникають через клітинну мембрану і слугують джерелом йонів Cu^{2+} , які взаємодіють з органелами клітини, пригнічуючи їх життєдіяльність. Причому, на відміну від срібла, найбільш помітно антибактеріальна дія CuO-NPs проявляється на стадії експоненційного росту колонії мікроорганізмів [29], що дає змогу вважати CuO-NPs перспективним компонентом для бактерицидних препаратів широкого спектра дії. На прикладі грам-негативних бактерій–фітопатогенів *Agrobacterium tumefaciens* і *Xanthomonas campestris* досліджено антимікробну активність CuO-NPs , отриманих за вихідної концентрації РБК 5 г/л. Варто зазначити, що для проведення досліджень отриманий золь CuO-NPs розбавляли дистильованою водою в пропорції 1 : 9.

Таблиця 2

Антимікробна активність синтезованих CuO-NPs

Table 2

Antimicrobial activity of synthesized CuO-NPs

Розведення	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		<i>Xanthomonas campestris</i>	
	РБК (1 г/л)	CuO-NPs /РБК	РБК (1 г/л)	CuO-NPs /РБК
1 : 1	+	–	+	–
1 : 2	+	–	+	–
1 : 4	+	–	+	–
1 : 8	+	+	+	+

Примітка: «+» – є ріст бактерій, «–» – немає росту бактерій.

Виявлено, що модифіковані РБК CuO-NPs проявляють високу анти мікробну активність стосовно досліджених мікроорганізмів, а значення МІК та МБК становлять 20 та 40 мкг/мл, відповідно. Варто зазначити, що значення МБК для синтезованих у присутності РБК CuO-NPs є більш, ніж удвічі, нижчим порівняно з відомими значеннями для CuO-NPs , стабілізованих полівінілпіролідом [25], а тому отримані колоїдні розчини можна застосовувати як складові антимікробних препаратів для захисту рослин.

4. Висновки

На основі проведених досліджень можна зробити висновок, що рамноліпідний біокомплекс, який є низькомолекулярним вторинним метаболітом бактерій роду *Pseudomonas sp. PS-17*, є ефективним стабілізатором CuO-NPs , методика синтезу яких є простою в апаратурному оформленні, масштабованою, а одержувані при цьому наночастинки не містять шкідливих речовин. З'ясовано, що CuO у присутності РБК кристалізується у вигляді полікристалітних частинок переважно неправильної

форми з розмірами 35–90 нм, причому полідисперсність CuO–NPs знижується з ростом концентрації РБК. Виявлено, що інтенсивність смуг поглинання поверхневого плазмонного резонансу синтезованих CuO–NPs при 275 і 365 нм є обернено пропорційною до квадрата розміру кристаліта CuO. Досліджено антимікробну активність CuO–NPs стосовно грам-негативних фітопатогенних бактерій *Agrobacterium tumefaciens* та *Xanthomonas campestris* і показано, що значення мінімальної бактерицидної концентрації CuO–NPs, стабілізованих РБК, є більш ніж вдвічі нижчим порівняно з CuO–NPs, стабілізованих полівінілпіролідом, а тому отримані колоїдні розчини CuO можуть бути рекомендовані як екологічно безпечний компонент для бактерицидних препаратів біомедичного призначення.

5. Подяка

У статті наведено результати досліджень, отримані під час виконання бюджетної теми відомчого замовлення Відділення ФХГК ІнФОВ ім. Л. М. Литвиненка НАН України (код фінансування 6541230 – “Підтримка розвитку пріоритетних для держави наукових досліджень і науково-технічних (експериментальних) досліджень; напрям 1”), а також за часткової фінансової підтримки Національного фонду досліджень України (грант № 2020.02/0309).

1. Чекман І. С., Ульберг З. Р., Маланчук В. О. та ін. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація. // Київ: Поліграф плюс, 2012. 328 с.
2. Наноматеріали и нанокompозиты в медицине, биологии, экологии / под ред. А. П. Шпака, В. Ф. Чехуна. // Київ: Наук. думка, 2011. 444 с.
3. Чекман І. С. Нанофармакологія. // Київ: Задруга, 2011. 424 с.
4. Li G., Li X., Zhang Z. Preparation methods of copper nanomaterials // Prog. Chem. 2011. Vol. 23. P. 1644–1656.
5. Giannossa L. C., Longano D., Ditaranto N. et al. Metal nanoantimicrobials for textile applications // Nanotechnol. Rev. 2013. Vol. 2, No 3. P. 307–331. DOI: <https://doi.org/10.1515/ntrev-2013-0004>
6. Marambio-Jones C., Hoek E. M. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment // J. Nanopart. Res. 2010. Vol. 12. P. 1531–1551. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>
7. Chekman I. S., Ulberg Z. R., Gorchakova N. O. et al. The prospects of medical application of metal-based nanoparticles and nanomaterials // Lik. Sprava. 2011. No 1–2. P. 3–21.
8. Andrusishina I. N., Holub I. A., Didikin G. G. et al. Structure, properties and toxicity of silver and copper oxide nanoparticles // Biotechnology. 2011. Vol. 4, No 6. P. 51–59. (in Russian).
9. Sahithi K., Swetha M., Prabakaran M., Moorthi A., Saranya N., Ramasamy K., Srinivasan N., Partridge N., Selvamurugan N. Synthesis and characterization of nanoscale hydroxyapatite-copper for antimicrobial activity towards bone tissue engineering applications // J. Biomed. Nanotechnol. 2010. Vol. 6, No 4. P. 333–339. DOI: <https://doi.org/10.1166/jbn.2010.1138>

10. Zain N. M., Stapley A. G. F., Shama G. Green synthesis of silver and copper nanoparticles using Ascorbic acid and Chitosan for antimicrobial applications // Carbohydrate polymers. 2014. Vol. 112. P. 195–202.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.081>
11. Mondal S., Roy N., Laskar R. A., Basu S., Mandal D., Begum N. A. Biogenic synthesis of Ag, Au and bimetallic Au / Ag alloy nanoparticles using aqueous extract of mahogany (*Swietenia mahogani* JACQ.) leaves // Colloids Surf. B. 2011. Vol. 82. P. 497–504. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.007>
12. Murali Krishna I., Bhagavanth Reddy G., Veerabhadram G., Madhusudhan A. Eco-friendly green synthesis of silver nanoparticles using *salmalia malabarica*: synthesis, characterization, antimicrobial, and catalytic activity studies // Appl. Nanosci. 2016. Vol. 6. P. 681–689. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13204-015-0479-6>
13. Alam M. N., Roy N., Mandal D., Begum N. A. Green chemistry for nanochemistry: exploring medicinal plants for the biogenic synthesis of metal NPs with fine-tuned properties // RSC Advances. 2013. Vol. 3. P. 11935–11956.
DOI: <https://doi.org/10.1039/C3RA23133J>
14. Kumar N., Salar R. K., Kumar R., Prasad M., Brar B., Nain V. Green synthesis of silver nanoparticles and its applications. A Review // Nano Trends: A Journal of Nanotechnology and Its Applications. 2017. Vol. 19. P. 1–22.
15. Sotirova A., Avramova T., Stoitsova S., Lazarkevich I., Lubenets V., Karpenko E., Galabova D. The importance of rhamnolipid-biosurfactant induced changes in bacterial membrane lipids of *Bacillus subtilis* for the antimicrobial activity of thiosulfonates // Current Microbiology. 2012. Vol. 65. P. 534–541.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0191-7>
16. Yerokhin V., Karpenko O. Optimization of parameters of biosynthesis of surface-active rhamnolipids by the strain *Pseudomonas sp. PS-17* in the bioreactor with injection-vortex aeration system // Journal of Microbiology Research. 2014. Vol. 4. P. 1–5.
17. Remichkova M., Galabova D., Roeva I., Karpenko E., Shulga A., Galabov A. Anti-herpesvirus activities of *Pseudomonas sp. PS-17* rhamnolipid and its complex with alginate // Zeitschrift für Naturforschung. 2008. Vol. 63. P. 75–81.
DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-2008-1-214>
18. Abdel-Mawgoud A. M., Aboulwafa M. M., Hassouna N. A. Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate BS-20 // Appl. Biochem. Biotechnol. 2009. Vol. 157. P. 329–345. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8285-1>
19. Ron E., Rozenberg E. Natural role of biosurfactants // Environ. Microbiol. 2001. Vol. 3. P. 229–236. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x>
20. Yerokhin V., Pokynbroda T., Karpenko O., Novikov V. Study of the growth and synthesis of the target product by the strain *Pseudomonas species PS-17* – producent of extracellular biosurfactants // Visn. Natsion. Univers. “Lvivska politehnika”. 2006. Vol. 553. P. 124–127 (in Ukrainian).
21. Karpenko E. V., Pokynbroda T. Ya., Makitra R. G., Palchukova E. Ya. Optimal methods for isolating the biogenic surfactant rhamnolipids // Journal of General Chemistry. 2009. No 12. P. 2011 (in Russian).
22. Akselrud L., Grin Y. WinCSD: software package for crystallographic calculations (Version 4) // J. Appl. Cryst. 2014. Vol. 47(2). P. 803–805.
DOI: <https://doi.org/10.1107/S1600576714001058>

23. *Sotirova A., Avramova T., Stoitsova S., Lazarkevich I., Lubenets V., Karpenko E., Galabova D.* The importance of rhamnolipid-biosurfactant induced changes in bacterial membrane lipids of *Bacillus subtilis* for the antimicrobial activity of thiosulfonates // *Curr. Microbiol.* 2012. Vol. 65. P. 534–541.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0191-7>
24. *Monshi A., Foroughi M. R., Monshi M. R.* Modified Scherrer equation to estimate more accurately nano-crystallite size using XRD // *WJNSE.* 2012. Vol. 2(3). P. 154–160. DOI: <https://doi.org/10.4236/wjnse.2012.23020>
25. *Shahmiri M., Ibrahim N. A., Shayesteh F., Asim N., Motallebi N.* Preparation of PVP-coated copper oxide nanosheets as antibacterial and antifungal agents // *J. Mater. Res.* 2013. Vol. 28(22). P. 3109–3118. DOI: <https://doi.org/10.1557/jmr.2013.316>
26. *Sankar R., Manikandan P., Malarvizhi V., Fathima T., Shivashangari K. S., Ravikumar V.* Green synthesis of colloidal copper oxide nanoparticles using *Carica papaya* and its application in photocatalytic dye degradation // *Spectrochimica Acta Part A.* 2014. Vol. 121. P. 746–750. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.12.020>
27. *Mie, G.* Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen // *Ann. Phys.* 1908. Vol. 330(3). P. 377–445. DOI: <https://doi.org/10.1002/andp.19083300302>
28. *Ivask A., Juganson K., Bondarenko O., Mortimer M.* et al. Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells in vitro: a comparative review // *Nanotoxicology.* 2014. Vol. 8. P. 57–71. DOI: <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.855831>
29. *Dadi R., Azouani R., Traore M., Mielcarek C., Kanaev A.* Antibacterial activity of ZnO and CuO nanoparticles against gram positive and gram negative strains // *Mater. Sci. Eng. C.* 2019. Vol. 104. P. 109968.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109968>

**SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CuO NANOPARTICLES
STABILIZED BY RHAMNOLIPID BIOMOLECULE
OF MICROBIAL ORIGIN**

**L. Bazylyak^{1*}, A. Kytsya^{1,2}, P. Lyutyi^{2,3}, V. Dozhdzhanyk¹,
A. Prokopalo¹, N. Shcheglova¹, O. Karpenko¹, O. Kuntiy³**

¹*Department of Physical Chemistry of Fossil Fuels
Institute of Physical Organic Chemistry and Coal Chemistry named after L. M. Lytvynenko
NAN Ukraine,
Naukova Str. 3a, 79060 Lviv, Ukraine
e-mail: bazylyak.L.I@nas.gov.ua;*

²*Physico-Mechanical Institute named after G. V. Karpenko NAN Ukraine,
Naukova Str. 5, Lviv, 79060, Ukraine;*

³*Lviv Polytechnic National University,
Bandery Str. 12, 79013, Lviv, Ukraine*

A wide range of both physical and chemical methods has been developed for the synthesis of copper-based nanoparticles. At the same time, especially promising from the ecological point of view methods of obtaining colloidal solutions are the so-called “green” methods of synthesis, the essence of which is the use of natural biologically active substances and can also enhance the antimicrobial activity of the inorganic component. A promising class of polyfunctional substances can be considered biogenic surfactants (biosurfactants), namely the products of microbial synthesis, which are now widely studied and considered an environmentally friendly alternative to synthetic surfactants. Such biosurfactants often also have antimicrobial and antiviral activities, and therefore their combination with copper-based nanoparticles will combine and enhance the properties of both components to create modern environmentally friendly drugs with antimicrobial action. Among the wide range of promising microorganisms-producers of surfactants, the genus *Pseudomonas* deserves a special attention, which synthesizes extracellular surfactant glycolipids with high surface, emulsifying and foaming activities. Therefore, the aim of this work was to obtain concentrated colloidal solutions of copper oxide in the presence of a biogenic surfactant, so-called rhamnolipid biocomplex synthesized by culture of *Pseudomonas sp. PS-17*, which simultaneously provides satisfactory stabilization of colloidal copper solutions and is non-toxic, to study the effect of rhamnolipid biocomplex concentration on the characteristics of the obtained copper oxide nanoparticles, as well as to investigate their antimicrobial action.

Concentrated colloidal solutions of copper oxide, stabilized by rhamnolipid biocomplex (RBC), which is a low molecular weight secondary metabolite of bacteria of the genus *Pseudomonas sp. PS-17* and at the same time provides satisfactory stabilization of colloidal solutions of copper oxide and is non-toxic have been synthesized. Copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) were obtained by the decomposition reaction of freshly prepared copper hydroxide in an alkaline medium in the presence of RBC. The obtained CuO-NPs were investigated using scanning electron microscopy, spectroscopy in the UV-visible range, as well as the method of X-ray diffraction. It was found that the obtained CuO-NPs form agglomerates of irregular shape with a size of 35–90 nm. The sizes of crystallites of synthesized CuO-NPs were calculated by X-ray diffraction patterns. It was found that the size of the crystallites decreases from 12 to 5 nm with increasing initial concentration of RBC. The antimicrobial activity of the obtained concentrated sol against two test microorganisms, namely *Agrobacterium tumefaciens* and *Xanthomonas campestris* was studied. It was found that the obtained CuO-NPs show a sufficiently high antimicrobial activity against these microorganisms, and the values of the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) are 20 and 40 µg/ml, respectively.

Keywords: nanoparticles of copper oxides, green synthesis, antimicrobial activity.

Стаття надійшла до редколегії 01.11.2020

Прийнята до друку 18.05.2021