BiOI-põhiste nanomaterjalide efektiivsus saasteainete adsorbeerimisel ja lagundamisel

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Anneli Marhel

Üliõpilaskood:223864LAAB

Juhendaja: Monika Mortimer, Ph.D.,
vanemteadur

Keemilise ja Bioloogilise Füüsika instituut, Keskkonnatoksikoloogia Laboratoorium

Õppekava: Rakenduskeemia ja geenitehnoloogia

Tallinn 2025

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Anneli Marhel
[digitaalselt allkirjastatud]
[02.06.2025]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Monika Mortimer

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.
Kaitsmiskomisjoni esimees: Indrek Koppel
[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Lühendite loetelu 5
Sissejuhatus 6
1. Kirjanduse ülevaade 7
1.1. Keskkonnareostus 7
1.2. Füüsikalis-keemilised meetodid saasteainete kõrvaldamiseks 7
1.2.1. Fotokatalüüs 7
1.2.2. Filtratsioon 8
1.2.3. Adsorptsioon 8
1.3. BiOI kui tõhus saasteaine lagundaja 9
1.3.1. BiOI omadused ja struktuur 9
1.3.2. BiOI süntees 10
1.3.3. BiOI modifikatsioonid 11
1.4. Vismuti, vismutipõhiste nanomaterjalide ja grafeenoksiidi bioloogiline aktiivsus 11
2. Materjalid ja meetodid 13
2.1 Nanomaterjalide suspensioonide valmistamine 13
2.2 Nanomaterjalide suuruse ja ζ-potentsiaali mõõtmine 13
2.3 Antibiootikumide ja $CuSO_4$ lahuste valmistamine 13
2.4 Streptomütsiini kontsentratsiooni mõõtmine spektrofotomeetriliselt kasutades Au nanoosakesi – meetodi optimeerimine 13
2.5 Spot test 14
2.6 Nanomaterjalide suspensioonid $CuSO_4$ lahustes 14
2.7 Biosaadava vase kvantifitseerimine rekombinantsete bakteritega 15
2.8 Reaktiivsete hapnikuühendite kvantifitseerimine nanomaterjalide suspensioonides 15
2.9 Statistiline analüüs 16
3. Tulemused ja arutelu 17
3.1 BiOI omadused vesisuspensioonis 17
3.2 BiOI, BiOI-GO ja GO bioloogilised efektid 20
3.3 Antibiootikumide ja $CuSO_4$ antibakteriaalsete kontsentratsioonide määramine 22
3.4 Streptomütsiini kvantifitseerimine UV-Vis spektrofotomeetria abil 23
3.5 BiOI ja BiOI-GO toime streptomütsiini antibakteriaalsusele 27
3.6 BiOI ja BiOI-GO toime $CuSO_4$ antibakteriaalsusele 28
3.7 BiOI nanomaterjalide vase toksilisust vähendava mehhanismi uurimine 31

4. Järeldused 33
Tänuavaldused 34
Kasutatud allikad 35
Annotatsioon 39
Abstract 40

Lühendite loetelu

SEM – skaneeriv elektronmikroskoopia

GO – grafeenoksiid

3D – kolmemõõtmeline

BiOI-GO – vismutjodiidoksiidi ja grafeenoksiidi komposiit

MilliQ – deioniseeritud vesi

OD – optiline tihedus

P – penitsiliin

S – streptomütsiin

T – tetratsükliin

MBC - minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon

Sissejuhatus

Keskkonnasaaste probleem pälvib tänapäeva maailmas suuremat tähelepanu kui kunagi varem. Antibiootikumide ja raskmetallide reostus avaldab tõsist mõju mitte ainult ökosüsteemidele, vaid ka inimeste tervisele. Kui antibiootikume kasutatakse kontrollimatult, tekib paljudel mikroorganismidel nende ravimite suhtes resistentsus, mis muudab infektsioonide ravimise raskemaks. Raskmetallide kõrge kontsentratsioon vees ja pinnases viib nende kuhjumiseni organismides, mis põhjustab immuunsuse vähenemist, geneetilisi mutatsioone ja selle tulemusena suurendab vähiriski. Seetõttu on oluline välja töötada uusi meetodeid keskkonnasaaste vähendamiseks. Viimase aja üks levinumaid suundi on kasutada saasteainete adsorbeerimiseks nanomaterjale. Näiteks uuritakse suure eripinna ja fotokatalüütiliste omaduste tõttu aktiivselt vismutit sisaldavate nanomaterjalide kasutamise võimalusi. Ühed uudsemad vismutipõhised nanomaterjalid on vismuti halogeniidoksiidid. Näiteks vismutjodiidoksiid (BiOI) on kristalne materjal, millel on kihiline struktuur, mistõttu on BiOI nanomaterjal hea adsorbent. Lisaks on BiOI pooljuht, mille fotokatalüütiline aktiivsus avaldub nähtava valguse toimel. Fotokatalüüs võimaldab lagundada orgaanilisi aineid nagu antibiootikumid ja pestitsiidid ning detoksifiteerida raskmetalle redoksreaktsioonide toimel. BiOI omaduste parandamiseks kombineeritakse seda teiste nanomaterjalidega nagu näiteks grafeenoksiidiga (GO). GO oma suure eripinna ja fotokatalüütiliste omadustega suurendab BiOI adsorbeerivaid ja saasteaineid lagundavat toimet, muutes nanomaterjalide efektiivsust keskkonnaprobleemide lahendamisel.

Selles töös uuriti, kuidas BiOI ja GO kombineeritud kasutamine avab uusi võimalusi tõhusamate ja jätkusuutlikumate nanomaterjalide väljatöötamiseks, mis suudavad lahendada keskkonna- ja terviseprobleeme. Töö eesmärgid:

1) Teha kindlaks optimaalsed tingimused BiOI-põhiste nanomaterjalide vesisuspensioonide valmistamiseks ja määrata nanomaterjalide omadused vesisuspensioonides.

2) Kasutada uudse lähenemisviisina biotesti BiOI-põhiste nanomaterjalide efektiivsuse testimiseks saasteainete (streptomütsiini ja $CuSO_4$) adsorbeerimisel.

3) Teha kindlaks, kas BiOI ja BiOI-GO nanomaterjalid vähendavad biosaadava vase kontsentratsiooni vesikeskkonnas.

Selle töö raames kasutati nanomaterjalide ohutuse ja efektiivsuse samaaegseks uurimiseks „spot“-testi bakteritega, meetodit, mis võimaldab kiiresti ja kuluefektiivselt tuvastada kemikaalide toksilisi või biotsiidseid kontsentratsioone. Inkubeerides bakterit samaaegselt nanomaterjali ja saasteainet sisaldavas suspensioonis, oli võimalik hinnata nanomaterjali saasteainete mürgisust/keskkonnaohtlikkust vähendavat toimet. Töö käigus optimeeriti mikrobioloogilisi meetodeid uute materjalide keskkonnaohutuse ja nende potentsiaali testimiseks keskkonnarakendustes.

Töö viidi läbi Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudi Keskkonnatoksikoloogia laboratooriumis ja uurimust finantseeris Eesti Teadusagentuur (projekt PRG2188).

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Keskkonnareostus

Keskkonnareostus on ulatuslik globaalne probleem, mis vajab kiiret ja tõhusat lahendamist (1). Antibiootikumide liigtarbimise probleem on olnud maailmas üks enim arutatud teemasid väga pikka aega (2). Nende ainete liigne ja ebaõige kasutamine on toonud kaasa tõsise probleemi, kuna mitmed mikroorganismid on nende suhtes resistentseks muutunud (3). Osadel mikroorganismidel võivad olla looduslikud omadused, mis tagavad nende resistentsuse teatud ravimite suhtes, samas kui resistentsuse omandamine võib toimuda kromosoomsete geenide mutatsioonide või horisontaalse geeniülekande kaudu (4). Keskkonnas esinev antimikroobne resistentsus on märkimisväärne ökoloogiline oht, kuna isegi madalad antibiootikumide kontsentratsioonid vees ja pinnases soodustavad resistentsete mikroorganismide ellujäämist ja levikut. Antibiootikumide mõju keskkonnale võivad suurendada kaassaasteained, nagu raskmetallid, mis on antimikroobset resistentsust soodustavad tegurid (5).

Raskmetallid on ühed kõige levinumad saasteained. Neid leidub keskkonnas peamiselt inimtegevuse tõttu, sealhulgas fossiilkütuste põletamise, plastiku tootmise ja tööstusliku põllumajanduse tagajärjel (6). Raskmetallide eripäraks on see, et need on anorgaanilised ühendid, mis ei lagune. Üks keskkonnas levinud raskmetall on näiteks Cu (7). Raskmetallide negatiivne mõju tuleneb nende võimest akumuleeruda elusorganismides. Näiteks taimed ja vee-elustik absorbeerivad keskkonnast saasteaineid, mille tulemusel kogunevad need ained nende kudedesse kontsentratsioonides, mis on oluliselt kõrgemad kui keskkonnas. See protsess on eriti ohtlik ökosüsteemidele, kuna aja jooksul võib see vähendada taimede kasvu ja arengut, samuti halvendada toitainete omastamist, mis omakorda mõjutab kogu ökosüsteemi tasakaalu. Inimese tervist mõjutab saasteainete kuhjumine vee, toidu ja õhusaaste kaudu, mis omakorda suurendab erinevate krooniliste haiguste tekke tõenäosust (8).

1.2. Füüsikalis-keemilised meetodid saasteainete kõrvaldamiseks

Erinevate saasteainete eemaldamiseks keskkonnast, et vähendada võimalikke ohte inimeste tervisele ja ökosüsteemidele, on oluline kasutada efektiivseid meetodeid (9). Saasteainete eemaldamise efektiivsust mõjutavad mitmed tegurid, nagu saasteaine keemilised omadused, keskkonna pH, temperatuur ja saasteainete koosesinemine (10). Kuna bioloogilised meetodid (näiteks bioloogiline degradatsioon, mille käigus kasutatakse orgaaniliste saasteainete lagundamiseks mikroorganisme nagu baktereid ja seeni) on aeganõudvad ja piiratud tõhusega, kasutatakse enamasti saasteainete eemaldamiseks füüsikalis-keemilisied meetodeid (11). Järgnevalt on kirjeldatud põhilisi füüsikalis-keemilisi meetodeid saasteainete kõrvaldamiseks: fotokatalüüs, filtratsioon ja adsorptsioon.

1.2.1. Fotokatalüüs

Fotokatalüüs on uuenduslik veepuhastustehnoloogia, mis põhineb valguse poolt aktiveeritavate pooljuhtide kasutamisel. Nähtava- või ultraviolettkiirgusega kokkupuutel tekivad neis materjalides elektron-augu paarid, mis käivitab saasteainete lagundamisprotsessi. Seda tehnoloogiat kasutatakse aktiivselt orgaaniliste lisandite, raskmetallide ja muude mürgiste ühendite eemaldamiseks veest (7).

Erilist tähelepanu on pööratud fotokatalüütilisele detoksifitseerimisele. See tehnoloogia kasutab valgusenergiat, et muuta ohtlikud saasteained mittetoksilisteks vormideks (12). Fotokatalüüs aitab raskmetallide puhul muuta ohtlikud, kõrgema oksüdatsiooniastega metalliioonid vähem ohtlikeks ja stabiilsemateks vormideks. See toimub siis, kui valguse abil aktiveeritud fotokatalüsaator muudab metalli keemilisi omadusi, redutseerides neid vähem toksilisteks vormideks. Nii väheneb nende oht loodusele, muutes need vähem mürgisteks (13).

1.2.2. Filtratsioon

Üks levinumaid füüsikalis-keemilisi vee puhastamise meetodeid on filtreerimine, millest eriti tõhusaks peetakse membraanfiltreerimist. See meetod põhineb poolläbilaskva membraani kasutamisel, mis laseb läbi ainult kindla suurusega molekule, hoides samal ajal kinni saasteained. Antud meetodi eelis seisneb selle kuluefektiivsuses ja madalas energiavajaduses. Lisaks võimaldab see saasteainete eemaldamist ilma toksiliste kõrvalproduktide või lisareostuse tekketa (9).

Üks membraanfiltratsiooni tüüp on ultrafiltreerimine, mis kasutab väga väikeste pooridega membraane (5–20 nanomeetrit). See meetod võimaldab tõhusalt eemaldada veest väikseimad saasteained, nagu orgaanilised molekulid. Ultrafiltratsioon töötab madalal rõhul, tagades kõrge puhastusastme ja sobib nii tööstus- kui ka kodusüsteemidesse. Lisaks ultrafiltreerimisele on olemas ka nanofiltratsioon, membraanipuhastusmeetod, mis võimaldab veest eemaldada veelgi peenemaid osakesi. Nanofiltratsioonis kasutatavatel membraanidel on umbes 1 nanomeetri suurused poorid, mis võimaldavad eemaldada veest mitte ainult orgaanilisi ühendeid ja mikrosaasteaineid, vaid ka mõningaid lahustunud sooli, raskmetalle ja pestitsiide (7).

1.2.3. Adsorptsioon

Üks levinumaid ja tõhusamaid viise saasteainete eemaldamiseks on kasutada sellist protsessi nagu adsorptsioon. Adsorptsioon on protsess, mille käigus toimub aine molekulide või ioonide adhesioon tahke materjali pinnale, moodustades adsorbaadi kihi (14). See protsess mängib võtmerolli vee, õhu ja muu keskkonna puhastamisel erinevatest saasteainetest, nagu raskmetallid, orgaanilised ühendid ja mikroorganismid (15).

Sõltuvalt adsorbaadi ja adsorbendi vastasmõjust, võib eristada kahte tüüpi adsorptsiooni: füüsikalist ja keemilist (16). Füüsikaline adsorptsioon põhineb nõrkadel vastasmõjudel, nagu van der Waalsi jõud, mis muudab protsessi pöörduvaks (17). Erinevalt füüsikalisest adsorptsioonist hõlmab keemiline adsorptsioon tugevamate sidemete, näiteks ioonsete või kovalentsete sidemete moodustumist adsorbaadi ja adsorbeeriva pinna vahel (18).

Nanomaterjalid on viimastel aastatel leidnud järjest laialdasemat kasutust veepuhastuses tänu oma eripärastele omadustele. Nende osakeste suur pindala mahuühiku kohta, poorne ehitus ja kõrge reaktiivsus muudavad nad tõhusateks saasteainete sidujateks. Just nende omaduste tõttu suudavad nanomaterjalid eemaldada veest mitmesuguseid aineid palju paremini kui traditsioonilised adsorbendid. Lisaks võivad nanomaterjalid muuta adsorbente veelgi efektiivsemaks tänu lisafunktsioonidele. Näiteks hõbeda nanostruktuurid paistavad silma oma loomuliku antimikroobse

toime poolest, mis aitab võidelda mikroorganismidega ning suurendada veepuhastusprotsesside üldist tõhusust (1,19).

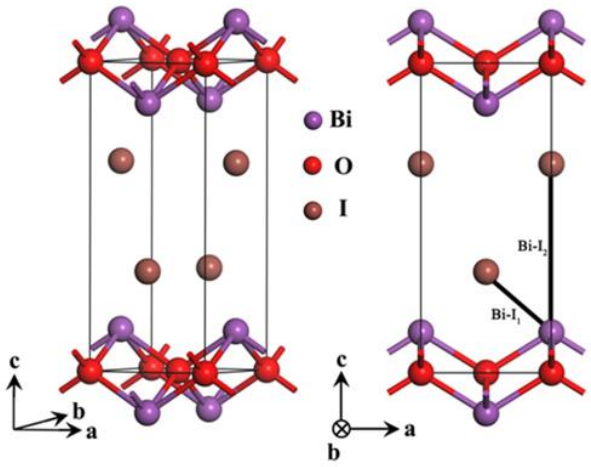
1.3. BiOI kui tõhus saasteaine lagundaja

Üheks paljulubavamaks nanomaterjaliks saasteainete eemaldamisel on vismutipõhised materjalid (20,21). Nende eelised on madal toksilisus ja head fotokatalüütilised ja adsorbeerivad omadused (21,22). Näiteks on uuritud vismuti halogeniidoksiide, sealhulgas vismutoksiidjodiidi (BiOI), millele on iseloomulik nähtava valgusega aktiveeritav fotokatalüütiline toime (23,24).

Kirjanduse põhjal on BiOI efektiivne mitmesuguste saasteainete adsorbeerimisel ja degradeerimisel, muutes selle materjali atraktiivseks vee ja õhu puhastamisel (25). Lisaks on uuritud BiOI kasutamist sensorites, mille abil tuvastada saasteaineid keskkonnas, sealhulgas antibiootikume ja isegi väikeses annuses röntgenikiirgust (26). Uuringud näitavad, et BiOI suudab tuvastada antibiootikume, nagu streptomütsiin (27). See saavutatakse tänu BiOI kombinatsioonile kulla nanoosakestega, mis oluliselt tõstab selle võimet adsorbeerida ja tuvastada saasteaineid, muutes materjali veelgi tõhusamaks keskkonnaprobleemide lahendamisel (28).

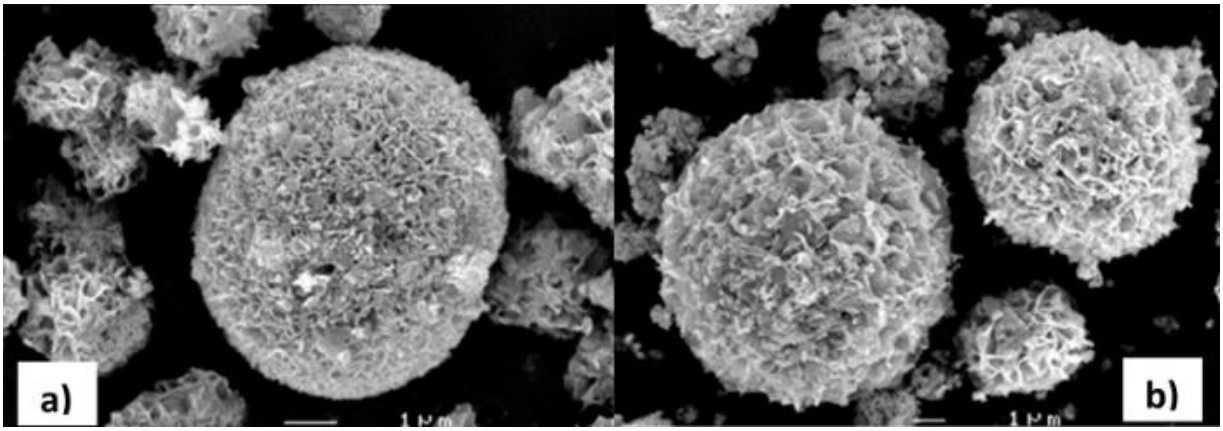
1.3.1. BiOI omadused ja struktuur

BiOI on kahemõõtmeline nanomaterjal, mis sarnaneb selliste ainetega nagu grafeen ja siirdemetallide dikalkogeniidid (20). Sellel on mitmeid ainulaadseid omadusi, sealhulgas kõrge keemiline reaktsioonivõime ja suur eripind, mis oluliselt tõstab selle efektiivsust erinevates rakendustes (19). Kõik need omadused on seletatavad asjaoluga, et BiOI-l on suhteliselt kitsas keelutsoon (1,89 eV), mis võimaldab tõhusalt neelata valgust nähtavas spektri osas. See parandab oluliselt materjali elektrilisi ja optilisi omadusi, mistõttu saab BiOI nanomaterjale laialdaselt kasutada fotokatalüütiliste protsesside arendamiseks (24). BiOI kristallstruktuur on tetragonaalne, koosnedes vahelduvatest Bi_2O_2 ja joodi aatomite kihtidest [(21), joonis 1]. Kihtide vahel tekkivad elektrilised mõjud aitavad kaasa aatomite polariseerimisele, mille tulemusena tekivad lokaalsed sisemised väljad. Need väljad omakorda suurendavad fotogeenselt loodud elektron-augu paaride eraldumise efektiivsust (21).



Joonis 1. BiOI kristallstruktuuri mudel. Struktuur on esitatud kahemõõtmeliselt, mis demonstreerib aatomitevavahelisi sidemeid ja aatomite ruumilist paigutus kristallvõres. Kohandatud artiklist (21).

Lisaks kahemõõtmelisele (3D) struktuurile on BiOI-l ka kolmemõõtmeline mikrosfääriline kuju. See omadus annab materjalile täiendavaid eeliseid, laiendades selle potentsiaali erinevates rakendustes [(29,30), joonis 2]. Mikrosfäärid koosnevad nanolehtedest, mis moodustavad hierarhilise struktuuri. Elektronmikroskoopilisel analüüsil on mikrosfääride pinnal nähtavad poorid, mis mängivad võtmerolli reaktiivsete osakeste jaotumise aeglustamises katalüsaatori pinnal. See aeglasem ümberjaotumine võrreldes siledapinnaliste materjalidega võimaldab pikemat kontakti saasteainetega, suurendades seeläbi fotodegradatsiooni ja adsorptsiooni efektiivsust. See ainulaadne 3D BiOI struktuur parandab ka materjali stabiilsust ja töökindlust erinevates keskkonnatingimustes (30).



Joonis 2. Solvotermilise meetodiga sünteesitud BiOI mikrosfääride skaneeriva elektronmikroskoopia (SEM) pildid. Mikrosfääride pinnaomadused sõltusid sünteesiajast: 2-tunnise reaktsiooni tulemusena saadi sileda pinnaga sfäärid (a), 6-tunnise sünteesi tulemusena mikrosfääride poorsus suurenes (b). Kohandatud artiklist (29).

Vaatamata BiOI paljudele eelistele on sellel ka mõned puudused. BiOI üheks oluliseks puuduseks on selle redutseerimise töömahukus ja madal efektiivsus Fotokatalüütilise reaktsiooni tingimustes piirab see BiOI võimet osaleda tõhusas elektronide ülekandes, mis omakorda vähendab selle üldist fotokatalüütilist aktiivsust. See on tüüpiline probleem pulbriliste fotokatalüsaatorite puhul. Selle peamiseks põhjuseks on aglomeratsioon, mille käigus materjaliosakesed kleepuvad kokku suurematekss osadeks. Seetõttu väheneb aktiivsete adsorptsioonisaitide hulk ja halveneb valgusneeldumine, mis omakorda vähendab materjali üldist efektiivsust (31).

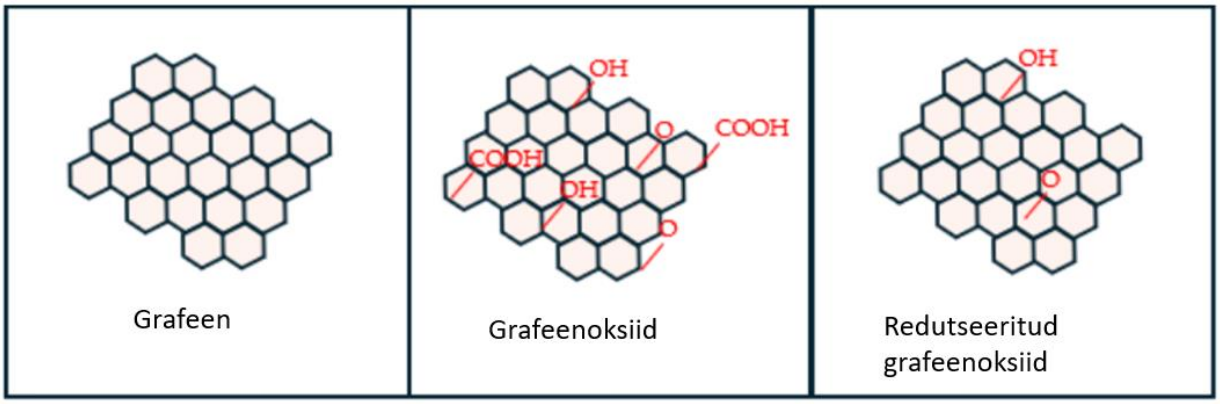
1.3.2. BiOI süntees

BiOI sünteesimiseks kasutatakse erinevaid meetodeid, nagu hüdrolüüs, solvotermiline süntees ja kuumtöötlus (5). Kõige tõhusam meetod 2D-struktuuri loomiseks on kuumtöötlus, kuna selle meetodi abil saadud BiOI nanomaterjalid näitavad seitsmekordset fotoaktiivsuse kasvu (21). See protsess hõlmab aine kuumutamist soovitud temperatuurini kindla kiirusega, seejärel jahutamist toatemperatuurini, pesemist puhastamiseks ja kuivatamist kindlaksmääratud temperatuuril (32). 3D-

struktuuride maksimaalse efektiivsusega sünteesimiseks kasutatakse kõige sagedamini solvotermilist sünteesi, mis soodustab paremate fotokatalüütiliste omadustega hierarhiliste struktuuride teket (21). Solvotermiline süntees on protsess, mille käigus lähteained lahustatakse spetsiifilistes lahustites (näiteks: vesi, etanool, etüleenglükool ja glütserool), mille järel saadud segu asetatakse suletud anumasse näiteks autoklaavi ja kuumutatakse kõrgel temperatuuril. Selle protsessi käigus saavad ained reageerida kontrollitud tingimustes, võimaldades nanomaterjalide soovitud struktuuri teket. Pärast reaktsiooni segu jahutatakse, ja nanoosakesi sisaldav sade eraldatakse lahusest tsentrifuugimise abil (33). Sadet pestakse liigsete ioonide või lahustuvate jääkide eemaldamiseks ja kuivatatakse madalal temperatuuril, et saavutada kõrge kristallilisus ja soovitud omadustega puhtad materjalid (34). Näiteks sellise sünteesiga on võimalik saada BiOI ilma võõrfaaside moodustumiseta.

1.3.3. BiOI modifikatsioonid

BiOI fotokatalüütiliste ja adsorbeerivate omaduste veelgi efektiivsemaks muutmiseks on BiOI kombineeritud erinevate nanomaterjalidega (35). Näiteks on kasutatud modifitseerimist metalli nanoosakeste (näiteks kuld), aga ka süsinikupõhiste nanomaterjalidega, nagu grafeen ja selle derivaadid (36).



Joonis 3. Grafeeni, grafeenoksiidi ja redutseeritud grafeenoksiidi struktuurid. Kohandatud artiklist (36).

Grafeenil on mitmeid derivaate, nagu grafeenoksiid (GO) ja redutseeritud GO (joonis 3). Puhas grafeen on struktuur, mis koosneb süsinikuaatomitest, mis on heksagonaalselt ühendatud kahemõõtmeliseks võreks. Grafeen on tuntud oma suure tugevuse ja erakordne juhtivuse poolest, mistõttu on see täiuslik kandidaat kasutamiseks sellistes tööstusharudes nagu meditsiin ja elektroonika (36). GO on grafeenipõhine materjal, mis säilitab sarnase aatomistruktuuri, kuid millele on lisatud hapnikku sisaldavaid funktsionaalrühmi, mis eristab seda lähtematerjalist (37). Need rühmad suurendavad GO lahustuvust vees ja suurendavad oluliselt materjali reaktsioonivõimet (38). Redutseeritud GO saadakse GO redutseerimisel, mille tulemusena eemaldatakse hapnikku sisaldavad funktsionaalsed rühmad (39).

1.4. Vismuti, vismutipõhiste nanomaterjalide ja grafeenoksiidi bioloogiline aktiivsus

Bi on keemiline element, mille füüsikalised ja keemilised omadused on sarnased metallidele nagu plii, kuid selle toksilisus on palju väiksem. Vismut võib esineda mitmesugustes oksüdatsiooniastmetes,

sealhulgas +1, +3 ja +5, kusjuures kõige stabiilsem on Bi^{3+} (20). Vismuti ühendite puhul on leitud, et Bi^{3+} ioonid on bioloogilistes tingimustes üldiselt ohutud. Näiteks loetakse Bi^{3+} maksimaalseks ohutuks plasmakontsentratsiooniks 50 µg/ml (40).

BiOI nanomaterjali loetakse samuti suhteliseks ohutuks materjaliks. Vetikatega läbiviidud uuringud näitavad, et madalad BiOI kontsentratsioonid stimuleerivad vetikate kasvu, mõjudes kasulikult, samas kui kõrgete kontsentratsioonide korral esineb kasvu pärssimine ja oksüdatiivne stress (22). Uuringutes, mille eesmärk oli uurida BiOI antibakteriaalset toimet, on näidatud, et materjalil on teatud tingimustel väljendunud antimikroobne efektiivsus. Kõrgeimat aktiivsust täheldatakse annuses 250 µg/ml ja kokkupuuteajaga 5 tundi, mille tulemuseks on üle 50% efektiivsus. Kuid annuse suurenedes üle 250 µg/ml väheneb efektiivsus oluliselt. Selle põhjuseks on nanomaterjalide agregatsioon lahuses, mis vähendab nende aktiivsust ja kättesaadavust mikroobirakkude mõjutamisel (24).

Katseandmetega on veenvalt tõestatud, et GO-põhistel komposiitmaterjalidel on märkimisväärne antibakteriaalne efektiivsus. On näidatud, et need komposiidid ei mõjuta üksnes tavalisi bakteritüvesid, vaid toimivad tõhusalt ka antibiootikumiresistentsete bakterite ning isegi seente vastu. GO komposiitide antibakteriaalne toime sõltub kontsentratsioonist. Uuringud on näidanud, et GO-Ag nanokomposiitide kontsentratsiooni suurenemisega suureneb nende antibakteriaalne toime. Lisaks on oluliseks teguriks, mis mõjutab antibakteriaalse toime efektiivsust, töötlemise aeg. GO komposiitide antibakteriaalne toime on tihedalt seotud kokkupuute kestusega, kus antimikroobne efekt suureneb teatud aja jooksul. Näiteks GO-Ag toime bakteritele (*E. coli*) suureneb 30 minuti jooksul oluliselt 90%-ni, jõudes 100%-ni 30 ja 60 minuti vahel. Samuti paljuski on GO-põhistel komposiitmaterjalidel tugevam antibakteriaalne toime grampositiivsetele bakteritele, samas kui nende mõju gramnegatiivsetele bakteritele on nõrgem (41). Uuringud on näidanud, et GO-l võib olla toksiline toime mikroorganismidele ja rakkudele. Mikroorganismidele avaldas GO toksilist toimet annusest sõltuvalt ja mõjus kontsentratsioonidel, mis ületasid 50 mg/l. Mehhanismiuuringud on näidanud, et kokkupuude GO-ga võib häirida rakumembraanide terviklikkust ja viia mikroobse aktiivsuse kadumiseni (38).

2. Materjalid ja meetodid

2.1 Nanomaterjalide suspensioonide valmistamine

Käesolevas töös uuriti BiOI, BiOI-GO ja GO nanomaterjale, mille sünteesisid koostööpartnerid Aguascalientese Autonoomsest Ülikoolist Mehhikos (24). BiOI, BiOI-GO ja GO suspensioonid valmistamistati ülipuhtas vees (MilliQ, Direct-Q® Water Purification System, Merck Millipore) kontsentratsiooniga 2 g/l. Lisaks valmistati nanomaterjalide suspensioonid, mis sisaldasid kas 4 või 10 g/l kummiaraabikut. Kõiki suspensioone valmistati ligikaudu 10 ml polüpropüleenist 50-ml tuubides. Nanomaterjalide suspendeerimiseks vees sonikeeriti suspensioone pulksonikaatoriga 2 minutit võimsusel 4 W (Branson Digital Sonifier®, USA). Suspensioone säilitati toatemperatuuril pimedas.

2.2 Nanomaterjalide suuruse ja ζ-potentsiaali mõõtmine

MilliQ vees suspendeeritud nanomaterjalide hüdrodünaamilist diameetrit mõõdeti dünaamilise valgushajumise meetodil (ingl. k. *dynamic light scattering*, DLS). Kasutati instrumenti Zetasizer Nano (Malvern, Ühendkuningriigid). Mõõtmiseks valmistati nii kummiaraabikuga suspendeeritud kui puhtas MilliQ vees suspendeeritud nanomaterjalide alglahustest lahjendused kontsentratsiooniga 100 mg nanomaterjali/l. Lahjendatud suspensioon pipeteeriti küvetti, mis võimaldas mõõta osakeste hüdrodünaamilist diameeterit ja ζ-potentsiaali. ζ-potentsiaali mõõdeti elektroforeetilise valgushajumise meetodiga ja tulemuse põhjal hinnati osakeste pinnalaengu suurust antud lahuses ja ka suspensiooni stabiilsust. Nii osakeste suurust kui ζ-potentsiaali mõõdeti igas proovis kolm korda ning arvutati keskmised ja standradhälbe väärtused.

2.3 Antibiootikumide ja $CuSO_4$ lahuste valmistamine

Streptomütsiini, tetratsükliini ja penitsilliini alglahused valmistati kontsentratsiooniga 2500 mg/l MilliQ vees ja säilitati -20 °C juures 1,5-ml tuubides. $CuSO_4$ alglahus (2000 mg/l) valmistati samuti MilliQ vees, 50-ml polüpropüleenist tuubis ja säilitati toatemperatuuril. Vahetult enne katset tehti alglahustest lahjendused MilliQ vees.

2.4 Streptomütsiini kontsentratsiooni mõõtmine spektrofotomeetriliselt kasutades Au nanoosakesi – meetodi optimeerimine

Streptomütsiini lahuste valmistamiseks kasutati streptomütsiinsulfaadi alglahust kontsentratsiooniga 250 g/L MilliQ vees. Alglahust säilitati -20 ºC juures 1,5-ml tuubides. Katse jaoks valmistati sellest lahusest lahjendused MilliQ vees. Kokku valmistati kuus erineva kontsentratsiooniga lahust, kasutades järjestikuse lahjenduse meetodit. Erineva kontsentratsiooniga streptomütsiini lahjendused segati Au nanoosakeste suspensiooniga vahekorras 1 : 1 (42). Käesolevas töös kasutati tanniinhappega redutseeritud Au nanoosakesi, mis olid sünteesitud KBFI keskkonnatoksikoloogia laboris. Au nanoosakeste diameeter oli ligikaudu 40 nm ja pinnalaeng MilliQ vees oli negatiivne. Streptomütsiiniga segati Au nanoosakeste algsuspensiooni, mille kontsentratsioon oli 100 mg/l, kuna leiti, et madalamate kontsentratsioonide juures test ei töötanud. Spektrofotomeetriline analüüs viidi läbi Thermo Scientific Multiskan Spectrum seadme abil. Mõõtmiseks kasutati kvartsküvette. Proovide UV-Vis spektrid mõõdeti vahemikus 200–800 nm ja saadud andmete põhjal koostati Excelis graafikud.

2.5 Spot test

Kemikaalide bioloogiliste efektide testimiseks kasutati käesolevas töös mudelorganismina bakterit *Escherichia coli* (MG1655) ja nn „Spot"-testi, mis on välja töötatud KBFI keskkonnatoksikoloogia laboris (43). *E.coli* külvati kõigepealt -80°C juures säilitatud kultuurist Luria – Bertaini (LB) agarsöötmele (10 g/l trüptooni, 5 g/l pärmiekstrakti, 5 g/l NaCl ja 15 g/l agarit), inkubeeriti 30°C juures üleöö ja seejärel säilitati plaati, millel olid bakterikolooniad 4°C juures. Katse jaoks kultiveeriti bakterit LB vedelsöötmes. Selleks viidi 2-3 bakterikolooniat agarplaadilt steriilse külviaasaga 3 ml LB söötmesse steriilses polüpropüleentuubis (14-ml). Seejärel inkubeeriti polüpropüleentuubi inkubaatoris temperatuuril 30 °C, 200 pööret minutis, üleöö. Järgmisel päeval lisati steriilsesse 100-ml Erlenmeyeri kolbi 20 ml LB söödet, kuhu pipeteeriti 400 µl üleöö kasvatatud bakterikultuuri. Kultuuri inkubeeriti 30°C juures, loksutades (200 pööret minutis). Perioodiliselt mõõdeti optilist tihedust (ingl. k. *optical density*, OD) lainepikkusel 600 nm, kuni kultuur saavutas OD väärtuse ~0,6 (eksponentsiaalne kasvufaas). Kultuur, mille OD oli saavutanud $\sim 0{,}6$, tsentrifuugiti kiirusel 7000 rpm 20°C juures 7 minutit (Sigma 3-16PK tsentrifuug). Pärast tsentrifuugimist eemaldati supernatant ning sadet pesti steriilse MilliQ veega (20 ml). Pesemis- ja tsentrifuugimisprotseduuri korrati kolm korda. Saadud bakterisade lahjendati steriilse MilliQ veega, et saada testi jaoks vajalik OD $\sim 0{,}1$. Baktereid inkubeeriti testitavate kemikaalide erineva kontsentratsiooniga lahustes 96 süvendiga mikroplaadil. Selleks valmistati kas nanomaterjalide, $CuSO_4$ või antibiootikumide alglahustest lahjenduste seeria MilliQ vees ja pipeteeriti 100 µl iga lahust vähemalt kahes korduses mikroplaadile. Selleks, et testida nähtava valguse mõju nanomaterjalide bioloogilisele aktiivsusele inkubeeriti nanomaterjalide ja kemikaalide lahjendusi mikroplaadil ilma bakteriteta nähtava valguse käes (Philips TL-D 38 W luminofoortorud, mis imiteerivad looduslikku valgust) ja teist identset plaati pimedas, toatemperatuuril, 24 tundi. Seejärel, kas vahetult pärast proovide pipeteerimist mikroplaadile või pärast 24-tunnist inkubeerimist valges või pimedas, pipeteeriti igasse süvendisse, mis sisaldas proovi või MilliQ vett (negatiivsed kontrollid), 100 µl bakterikultuuri. Mikroplaadi äärmiseid süvendeid, millest vedeliku aurustumine on intensiivsem, ei kasutatud proovide jaoks, vaid täideti 200 µl steriilse MilliQ veega. Plaati inkubeeriti 30 °C juures staatiliselt (ilma loksutamata) 1 - 24 tundi. Pärast 1 või 24 tundi pipeteeriti igast proovi sisaldavast või kontrollkultuuriga süvendist 3 µl LB agarplaadile, mida inkubeeriti 30 °C juures üleöö. Inkubeerimise lõpus hinnati bakterite kasvu agarsöötmel visuaalselt ja määrati testitava kemikaali minimaalne baktertsiidne kontsentratsioon (ingl. k. *minimum bactericidal concentration*, MBC). MBC on madalaim kemikaali kontsentratsioon, mille juures bakterite kasvu ei täheldatud.

2.6 Nanomaterjalide suspensioonid $CuSO_4$ lahustes

Selleks, et testida nanomaterjalide mõju $CuSO_4$ toksilisusele, valmistati BiOI ja BiOI-GO suspensioonid erinevate kontsentratsioonidega $CuSO_4$ lahustes. Lähtelahusena kasutati $CuSO_4$ lahust kontsentratsiooniga 2000 mg/l ja nanomaterjalide suspensioone (BiOl ja BiOl-GO) kontsentratsiooniga 2000 mg/l, mis olid valmistatud nii, nagu kirjeldatud alapeatükis 2.1. Alglahuseid lahjendati steriilse MilliQ veega 2 ml ja 1,5 ml tuubides. $CuSO_4$ lahjendused ja nanomaterjali suspensioon segati kokku nii, et nanomaterjali kontsentratsioon kõigis $CuSO_4$ lahjendustes oli 200 mg/l. Igast proovist pipeteeriti 100 µl kahes korduses 96 süvendiga polüpropüleenist mikroplaadile. Tuubidesse jäänud nanomaterjali suspensioonid $CuSO_4$ lahjendustes (300 µl) tsentrifuugiti 10 minutit 13000 g juures, et sadestada

nanomaterjalid. Seejärel pipeteeriti 250 µl supernatanti eraldi puhastesse 1,5 ml tuubidesse ja kanti sealt 100 µl kahes korduses 96 süvendiga mikroplaadile. Tuubidesse jäänud nanomaterjali sade suspendeeriti 250 µl MilliQ vees ja pipeteeriti 100 µl kahes korduses 96 süvendiga mikroplaadile. Kõikidele proovidele lisati 100 µl *E.coli* kultuuri MilliQ vees ja teostati „spot-test“, nii nagu kirjeldatud alapeatükis 2.5.

2.7 Biosaadava vase kvantifitseerimine rekombinantsete bakteritega

Biosaadava vase kontsentratsioon kvantifitseeriti $CuSO_4$ lahustes, millele oli lisatud nanomaterjalide suspensiooni, et kindlaks määrata, kui efektiivselt nanomaterjalid Cu-ioone adsorbeerisid. Selles katses kasutati kahte rekombinantset bakerit: *E.coli* MC1061 pDNlux (konstitutiivselt luminestseeruv bakter) ja *E.coli* MC1061 pSLcueR/pDNPcopAlux (luminestseerub proportsionaalselt keskkonnas oleva biosaadava vase hulgaga) (44). Bakterite kultiveerimiseks kasutati LB agarsöödet, millele lisati kas 10 µg/ml tetratsükliini (*E. coli* MC1061 pDNlux kasvatamiseks) või 10 µg/ml tetratsükliini ja 100 µg/ml ampitsilliini (*E. coli* MC1061 pSLcueR/pDNPcopAlux kasvatamiseks), selleks, et tagada rekombinantsete bakterite selektiivne kasv. Plaate inkubeeriti 30 °C juures üleöö. Kui plaadil olid moodustunud kolooniad, hoiti plaate külmkapis (4°C) kuni üks kuu. Päev enne testi valmistati inokulaat. Kasutades steriilset külviaasa viidi 2-3 bakterikolooniat agarplaatidelt 3 ml LB söötmesse, mis pDNlux bakteri puhul sisaldas 10 µg/ml tetratsükliini ja pSLcueR/pDNPcopAlux bakteri puhul 10 µg/ml tetratsükliini ja 100 µg/ml ampitsilliini. Kultuure inkubeeriti loksutil 30 °C juures kiirusel 200 pööret minutis üleöö (ligikaudu 15 tundi). Järgmisel päeval bakterikultuure lahjendati 100 ml koonilises kolvis vahekorras 1:50. 20 ml LB söötmesse, mis sisaldas pDNlux bakteri puhul 10 µg/ml tetratsükliini ja pSLcueR/pDNPcopAlux bakteri puhul 10 µg/ml tetratsükliini ja 100 µg/ml ampitsilliini, pipeteeriti 400 µl üleöö kultiveeritud kultuuri. Kolbe inkubeeriti 2,5–3 tundi temperatuuril 30 °C loksutis (200 pööret minutis), kuni OD jõudis väärtuseni 0,6–0,8, mis näitas eksponentsiaalset kasvufaasi. OD mõõtmiseks lahjendati baktereid 5 korda. Selleks segati 1600 µl LB söödet 400 µl bakterikultuuriga. Kui OD oli jõudnud väärtuseni 0,6-0,8, pipeteeriti bakterikultuurid 50-ml tsentrifuugituubidesse ja tsentrifuugiti kiirusel 7000 pööret minutis 10 minutit temperatuuril 20 °C. Pärast tsentrifuugimist supernatant eemaldati. Bakterisadet pesti kolm korda, lisades steriilset MilliQ vett ja tsentrifuugiti uuesti. Pärast pesemist suspendeeriti bakterid 20 ml 0,9% NaCl-s, millele oli lisatud 0,1% Cas aminohappeid (CasAA) ja 0,1% glükoosi. Bakterikultuuri lahjendati samas lahuses OD väärtuseni 0,1 ja pipeteeriti igasse valge mikroplaadi süvendisse 100 µl. Mikroplaadile oli eelnevalt pipeteeritud kemikaali- ja kontroll-lahused (igas süvendis 100 µl). Plaadid kaeti fooliumiga, inkubeeriti 30 °C juures 1 – 2 tundi ja mõõdeti bakterite luminestsents luminomeetriga Orion II (Berthold).

2.8 Reaktiivsete hapnikuühendite kvantifitseerimine nanomaterjalide suspensioonides

Reaktiivsete hapnikuühendite (inglise k. *reactive oxygen species*, ROS) suhtelise hulga määramiseks BiOI ja BiOI-GO suspensioonides kasutati 2',7'-diklorodihüdrofluorestseiindiatsetaati (H_2DCFDA, Life Technologies). Selleks kõigepealt H_2DCFDA deatsetüleeriti, lisades etanoolis lahustatud värvile (1,3 mM) 0,01 M NaOH lahust. Pärast 30-minutilist inkubeerimist pimedas toatemperatuuril reaktsioon peatati 25 mM naatrium-fosfaatpuhvri (pH 7,4) lisamisega. Deatsetüleerimise tulemusena saadud

H_2DCF oksüdeerub ROS-i toimel fluorestseeruvaks ühendiks 2',7'-diklorofluorestseiin (DCF). DCF-i fluorestsents proovis on proportsionaalne ROS-i hulgaga. ROS-i mõõtmiseks pipeteeriti 100 µl BiOI, BiOI-GO, ja mõlema nanomaterjali suspensiooni koos $CuSO_4$-ga mustale 96 süvendiga polüpropüleenist mikroplaadile (Greiner Bio-one) ning lisati igale proovile 100 µl H_2DCF lahust. Positiivse kontrollina kasutati Mn_3O_4 nanoosakeste suspensiooni (45). Taustfluorestsentsi mõõtmiseks lisati 100 µl H_2DCF lahust 100 µl MilliQ veele. Mikroplaati inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril (21 kuni 25 °C) pimedas ja fluorestsentsi mõõdeti Fluoroskan Ascent FL (Labsystems) mikroplaadilugeja abil, kusjuures ergastamiseks kasutati 485 nm kiirgust ning mõõdeti emiteeritud kiirgust 527 nm juures.

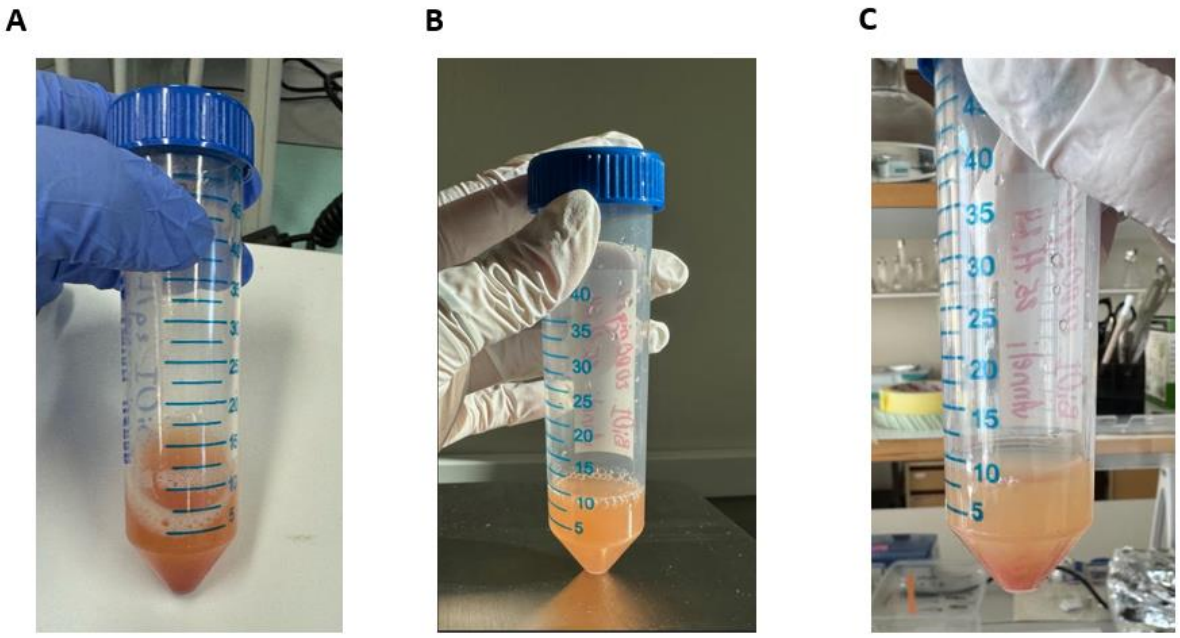
2.9 Statistiline analüüs

Statistiliselt olulised erinevused tehti kindlaks Student'i t-testi abil. Statistilise olulisuse väärtuseks oli $p \leq 0,05$. Graafikutel on esitatud vähemalt kolme paralleelproovi mõõtmise keskmised väärtused ± standardhälve.

3. Tulemused ja arutelu

3.1 BiOI omadused vesisuspensioonis

Käesolevas töös suspendeeriti BiOI nanomaterjalid MilliQ vees. Nanomaterjali suspensioon MilliQ vees oli oranži värvusega ja suuremad osakesed sadenesid kiiresti tuubi põhja (joonis 4). Kummiaraabikuga (1%) ja ilma kummiaraabikuta valmistatud suspensioonid nägid visuaalselt sarnased välja; ainus erinevus seisnes selles, et kummiaraabikuga proov oli intensiivsema oranži värvusega (joonis 4 A ja B). Mõne aja möödudes pärast sonikeerimist sadenes enamus materjali tuubi põhja, viidates sellele, et suspension oli ebastabiilne. Ilma kummiaraabikuta BiOI proovis on sadet näha juba pärast 20-minutilist seismist (joonis 4 C).



Joonis 4. BiOI suspensioonid MilliQ vees. Suspensioon 1% kummiaraabikuga vahetult peale sonikeerimist (A). BiOI suspensioon MilliQ vees ilma kummiaraabikuta vahetult peale sonikeerimist (B). BiOI suspensioon MilliQ vees ilma kummiaraabikuta pärast 20-minutilist seismist (C).

BiOI osakeste suuruse ja suspensiooni stabiilsuse kvantifitseerimiseks mõõdeti osakeste hüdrodünaamilist diameetrit, mis iseloomustab nanoosakeste läbimõõtu lahuses. Hüdrodünaamilise läbimõõdu mõõtmiseks kasutati DLS-meetodit. DLS ehk dünaamiline valgushajumine ehk footonite korrelatsioonispektroskoopia on üks meetoditest nanoosakeste hüdrodünaamilise suuruse analüüsimiseks. Selle meetodi üks olulisemaid aspekte on see, et see põhineb osakeste Browni liikumisel lahuses. Osakeste juhuslik liikumine põhjustab laserkiirguse hajumise intensiivsuse kõikumisi, mida saab analüüsida, et määrata osakeste suurusjaotust reaalajas (46). Mõõtmistulemused näitasid, et osakeste keskmine suurus MilliQ vees oli 934 ± 158 nm. Kirjanduse põhjal on teada, et orgaaniliste ühendite lisamine aitab nanomaterjale vesisuspensioonides efektiivsemalt suspendeerida ja paranadab suspensiooni stabiilsust ajas (43). Seepärast testiti, kas kummiaraabiku lisamine parandab BiOI suspendeeritavust. Selleks valmistati BiOI vesisuspensioonile kas 0,4 või 1% kummiaraabikut. BiOI

osakeste keskmine suurus nendes suspensioonides oli vastavalt 713 ± 57 (kummiaraabik 0,4%) ja 755 ± 18 (kummiaraabik 1%) (tabel 1). Statistiline analüüs näitas, et kummiaraabiku lisamine ei muutnud BiOI hüdrodünaamilist diameetrit statistiliselt oluliselt väiksemaks (tabel 2).

Tabel 1. BiOI, BiOI (1% kummiaraabikuga) ja BiOI (0,4% kummiaraabikuga) suspensioonide hüdrodünaamilised diameetrid (Z-keskmised väärtused), polüdisperssuse indeksid (PdI) ja ζ-potentsiaalid. Väärtused on aritmeetilised keskmised ± standardhälve.

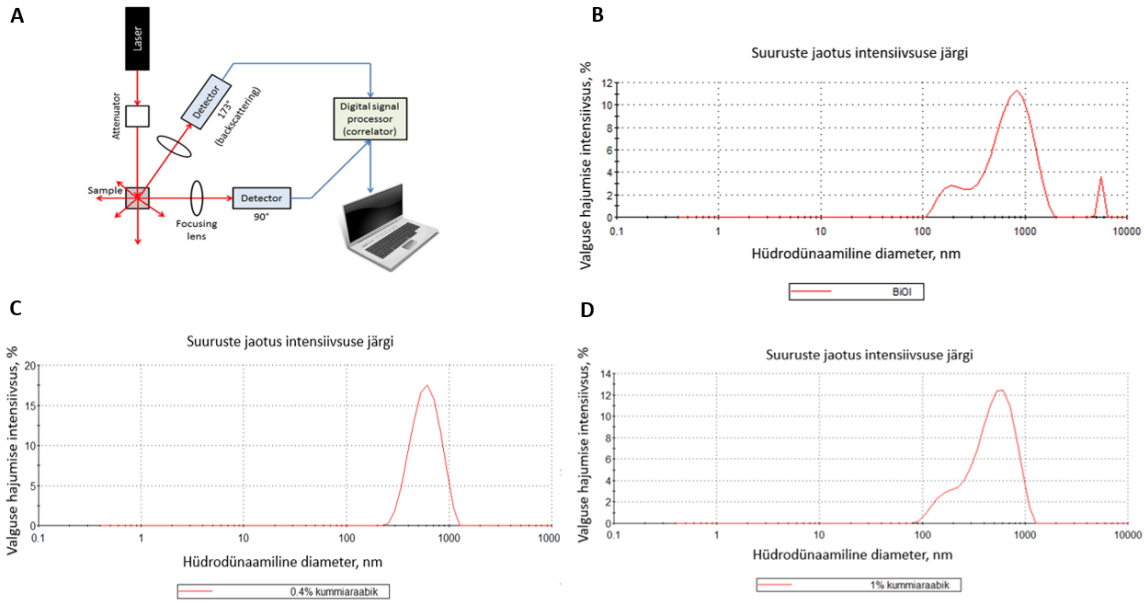
	Hüdrodünaamiline dameeter (Z-keskmised väärtused, nm)	**PdI**	**ζ-potensiaal (mV)**
BiOI	934 ± 158	0,70 ± 0,04	-12 ± 1,1
BiOI (1% kummiaraabik)	755 ± 18	0,61 ± 0,04	-38 ± 2,3
BiOI (0.4% kummiaraabik)	713 ± 57	0,50 ± 0,01	-38 ± 0,2

Tabel 2. Student'i t-testi abil leitud p-väärtused. Tulemusi loeti statistiliselt oluliselt erinevaks, kui p ≤ 0,05 (väärtused paksus kirjas). Võrreldi ilma kummiaraabikuta ja koos 0.4% või 1% kummiaraabikuga valmistatud BiOI suspensioonides mõõdetud hüdrodünaamilise diameetri, PdI ja ζ-potentsiaalide väärtusi.

T-test (p ≤ 0,05)	**Hüdrodünaamiline dameeter (Z-keskmised väärtused, nm)**	**PdI**	**ζ-potensiaal (mV)**
BiOI *versus* BiOI (1% kummiaraabik)	0,09	**0,001**	**0,000002**
BiOI *versus* BiOI (0,4% kummiaraabik)	0,123	**0,047**	**0,0001**
BiOI (0,4% kummiaraabik) *versus* BiOI (1% kummiaraabik)	0,299	**0,01**	0,963

Samas, BiOI osakeste suurusjaotused valguse hajumise intensiivsuse alusel näitasid, et kummiaraabikut sisaldavates suspensioonides oli BiOI suurusjaotus kitsam (joonis 5 B,C ja D). See viitas sellele, et BiOI osakesed olid ühtlasema suurusega võrreldes ilma kummiaraabikuta suspendeeritud BiOI osakestega.

Ka statistiliselt oluliselt madalamad polüdisperssusindeksid (PdI) viitasid kummiaraabiku soodsale mõjule osakeste ühtlasemat suuruse osas (tabelid 1 Ja 2). PdI on väärtus, mille suurus on 0 – 1 ja iseloomustab osakeste suuruse ühtlus proovis. Mida väiksem on PdI, seda ühtlasema suurusega on osakesed suspensioonis.

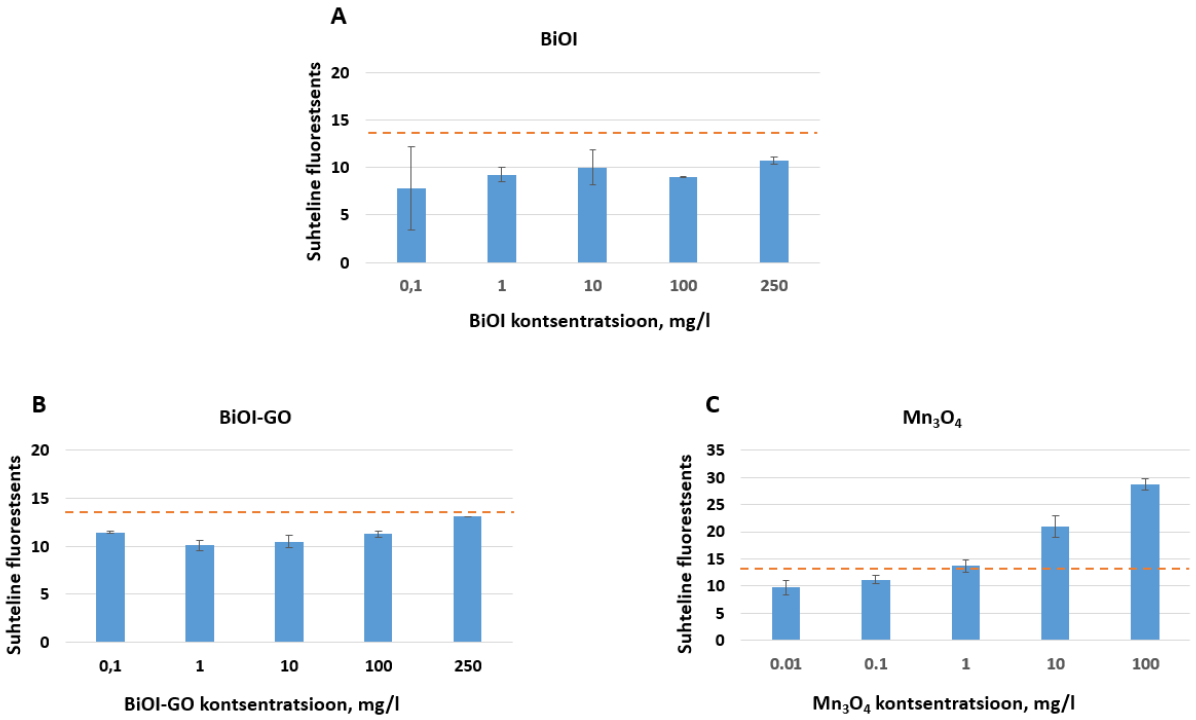


Joonis 5. Nanomaterjalide suurusjaotuse mõõtmine vesisuspensioonides. DLS-seadme skeem (A) ja DLS graafikud mis näitavad BiOI (B), 0,4% kummiaraabikus suspendeeritud BiOI (C) ja 1% kummiaraabikus suspendeeritud BiOI (D) suurusjaotuseid.

Lisaks osakeste suurusele, mõõdeti ka osakeste ζ-potentsiaali, mis annab infot osakeste pinnalaengu ja suspensiooni stabiilsuse kohta. ζ-potentsiaali mõõtmine põhineb elektrivälja rakendamisel uuritavale proovile, mille tulemusena hakkavad liikuma selles asuvad laetud osakesed. ζ-potentsiaali arvutamiseks kasutatakse nende liikumise kiirust. Mõõtmised näitasid, et BiOI osakesed olid negatiivse pinnalaenguga (tabel 1). ζ-potentsiaali absoluutväärtuste põhjal saab järeldada, et kummiaraabiku lisamine suurendas suspensiooni stabiilsust, kuna absoluutväärtused olid >30 mV. Kirjanduse põhjal on üle 30 mV ja alla -30 mV ζ-potentsiaali väärtused iseloomulikud suhteliselt stabiilsematele suspensioonidele (47). Katse tulemuste põhjal võib järeldada, et kummiaraabik muudab BiOI osakesed stabiilsemaks ning nanoosakesed jaotuvad suspensioonis ühtlasemalt. Kui võrrelda 1% kummiaraabikuga ja 0,4% kummiaraabikuga proove, siis täheldati olulist erinevust PdI väärtustes, kuid BiOI osakeste keskmised läbimõõdud ja ζ-potentsiaali väärtused ei olnud statistiliselt oluliselt erinevad (tabel 2). Edasisteks katseteks valiti 1% kummiaraabikuga lahus.

Kuna nanomaterjalid tekitavad oma reaktiivsuse tõttu sageli ROS-e, mis mõjutavad nanomaterjalide bioloogilist aktiivsust, siis mõõdeti käesolevas töös ROS tekkimist nii BiOI ja kui ka selle komposiidi, BiOI-GO vesisuspensioonides. Tulemused näitasid, et ei BiOI ega BiOI-GO vesisuspensioonides abiootilistes tingimustes märkimisväärset ROS-i ei tekkinud (joonis 6 A, B). Samas positiivse kontrollina kasutatud

Mn_3O_4 nanoosakeste vesisuspensioonis oli abiootilise ROS-i tase proportsionaalne nanoosakeste kontsentratsiooniga (joonis 6 C). ROS-i määramise katses imiteeriti sarnaseid tingimusi, nagu hiljem kasutati *E.coli* ja nanomaterjalide inkubeerimisel (pimedas ja mikroplaadil ilma loksutamata 1 h). Kuna sellistes tingimustes nanomaterjalid ROS-i ei tekitanud, siis võis järeldada, et BiOI ja BiOI-GO materjalid ei olnud potentsiaalsed oksüdatiivse stressi põhjustajad ja eeldatavalt ei avaldanud toksilisust ROS-i tekitamise teel.



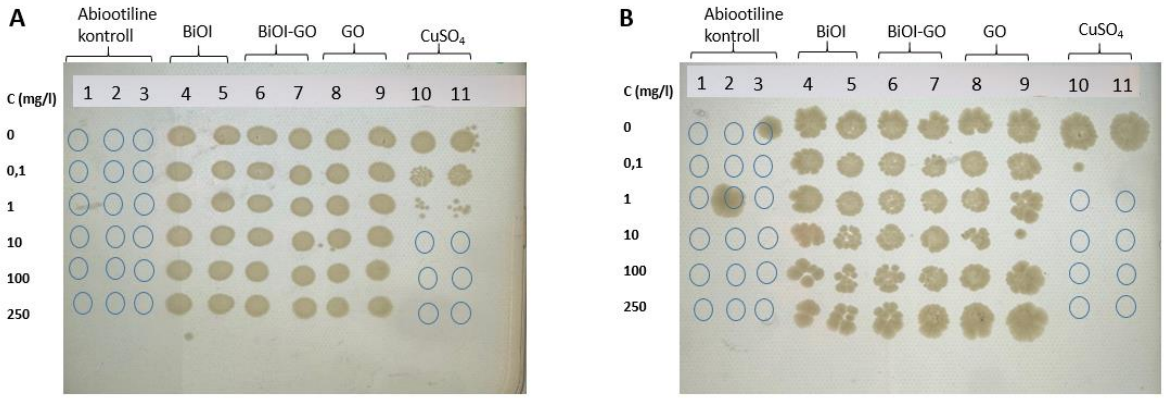
Joonis 6. Reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) suhteline tase nanomaterjalide vesisuspensioonides (abiootilistes tingimustes). Suhteline ROS BiOI (A), BiOI-GO (B) ja Mn_3O_4 nanoosakeste (C) vesisuspensioonides (positiivne kontroll. ROS kvantifitseeriti 2',7'-diklorofluorestseiini (DCF) fluorestsentsi mõõtmise teel. Oranžid punktiirjooned graafikutel tähistavad DCF fluorestsentsi MilliQ vees (taustluminestsents)).

3.2 BiOI, BiOI-GO ja GO bioloogilised efektid

BiOI omdusi saab parandada kombineerides seda teiste nanomaterjalidega (35). Käesolevas töös uuriti BiOI-GO nanokomposiiti ja võrdlevalt puhast GO. Et neid materjale kasutada saasteainete adsorbentidena keskkonnas, peab kindlaks tegema, et materjalid ei kujuta keskkonnaohtu. Seepärast testiti kõigepealt materjalide potensiaali tekitada bioloogilisi efekte ja kasutati mudelorganismina bakterit *E.coli*. Nanomaterjalide mõjude testimiseks kasutati nn spot-testi, mis on välja töötatud just nanomaterjalide suspensioonide testimiseks (43). Kuna nanomaterjalide suspensioonid on hägused, siis bakteri kasvu hindamiseks ei sobi tavapäraselt kasutatav optilisel tihedusel põhinev meetod. Samuti mõjutavad nanomaterjalide füüsikalisi ja keemilisi omadusi erinevad söötmekomponendid (nt põhjustavad nanomaterjalide aglomeratsiooni või mõjutavad materjalide lahustumist). Seetõttu oli

käesolevas töös testikeskkonnaks MilliQ vesi ja bakterite elulemust pärast inkubatsiooni testitavate kemikaalidega hinnati bakterite kasvu põhjal agarplaadil.

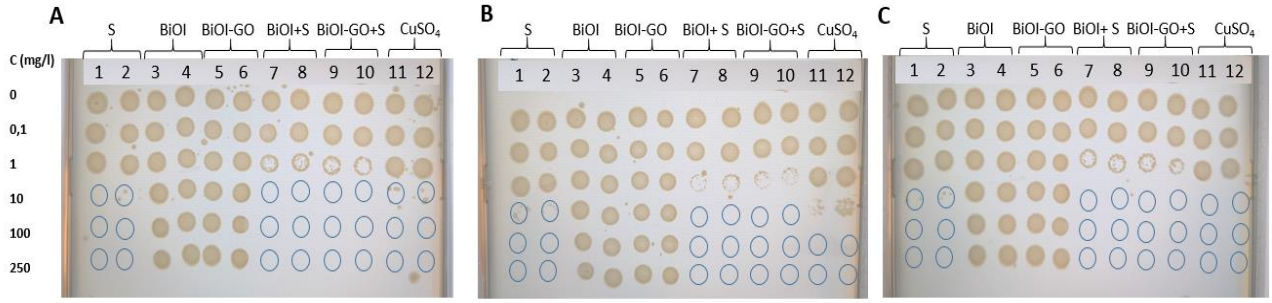
Katsed 1% kummiaraabikuga suspendeeritud nanomaterjalidega näitasid, et BiOI, BiOI-GO ega GO ei avaldanud toksilist toimet mikroorganismedele ka maksimaalse testitud kontsentratsiooni juures, 250 mg/l, kusjuures tulemus oli sama pärast 1,5 ja 24-tunnist inkubatsiooni (joonis 7). Samas positiivse kontrollina kasutatud $CuSO_4$ oli pärast 1,5-tunnist inkubeerimist bakteritsiidne 10 mg/l juures (joonis 7, A) ja pärast 24-tunnist inkubeerimist 1 mg/l juures (joonis 7, B), mis oli kooskõlas varasemate laboris saadud tulemustega (48). Kuna kummiaraabiku sisaldus võis mõjutada nanomaterjalide bioloogilist aktiivsust, testiti ka nanomaterjalide suspensioone, mis olid valmistatud ilma kummiaraabikuta. Tulemused näitasid, et ka ilma kummiaraabikuta suspendeeritud nanomaterjalid ei avaldanud bakterile *E.coli* toksilist toimet ühegi testitud kontsentratsiooni juures (0,1 - 250 mg/l) (joonis 8, A). Sellest võis järeldada, et BiOI ega BiOI-GO ei olnud vesisuspensioonides nii bioaktiivsed, et mõjutada bakteri elulemust.



Joonis 7. Nanomaterjalide bioloogilise aktiivsuse testimine bakteriga *E.coli*. Bakterikultuuri inkubeeriti nanomaterjalide erineva kontsentratsiooniga suspensioonides kas 1,5 tundi (A) või 24 tundi (B) ja hinnati seejärel bakteri kasvu agarsöötmel (iga nanomaterjali ja $CuSO_4$ lahjendust testiti kahes korduses). Numbrid vasakus veerus tähistavad nanomaterjalide ja $CuSO_4$ lahjenduste kontsentratsioone vastavates ridades, vastavalt mg nanomaterjali/l ja mg Cu/l. Siniste ringidega on tähistatud proovide kohad, kus bakteri kasvu ei täheldatud. Abiootilised kontrollid (veerud 1: BiOI, 2: BiOI-GO ja 3: GO) on nanomaterjalide suspensioonid, mida inkubeeriti mikroplaadil ilma bakterit lisamata ja seejärel pipeteeriti agarplaadile, et veenduda suspensioonide steriilsuses (st bakteri kasvu ei täheldatud). B paneelil on abiootiliste kontrollide juures näha bakteri kasvu, mis oli eeldatavalt tingitud bakterit sisaldavate proovide kogemata tilkumisest agarplaadile. Numbritega (1-11) on tähistatud milline veerg vastab igale proovile. Veergudes 1,2,3 on abiootiline kontroll, 4 ja 5 on BiOI, 6 ja 7 BiOI-GO, 8 ja 9 GO suspensioonid ja veergudes 10 ja 11 $CuSO_4$ lahused, milles inkubeeriti bakterit *E.coli*.

Kirjeldatud testide puhul lisati bakterisuspensioon vahetult enne testi valmistatud nanomaterjalide lahjendusele. Kuna tegemist on nähtavas valguses aktiveeritavate materjalidega, siis uuriti täiendavalt, kuidas mõjutab eelnev nähtava valguse käes inkubeerimine BiOI ja BiOI-GO bioloogilist aktiivsust.

Selleks pipeteeriti nanomaterjalide suspensioonide lahjendused (ilma kummiaraabikuta valmistatud suspensioonid) mikroplaatidele ja inkubeeriti ühte plaati valgustatud tingimustes ja teist pimedas 24 tundi. Seejärel lisati suspensioonidele *E.coli* kultuur ja pärast 1,5-tunnist inkubatsiooni pipeteeriti proovid agarplaadile, et hinnata bakteri kasvu. Leiti, et ei valges aga pimedas üleöö inkubeerimine (enne bakteriga kokku segamist) ei muutnud materjale toksilisemaks (Joonis 8 B ja C).

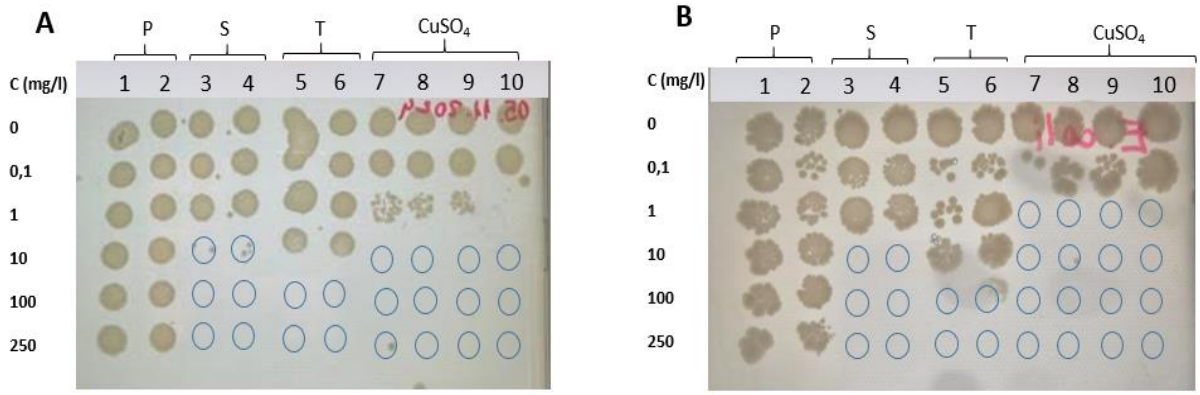


Joonis 8. Nanomaterjalide bioloogilise aktiivsuse testimine bakteriga *E.coli*. Bakterikultuuri inkubeeriti nanomaterjalide erineva kontsentratsiooniga ilma kummiaraabikuta valmistatud suspensioonides 1,5 tundi (A) ja inkubeeriti ühte plaati valgustatud tingimustes (B) ja teist pimedas (C) 24 tundi. Mikroplaadid inkubeeriti 24 tundi ilma bakteriteta – ainult nanomaterjalide lahjendustega. Pärast 24-tunnist inkubeerimist lisati süvenditesse bakterikultuur ja inkubeeriti 1,5 tundi 30°C juures ja hinnati seejärel bakteri kasvu agarsöötmel. Numbrid vasakus veerus tähistavad nanomaterjalide, streptomütsiini, nanomaterjalid kombineerituna streptomütsiiniga ja $CuSO_4$ lahjenduste kontsentratsioone vastavates ridades, vastavalt mg nanomaterjali/l, mg streptomütsiini/l ja mg Cu/l. Siniste ringidega on tähistatud proovide kohad, kus bakteri kasvu ei täheldatud. Selles katses kasutati positiivse kontrollina (veerud 11 ja 12) $CuSO_4$ lahuseid. Numbritega (1-12) on tähistatud milline veerg vastab igale proovile. Veergudes 1 ja 2 on streptomütsiini lahused, 3 ja 4 on BiOI, 5 ja 6 BiOI-GO, 7 ja 8 nanomaterjal (BiOI) + streptomütsiin, 9 ja 10 nanomaterjal (BiOI-GO) + streptomütsiin suspensioonid ja veergudes 11 ja 12 $CuSO_4$ lahused, milles inkubeeriti bakterit *E.coli*.

3.3 Antibiootikumide ja $CuSO_4$ antibakteriaalsete kontsentratsioonide määramine

Et uurida, kas nanomaterjalid adsorbeerivad saasteaineid (antibiootikume ja $CuSO_4$), kasutati biotesti (spot-test bakteriga *E.coli*), mis näitas, kas nanomaterjalide lisamine vähendas saasteainete antibakteriaalset (mürgist) toimet. Selleks määrati kõigepealt uuritavate saasteainete MBC väärtused (joonis 9). Selle katse tulemuste põhjal võib järeldada, et *E.coli* ei olnud penitsilliini suhtes tundlik testitud kontsentratsioonide juures, sest kõrgeim testitud kontsentratsioon 250 mg/l ei inhibeerinud bakteri elulemust ei 1,5- ega 24-tunnise inkubeerimise järel. Erinevalt penitsilliinist, oli võimalik kindlaks määrata streptomütsiini ja tetratsükliini MBC. Streptomütsiin pärssis bakteri kasvu täielikult (st oli bakteritsiidne) kontsentratsioonil 10 mg/l ja MBC ei sõltunud inkubatsiooniajast. Tetratsükliini MBC oli suurusjärgu võrra kõrgem kui streptomütsiinil, nimelt 100 mg/l ja oli sama 1,5- ja 24-tunnise inkubeerimise korral. Nii nagu eelmistes katsetes, kasutati $CuSO_4$ positiivse kontrollina, mille MBC oli 1,5 tunni inkubeerimise korral 10 mg/l ja 24-tunnise inkubeerimise järel 1 mg/l, mis näitas, et vase

bakteritsiidsus sõltus ajast. Katse näitas, et antud tingimustes oli *E.coli* kõige tundlikum streptomütsiini suhtes, mistõttu valiti järgnevateks katseteks antibiootikumidest streptomütsiin.

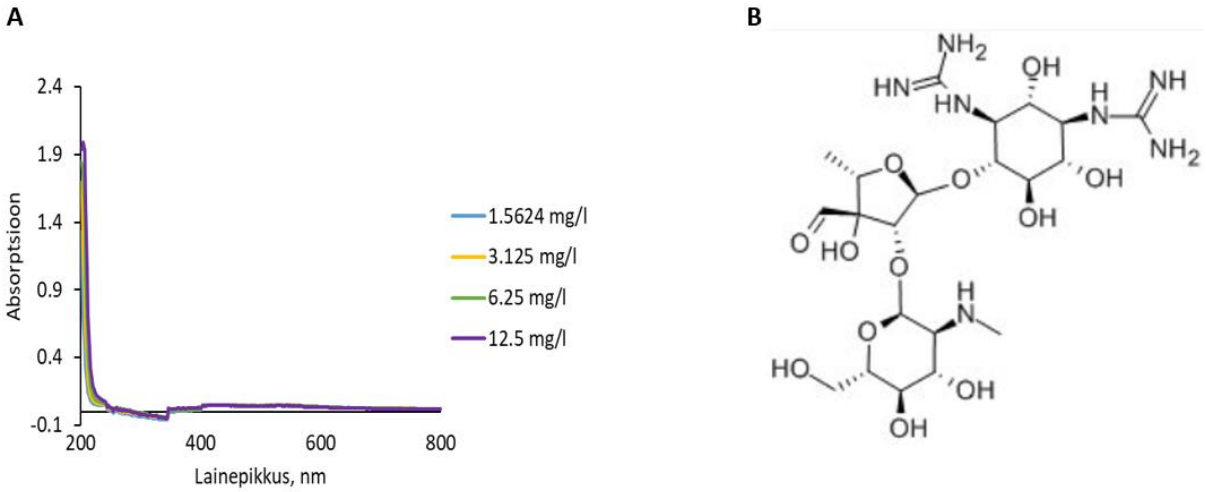


Joonis 9. Antibiootikumide ja $CuSO_4$ bioloogilise aktiivsuse testimine bakteriga *E.coli*. Bakterikultuuri inkubeeriti antibiootikumida ja $CuSO_4$ erineva kontsentratsiooniga lahuses kas 1,5 tundi (A) või 24 tundi (B) ja hinnati seejärel bakteri kasvu agarsöötmel (iga antibiootikumi ja CuSO4 lahjendust testiti kahes korduses). Numbrid vasakus veerus tähistavad antibiootikmide ja $CuSO_4$ lahjenduste kontsentratsioone vastavates ridades, vastavalt mg antibiootikumi/l ja mg Cu/l. Siniste ringidega on tähistatud proovide kohad, kus bakteri kasvu ei täheldatud. Paneeli A veerus 5 liideti tetratsükliini kontsentratsioonid 0 mg/l ja 0,1 mg/l, kuna agarile tilkade pealekandmisel oli ebatäpsus. Samuti paneelil A on streptomütsiini, tetratsükliini ja $CuSO_4$ lahuse juures näha bakteri kasvu, mis oli eeldatavalt tingitud bakterit sisaldavate proovide kogemata tilkumisest agarplaadile. Numbritega (1-10) on tähistatud milline veerg vastab igale proovile. Veergudes 1 ja 2 on penitsiliini lahused, 3 ja 4 on streptomütsiini lahused, 5 ja 6 tetratsükliini lahused, 7,8,9,10 $CuSO_4$ lahused, milles inkubeeriti bakterit *E.coli.*

3.4 Streptomütsiini kvantifitseerimine UV-Vis spektrofotomeetria abil

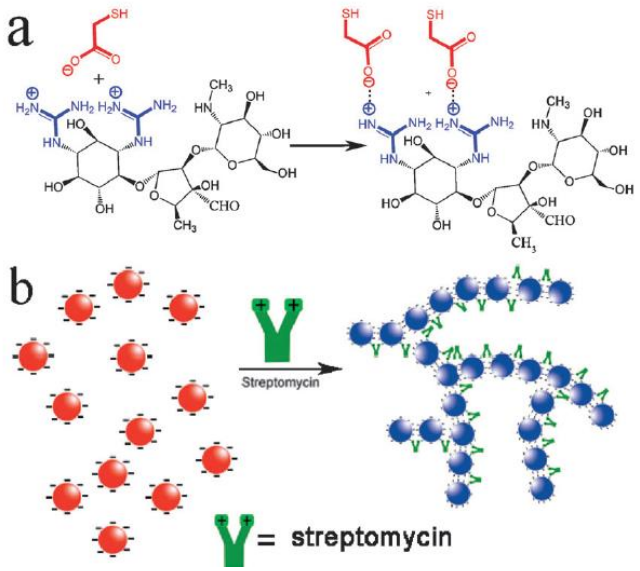
Selleks, et kindlaks teha, kas uuritavad nanomaterjalid adsorbeerivad antibiootikume, tuleb valida sobiv meetod antibiootikumi kvantifitseerimiseks lahuses. Käesolevas töös kasutati streptomütsiini, et uurida orgaaniliste saasteainete adsorptsiooni BiOI-põhiste nanomaterjalidega. Kuna UV-Vis spektrofotomeetria on lihtne ja kiire meetod, mida ainete kontsentratsiooni määramiseks, siis uuriti võimalusi kasutada seda meetodit streptomütsiini kontsentratsiooni kvantifitseerimiseks. Sel eesmärgil viidi läbi spektrofotomeetriline analüüs. Valmistati streptomütsiinsulfaadi lahused erinevatel kontsentratsioonidel 12,5 mg/L; 6,25 mg/L; 3,125 mg/L ja 1,5625 mg/L. Kõigi lahuste puhul viidi spektrofotomeetriline analüüs läbi lainepikkuste vahemikus 200–800 nm ning saadud andmete põhjal koostati graafik (joonis 10A). Analüüsitud spektrofotomeetriliste graafikute põhjal saab koheselt tõdeda, et spektrites puuduvad iseloomulikud neeldumispiigid. Selline tulemus on ootuspärane streptomütsiini puhul ning viitab selle aine keemilisele olemusele. Streptomütsiini molekul ei sisalda ulatuslikke konjugeeritud π-elektronsüsteeme, nagu näiteks konjugeeritud kaksiksidemed, mis tavaliselt toimivad tugeva UV-valguse neelajatena ehk kromofooridena (joonis 10B). Just sellised struktuurid põhjustavad spektrofotomeetrias selgelt eristatavaid pike. Lisaks on oluline arvestada, et streptomütsiin kuulub aminoglükosiidide rühma, mille koostisse kuuluvad peamiselt suhkrujäägid,

aminorühmad ning teised funktsionaalsed rühmad, mille neeldumisvõime UV-kiirguse vahemikus on väga madal.

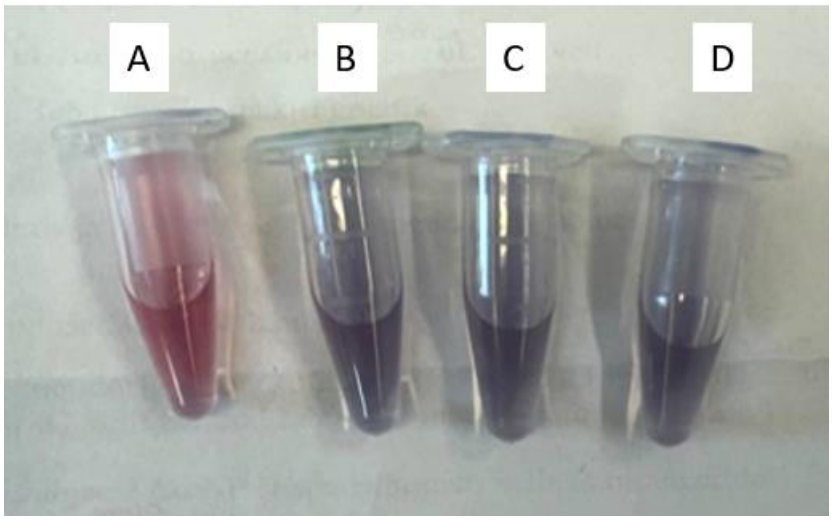


Joonis 10. Streptomütsiini lahjenduste UV-Vis spektrid lainepikkustel 200 – 800 nm (A). Legend näitab mõõtmisel kasutatud streptomütsiini lahuse kontsentratsioone. Streptomütsiini struktuuri põhjal on näha, et puuduvad konjugeeritud π-sidemed, mistõttu puudub ka iseloomulik UV neeldumissepekter (B).

Et oleks võimalik streptomütsiini kontsentratsiooni UV-Vis spektrofotomeetria abil määrata, tuli seega kasutada kaudset määramismeetodit Au nanoosakestega. Selleks modifitseeriti kirjanduses avaldatud meetodit (42). See meetod põhineb streptomütsiini ja Au nanoosakeste elektrostaatilisel interaktsioonil. Streptomütsiini positiivselt laetud rühmad (guanidüülrühmad) interakteeruvad Au nanoosakesi katvate orgaanilise aine negatiivselt laetud rühmadega, agregeerides seeläbi osakesed ja muutes lahuse värvi punasest siniseks (joonis 11). Käesolevas töös kasutati tanniinhappega kaetud Au nanoosakesi, mis olid laboris eelnevalt sünteesitud. Sarnaselt avaldatud meetodiga olid tanniinhappega kaetud Au nanoosakesed MilliQ vees negatiivselt laetud, mis viitas sellele, et tanniinhappe hüdroksüülrühmad olid deprotoneeritud. Katse käigus, kui streptomütsiini lahustele lisati Au nanoosakeste suspensioon, tekkis koheselt visuaalselt jälgitav värvusmuutus: Au nanoosakeste suspensioon muutus algsest punasest siniseks (joonis 12). Sinine toon viitab sellele, et streptomütsiin interakteerub Au nanoosakestega, moodustades kompleksi, mis muudab optilisi omadusi ja põhjustab värvimuutuse. Samuti tähendab see seda, et streptomütsiin mõjutab Au nanoosakeste stabiilsust ja põhjustab nende agregatsiooni.



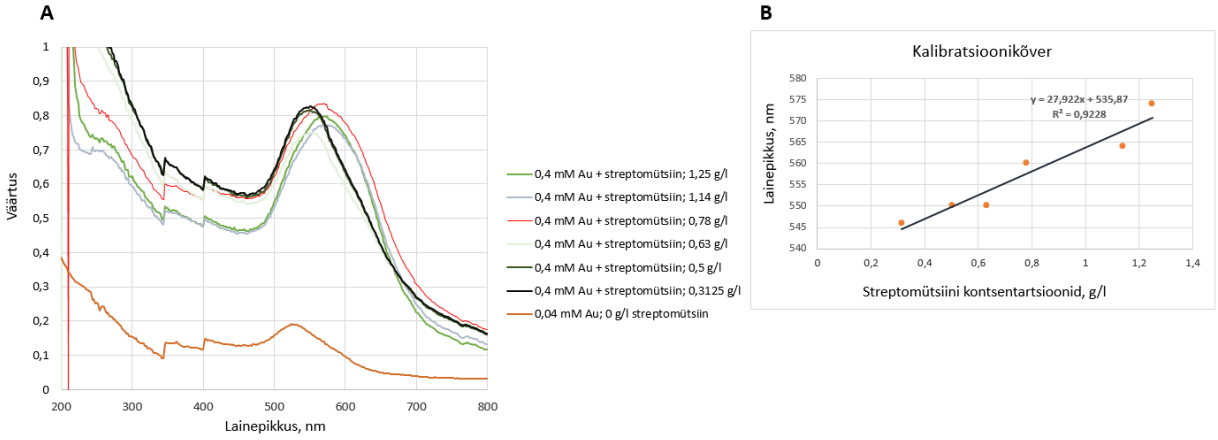
Joonis 11. Skeem, mis näitab kulla nanoosakeste ja streptomütsiini vahelisi koostoimeid. Streptomütsiini positiivselt laetud guanidüülrühmad interakteeruvad Au nanoosakeste pinnal olevate orgaanilise aine molekuli positiivselt laetud funktsionaalrühmadega (a). Merkaptoäädikhappega modifitseeritud Au nanoosakesed (punased ringid) on negatiivselt laetud ning nende interaktsioon positiivselt laetud streptomütsiiniga põhjustab nanoosakeste aglomeratsiooni ja sellest tingitud värvimuutuse (sinised ringid) (b). Reprodutseeritud artiklist (43).



Joonis 12. Au nanoosakesi sisaldavad lahused ilma streptomütsiinita ja streptomütsiiniga. Au nanoosakeste suspensioon (0,04 mM Au) ilma streptomütsiinita (A), Au nanoosakeste suspensiooniid pärast streptomütsiini lisamist, kus streptomütsiini kontsentratsioon on 2,5 g/l (B), 1,25 g/l (C) ja 0,78 g/l (D).

Kuna kirjanduse põhjal on streptomütsiini põhjustatud Au nanoosakeste aglomeratsioon proportsionaalne streptomütsiini kontsentratsiooniga, siis kvantifitseeriti muutusi Au nanoosakeste suspensioonis UV-Vis spektrofotomeetria abil. Mõõdetud spektrid näitasid (joonis 13), et 0,04 mM Au nanoosakeste suspensioon MilliQ vees l ei põhjustanud spektris detekteeritavaid muutusi, mistõttu kasutati järgmistes mõõtmistes 0,4 mM Au nanoosakeste suspensiooni. Neeldumisspektrid näitasid, et

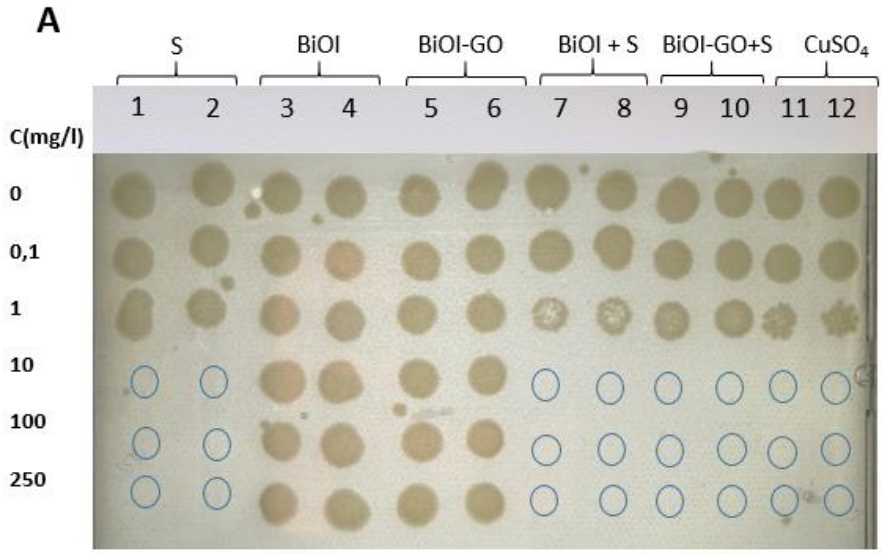
streptomütsiini lisamine põhjustas Au nanoosakestele iseloomulike piigi (maksimum 528 nm juures) nihkumise paremale, mis on seotud Au nanopartiklite aglomereerumisega ehk osakeste läbimõõdu suurenemisega (joonis 13). Nagu eelnevalt kirjeldatud, näitas streptomütsiini lahuste spektrofotomeetriline analüüs, et erinevatel kontsentratsioonidel (12,5; 6,25; 3,125 ja 1,5625 mg/l) ei ilmnenud spektrites iseloomulikke neeldumispiike lainepikkuste vahemikus 200–800 nm (joonis 10A). Kuid 0,4 mM Au lisamisel on spektrites juba märgata erinevusi. Kui streptomütsiini kontsentratsioon on 0,3125 g/l, nihkub Au nanoosakeste piik maksimumiga 528 nm juures suuremate lainepikkuste suunas, mis viitab streptomütsiini ja nanoosakeste vaheline interaktsiooni algusele. Streptomütsiini kontsentratsiooni edasine suurenemine (0,5 g/l, 0,63 g/l ja 0,78 g/l) toob kaasa piigi jätkuva nihkumise suuremate lainepikkuste suunas, ulatudes umbes 550–560 nm piirkonda, mis viitab nanoosakeste järkjärgulisele agregatsioonile. Kontsentratsioonidel 1,14 g/l ja 1,25 g/l nihkub piik veelgi kaugemale, jõudes 560–570 nm piirkonda (joonis 13A). Kalibreerimisgraafikult on näha, et Au nanoosakestele iseloomulike piigi maksimumlainepikkus oli heas korrelatsioonis streptomütsiini kontsentratsiooniga lahuses (joonis 13B). Meetodi tundlikkuse hindamiseks kasutati võrdlust streptomütsiini MBC määramise tulemustega. MBC määramisel selgus, et streptomütsiin pärssis täielikult *E.coli* kasvu kontsentratsioonil 10 mg/l (joonis 9). Võrdluseks, spektrofotomeetrilise meetodi puhul täheldati spektrimuutusi kontsentratsioonidel alates 0,3125 g/l, mis viitab sellele, et kuigi meetod on võimeline tuvastama antibiootikumi ja nanoosakeste vahelisi interaktsioone, ei ole selle tundlikkus piisav, et detekteerida keskkonnas olulisi, bakteritsiidseid kontsentratsioone. Seega vajab meetod edasist optimeerimist, et oleks võimalik määrata ka realistlikke ja bioloogiliselt asjakohaseid streptomütsiini kontsentratsioone. Selleks võib kulla nanoosakesi modifitseerida, kasutades näiteks funktsionaalseid rühmi, mis võimaldavad selektiivset interaktsiooni streptomütsiini molekulidega.



Joonis 13. Streptomütsiini kvantifitseerimine spektrofotomeetriliselt. Kulla nanoosakestele iseloomulikud neeldumisspektrid lainepikkustel 200 – 800 nm, enne ja pärast sptreptomütsiini erinevates kontsentratsioonides lahustega segamist (A). Kalibreerimiskõver, mis näitab Au nanoosakestele iseloomuliku piigi neeldumismaksimumi lainepikkuse sõltuvust streptomütsiini kontsentratsioonist (B).

3.5 BiOI ja BiOI-GO toime streptomütsiini antibakteriaalsusele

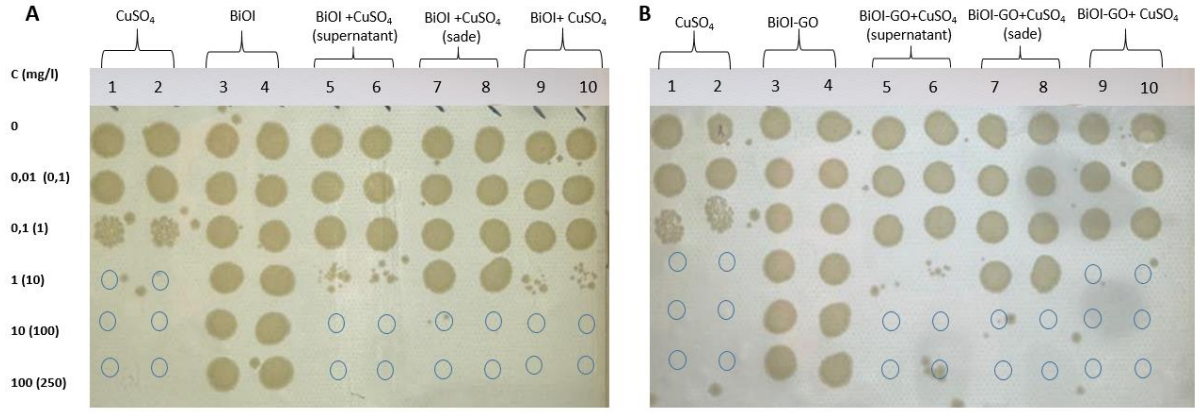
Kuna eelnevad katsed antibiootikumidega näitasid, et streptomütsiini suhtes oli *E.coli* antud katsetingimustes tundlik (MBC oli 10 mg/l), siis valiti streptomütsiin, et testida BiOI ja BiOI-GO toimet antibiootikumide adsorbeerimisele või eemaldamisele vesikeskkonnast. Selleks kasutati lähenemisviisi, kus tehti spot-testiga kindlaks, kas BiOI või BiOI-GO lisamine streptomütsiini lahjendustele vähendab segu antibakteriallset toimet (st MBC suureneb). See näitab, võimalikku antibiootikumide eemaldamist, lagundamist või biosaadavuse vähendamist testikeskkonnas BiOI või BiOI-GO toimel. Testi tulemused näitasid, et streptomütsiini MBC 10 mg/l ei muutunud, kui streptomütsiini lahustele lisati 100 mg/l BiOI või BiOI-GO nanomaterjale (joonis 14). Samuti tehti kindlaks, et streptomütsiini ja nanomaterjalide segude 24-tunnine inkubeerimine kas valges või pimedas enne bakterikultuurile lisamist ei mõjutanud streptomütsiini MBC väärtust (joonis 8). Tulemused viitasid sellele, et BiOI ega BiOI-GO ei mõjutanud streptomütsiini bioaktiivsust, st ei adsorbeerinud ega lagundanud streptomütsiini testitud kontsentratsioonide juures piisaval määral, et see oleks mõjutanud MBC väärtust. Edasised katsed on vajalikud selleks, et optimeerida nanomaterjali kontsentratsiooni (antibiootikumi ja nanomaterjali kontsentratsioonide suhet) ja täpsemalt määrata streptomütsiini (või mõne teise antibiootikumi) kontsentratsioon pärast nanomaterjaliga inkubeerimist.



Joonis 14. Nanomaterjalide ja streptomütsiini segude bioloogilise aktiivsuse testimine bakteriga *E.coli*. Bakterikultuuri inkubeeriti streptomütsiini või nanomaterjalide erineva kontsentratsiooniga suspensioonides 1,5 tundi ja hinnati seejärel bakteri kasvu. Numbrid vasakus veerus tähistavad streptomütsiini, nanomaterjalide ja $CuSO_4$ lahjenduste kontsentratsioone vastavates ridades. Siniste ringidega on tähistatud proovide kohad, kus bakteri kasvu ei täheldatud. Veergudes 1 ja 2 on streptomütsiini lahjendused, veergudes 3 ja 4 on BiOI, 5 ja 6 BiOI-GO suspensioonid ja veergudes 7 – 10 on streptomütsiini lahjendused, mis sisaldavad 100 mg/l kas BiOI või BiOI-GO, veergudes 11 ja 12 on positiivse kontrollina kasutatud $CuSO_4$ lahused.

3.6 BiOI ja BiOI-GO toime $CuSO_4$ antibakteriaalsusele

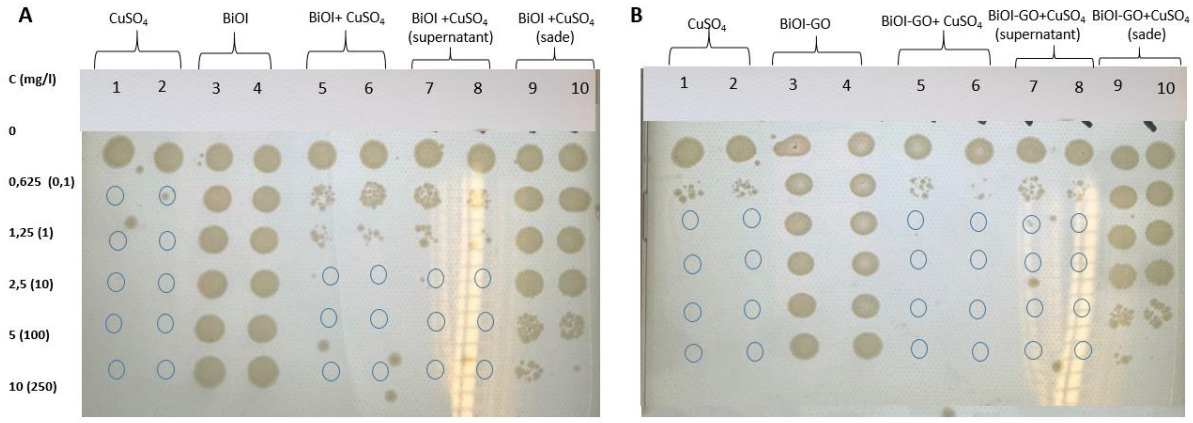
Teise saasteainete klassina uuriti metalle ja keskenduti BiOI ja BiOI-GO toimele vase toksilisuse vähendamisel. $CuSO_4$ kümnekordsete lahjenduste seeria korral oli $CuSO_4$ MBC 1 mg/l (joonis 15 A, veerud 1 ja 2), samas 100 mg/l BiOI suspensiooni lisamisel $CuSO_4$ lahjendustele suurenes $CuSO_4$ MBC 10 mg/l (joonis 15 A, veerud 9 ja 10). Sarnast tendetsi aga ei täheldatud 100 mg/l BiOI-GO suspensiooni lisamisel $CuSO_4$ lahjendustele; $CuSO_4$ MBC oli 1 mg/l, sarnaselt ilma nanomaterjalita $CuSO_4$ MBC-le (joonis 15 B, veerud 1, 2 ja 9, 10). Et selgitada, kas vase toksilisuse vähenemine oli tingitud vase komplekseerumisest BiOI nanomaterjaliga, uuriti eraldi ka nanomaterjalide ja $CuSO_4$ suspensiooni sademe ja supernatandi antibakteriaalset toimet. Selleks sadestati nanomaterjalide ja $CuSO_4$ segust nanomaterjal tsentrifuugimise teel ja eemaldati supernatant. Sade suspendeeriti MilliQ vees. Katse tulemused näitasid, et BiOI ja $CuSO_4$ segu supernatandis oli $CuSO_4$ MBC suurem (10 mg/l), kui ainult $CuSO_4$ MBC (1 mg/l), mis viitas supernatandi madalamale Cu contsentratsioonile (joonis 15 A, veerud 5 ja 6). MilliQ vees suspendeeritud BiOI ja $CuSO_4$ segu sade oli vähem toksiline võrreldes supernatandiga (joonis 15A, veerud 7 ja 8). See võis olla tingitud vase komplekseerumisest BiOI nanomaterjaliga, mis vähendas vase biosaadavust, ja Cu ioonide madalamast kontsentratsioonist supernatandis. See tulemus viitab sellele, et supernatandis sisalduvatel vabadel Cu^{2+} ioonidel on tugevam toksiline toime kui ioonidel, mis adsorbeeriti nanomaterjalidele. BiOI-GO ja $CuSO_4$ segu supernatant osutus sama toksiliseks kui $CuSO_4$ lahus, mis näitas, et BiOI-GO ei adsorbeerinud olulisel määral Cu ioone (joonis 15 B, veerud 5 ja 6), mis oli eeldatavalt põhjuseks, miks BiO-GO suspensioon ei vähendanud $CuSO_4$ toksilisust.



Joonis 15. Nanomaterjalide ja $CuSO_4$ segude bioloogilise aktiivsuse testimine bakteriga E.coli. Bakterikultuuri inkubeeriti 1,5 tundi erineva kontsentratsiooniga $CuSO_4$, nanomaterjalide (BiOI või BiOI-GO) ning nanomaterjalide $CuSO_4$-ga moodustatud segude suspensioonides ja hinnati seejärel bakteri kasvu agarsöötmel. Nanomaterjalide ja $CuSO_4$ suspensioonid valmistati eraldi nii supernatandist kui ka nanomaterjali ja vasksulfaadi segust moodustunud sadest. Numbrid vasakus veerus tähistavad nanomaterjalide ja $CuSO_4$ lahjenduste kontsentratsioone vastavates ridades. Sulgudes toodud kontsentratsiooni kasutati ainult paneelide A ja B veergudes 3 ja 4. Siniste ringidega on tähistatud proovide kohad, kus bakteri kasvu ei täheldatud. Samuti paneelil A $CuSO_4$ lahuse ja BiOI,

BiOI+$CuSO_4$(sade) suspensioonide juures näha bakteri kasvu mis oli eeldatavalt tingitud bakterit sisaldavate proovide kogemata tilkumisest agarplaadile. Paneelil B $CuSO_4$ lahuse ja BiOI-GO+$CuSO_4$(supernatant), BiOI-GO+$CuSO_4$(sade) ja BiOI-GO+$CuSO_4$ suspensioonide juures näha bakteri kasvu mis oli eeldatavalt tingitud bakterit sisaldavate proovide kogemata tilkumisest agarplaadile.Numbritega (1-10) on tähistatud milline veerg vastab igale proovile. Paneelil A veergudes 1 ja 2 on $CuSO_4$ lahused, 3 ja 4 on BiOI, 5 ja 6 BiOI-GO + $CuSO_4$ (supernatant), 7 ja 8 BiOI + $CuSO_4$ (sade), 9 ja 10 BiOI + $CuSO_4$ suspensioonid , milles inkubeeriti bakterit *E.coli*. Paneelil B veergudes 1 ja 2 on $CuSO_4$ lahused, 3 ja 4 on BiOI-GO, 5 ja 6 BiOI-GO + $CuSO_4$ (supernatant), 7 ja 8 BiOI-GO + $CuSO_4$ (sade), 9 ja 10 BiOI-GO + $CuSO_4$ suspensioonid , milles inkubeeriti bakterit *E.coli*.

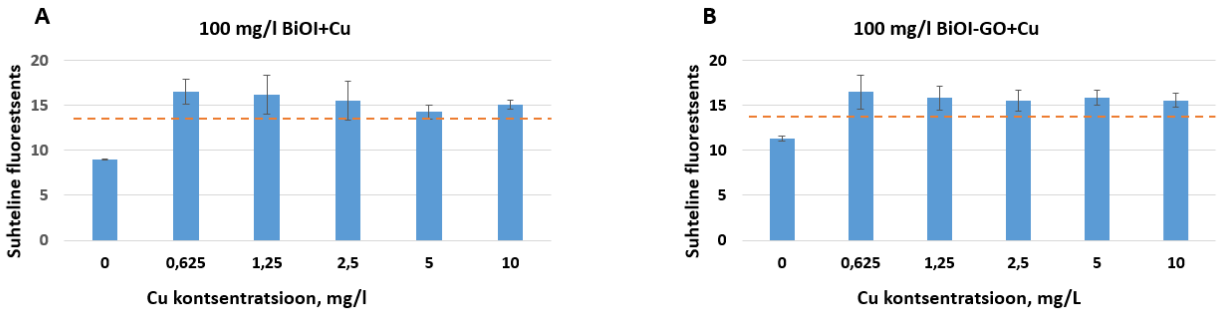
Kuna kümnekordsete $CuSO_4$ lahjenduste puhul ei pruukinud väiksed erinevused nanomaterjalide ja Cu ioonide vahel olla spot-testis detekteeritavad, teostati katse kahekordsete $CuSO_4$ lahjenduste seeriaga MBC väärtuse piirkonnas. Tulemused näitasid, et $CuSO_4$ MBC oli < 0,625 mg/l (joonis 16 A, veerud 1 ja 2). 100 mg/l BiOI lisamine $CuSO_4$ lahustesse suurendas aga $CuSO_4$ MBC väärtust (2,5 mg/l, joonis 16 A, veerud 5 ja 6), mis oli sama ka BiOI ja $CuSO_4$ suspensiooni supernatandi korral (joonis 16 A, veerud 7 ja 8). See näitas, et Cu kontsentratsioon supernatandis oli vähenenud, tõenäoliselt nanomaterjalidega komplekseerumise tõttu. BiOI ja $CuSO_4$ suspensiooni sade ei avaldanud antibakteriaalset toimet (joonis 14 A, veerud 9 ja 10), viidates komplekseeritud vase vähesele biosaadavusele. Sarnaselt eelnevalt tehud spot-testiga (joonis 15), selgus ka selles katses, et BiOI-GO ei suurendanud $CuSO_4$ MBC väärtust (joonis 16 B). Seega BiOI-GO ei olnud efektiivne $CuSO_4$ toksilisuse vähendamisel, millest võis järeldada, et BiOI-GO ei adsorbeerinud vaske testitud kontsentrtaioonide juures piisavalt.



Joonis 16. Nanomaterjalide ja $CuSO_4$ segude bioloogilise aktiivsuse testimine bakteriga *E.coli*. Bakterikultuuri inkubeeriti 1,5 tundi erineva kontsentratsiooniga $CuSO_4$, nanomaterjalide (BiOI või BiOI-GO) ning nanomaterjalide $CuSO_4$-ga moodustatud segude suspensioonides ja hinnati seejärel bakteri kasvu agarsöötmel. Nanomaterjalide ja $CuSO_4$ suspensioonid valmistati eraldi nii supernatandist kui ka nanomaterjali ja $CuSO_4$ segust moodustunud sadest. Numbrid vasakus veerus tähistavad nanomaterjalide ja $CuSO_4$ lahjenduste kontsentratsioone vastavates ridades. Sulgudes toodud kontsentratsiooni kasutati ainult paneelide A ja B veergudes 3 ja 4. Siniste ringidega on tähistatud proovide kohad, kus bakteri kasvu ei täheldatud. Samuti paneelil A $CuSO_4$ lahuse ja BiOI + $CuSO_4$, BiOI+

$CuSO_4$(supernatant) suspensioonide juures näha bakteri kasvu mis oli eeldatavalt tingitud bakterit sisaldavate proovide kogemata tilkumisest agarplaadile. Paneelil B on ka BiOI-GO+ $CuSO_4$(supernatant) suspensioonide juures näha bakteri kasvu mis oli eeldatavalt tingitud bakterit sisaldavate proovide kogemata tilkumisest agarplaadile. Numbritega (1-10) on tähistatud milline veerg vastab igale proovile. Paneelil A veergudes 1 ja 2 on $CuSO_4$ lahused, 3 ja 4 on BiOI, 5 ja 6 BiOI + $CuSO_4$ suspensioonid, 7 ja 8 BiOI + $CuSO_4$ (supernatant), 9 ja 10 BiOI + $CuSO_4$ (sade) suspensioonid milles inkubeeriti bakterit *E.coli*. Paneelil B veergudes 1 ja 2 on $CuSO_4$ lahused, 3 ja 4 on BiOI-GO, 5 ja 6 BiOI-GO + $CuSO_4$ suspensioonid, 7 ja 8 BiOI-GO + $CuSO_4$ (supernatant), 9 ja 10 BiOI-GO + $CuSO_4$ (sade) suspensioonid milles inkubeeriti bakterit *E.coli*.

Eelnevalt tehti kindlaks, et BiOI ja BiOI-GO abiootilistes tingimustes vesisuspensioonides olulisel määral ROS-i ei tekitanud (joonis 6 A ja B). Kuna Cu on üleminekumetall, mis võib osaleda redoksreaktsioonides (49), siis uuriti suhtelist ROS-i taset ka $CuSO_4$ lahustes valmistatud nanomaterjalide suspensioonides, imiteerides spot-testi tingimusi (pimedas mikroplaadil ilma loksutamata, 1 h). Eriti oluline oli see küsimus BiOI-GO puhul, mille segud $CuSO_4$ -ga ei osutunud vähem toksilisemaks võrreldes $CuSO_4$ lahustega. Tekkis küsimus, kas BiOI-GO võis $CuSO_4$ lahuses muutuda reaktiivsemaks ja seetõttu põhjustada suuremat antibakteriaalset toimet. Tulemused näitasid, et 100 mg/l nanomaterjalide suspensioonid erineva kontsentratsiooniga Cu lahustes genereerisid taustast kõrgemat suhtelise ROS-i taset (joonis 17), mis oli kõrgem, kui puhaste nanomaterjalide suspensioonides mõõdetud suhteline ROS (joonis 6). Samas ei täheldatud positiivset korrelatsiooni $CuSO_4$ kontsentrtasiooni ja ROS-i taseme vahel ja võrreldes positiivse kontrolliga olid ROS-i tasemed siiski madalamad (joonis 6 C). Samuti ei genereerinud BiOI-GO suspensioon $CuSO_4$ lahustes oluliselt kõrgemat suhtelist ROS-i kui BiOI ja $CuSO_4$ lahused. Seega ei olnud tõenäoline, et nanomaterjalide ja Cu koostoime oleks bakterites tekitanud oksüdatiivse stressi taset, mis oleks avaldanud antibakteriaalset toimet.

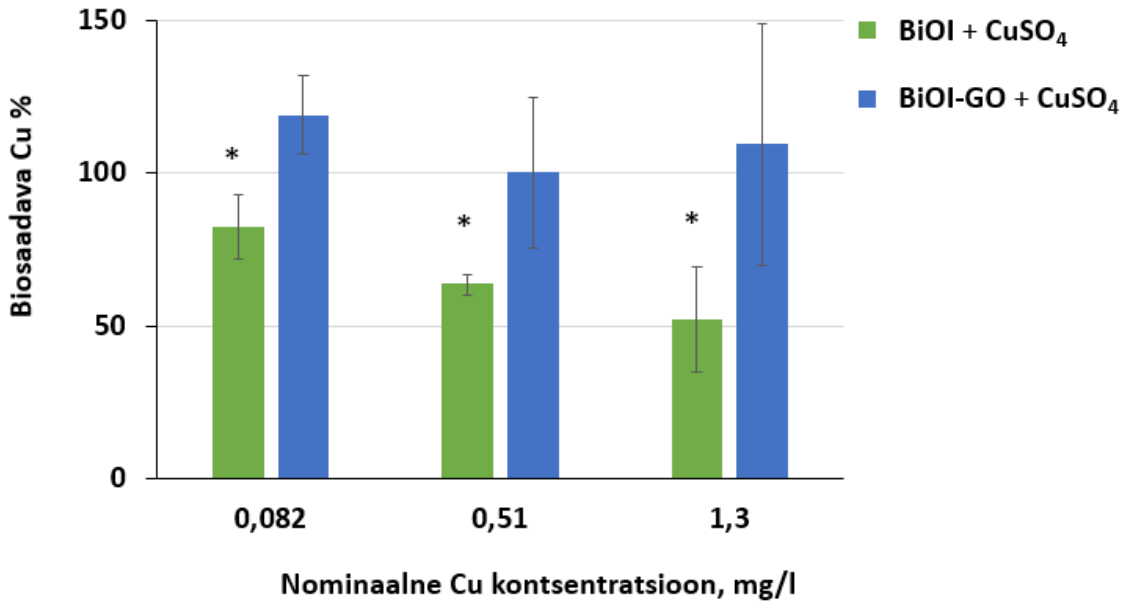


Joonis 17. Reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) tase $CuSO_4$ lahustes valmistatud nanomaterjalide suspensioonides (abiootilistes tingimustes). Suhteline ROS BiOI suspensioonides, mis sisaldavad erinevas kontsentratsioonis Cu (A). Suhteline ROS BiOI-GO suspensioonides, mis sisaldavad erinevas kontsentratsioonis Cu (B). Mõlema nanomaterjali kontsentratsioon oli kõigis suspensioonides 100 mg/l. ROS kvantifitseeriti 2',7'-diklorofluorestseiini (DCF) fluorestsentsi mõõtmise teel. Oranžid punktiirjooned graafikutel tähistavad DCF fluorestsentsi MilliQ vees (taustluminestsents).

3.7 BiOI nanomaterjalide vase toksilisust vähendava mehhanismi uurimine

Kuna spot-testide põhjal eeldati, et BiOI adsorbeerib Cu ioone ja seega vähendab biosaadava vase hulka suspensioonides, ja et BiOI adsorbeerib vaske efektiivsemalt kui BiOI-GO, siis määrati biosaadava vase kontsentratsioonid proovides. Selleks kasutati rekombinantseid baktereid *E.coli*, mille luminestsents on proportsionaalne lahuses oleva biosaadava vase kontsentratsiooniga (44). Nanomaterjalide ja $CuSO_4$ segud valmistati samamoodi nagu eelnevalt kirjeldatud spot-testide jaoks ja rekombinantseid baktereid *E.coli* inkubeeriti nendes segudes, misjärel mõõdeti bakterite luminestsents. Vaselahjenduste toksilisuse arvessevõtmiseks kasutati kontrolltüve, mis sisaldas bioluminestsensti geene, tagades bakteri konstitutiivse luminestseerumise. Kontrolltüve luminestsentsi alanemine viitas testitava vasekontsenratsiooni toksilisusele ja seda võeti arvesse indutseeritava luminestsentsiga bakteritüve tulemuste tõlgendamisel (44).

Tulemused näitasid, et tõepoolest, BiOI vähendas biosaadava vase hulka bakteritele (joonis 18). Biosaadava vase suhteline hulk oli kõigi kolme testitud Cu kontsentratsiooni juures alla nominaalse kontsentratsiooni ja sõltus nominaalsest kontsentratsioonist. Samas, BiOI-GO biosaadava vase hulka ei vähendanud, sest detekteeritud vase kontsentratsioonid olid samal tasemel kui nominaalse vase kontsentratsioonid. Seega kinnitasid sensorbakteriga saadud tulemused spot-testis saadud tulemusi, kus BiOI vähendas $CuSO_4$ antibakteriaalset toimet vähendades biosaadava Cu hulka. BiOI-GO spot-testis $CuSO_4$ toksilisust ei vähendanud, mis oli tingitud materjali ebaefektiivsest Cu adsorbeerimisest.



Joonis 18. Biosaadava Cu suhtelised kontsentratsioonid BiOI ja BiOI-GO sisaldavates $CuSO_4$ lahustes, mida inkubeeriti rekombinantsete bakterite (*E. coli*) suspensioonides 1 tunni jooksul. X-teljel on vase nominaalsed kontsentratsioonid nanomaterjlalide suspensioonides (100 mg/l), milles baktereid inkubeeriti ja y-teljel on biosaadava vase % nominaalsest. Biosaadava vase kontsentratsioon määrati rekombinantse *E.coli* luminestsentsi põhjal, mis on proportsionaalne lahuses oleva biosaadava vase

kontsentratsiooniga. * - statistiliselt erinev võrreldes BiOI-GO suspensiooniga vastava Cu kontsentratsiooni korral ($p < 0.05$).

4. Järeldused

Läbiviidud katsete põhjal tehti järgmised järeldused:

1. Kummiaraabiku lisamine (0,4% ja 1%) parandas BiOI suspensiooni stabiilsust, osakeste suurusjaotus muutus ühtlasemaks, mida näitas DLS-analüüs ja PdI statistiliselt oluline vähenemine. Osakeste keskmine suurus ei muutunud, kuid jaotus oli ühtlasem, mis viitas paremale dispergeeritavusele. ζ-potentsiaal näitas, et kummiaraabik suurendas BiOI suspensioonide stabiilsust ja osakeste negatiivset pinnalaengut. BiOI osakeste suurus ega ζ-potentsiaal ei sõltunud lisatud kummiaraabiku kontsentratsioonist, kuid 1% kummiaraabikuga suspensioonis oli nanomaterjali osakeste suurusjaotus kitsam kui 0,4% kummiaraabikuga suspensioonis. Ei BiOI ega selle komposiit BiOI-GO ei tekitanud abiootilistes tingimustes olulist ROS-i taset, mis viitas sellele, et need nanomaterjalid ei põhjusta olulist oksüdatiivse stressi taset rakkudes ja organismides.

2. Biotestide tulemused näitasid, et BiOI ja BiOI-GO nanomaterjalid, millele on lisatud kummiaraabik, ei ole toksilised *E.coli* bakteritele isegi 250 mg/l kontsentratsioonis. Seega ei ole need nanomaterjalid käesolevas töös testitud tingimustes bioloogiliselt aktiivsed. Ka ilma kummiaraabikuta suspendeeritud BiOI ja BiOI-GO nanomaterjalid ei mõjutanud bakterite elulemust, kinnitades nende vähest bioaktiivsust vesikeskkonnas ja sobivust saasteainete adsorbeerimiseks.

3. Käesolevas töös näidati, et BiOI ja BiOI-GO efektiivsus saasteainete detoksifitseerimisel sõltus saasteainest. Orgaanilise saasteaine (streptomütsiini) puhul BiOI ja BiOI-GO suspensioonid selle toksilisust bakteritele ei vähendanud, millest võis järeldada, et nanomaterjalid antud tingimustes streptomütsiini efektiivselt ei adsorbeerinud ja selle aktiivsust ei mõjutanud. $CuSO_4$-ga tehtud katsete tulemused näitasid, et BiOI suspensiooni (100 mg/l) lisamine $CuSO_4$ lahusele muutis lahuse vähem toksilisemaks võrreldes sama Cu lahusega, mis nanomaterjale ei sisaldanud. Ka BiOI ja $CuSO_4$ suspensiooni supernatant oli madalama antibakteriaalse toimega. See viitab sellele, et BiOI adsorbeerib vaske ja vähendab selle toksilisust *E.coli*-le. Erinevalt BiOI-st ei mõjutanud BiOI-GO suspensiooni (100 mg/l) lisamine vase MBC-d, viidates sellele, et BiOI-GO ei adsorbeeri vaske ega vähenda selle toksilisust. Biotestide tulemused olid kooskõlas biosaadava vase kontsentratsioonidega nanomaterjalide ja $CuSO_4$ suspensioonides. Katse rekombinantsete *E.coli* bakteritega kinnitas, et BiOI vähendas vase biosaadavust, samas kui BiOI-GO ei näidanud sarnast efekti. Seega võib järeldada, et BiOI adsorbeerib vaske tõhusamalt, samas kui BiOI-GO mitte, näidates erinevusi nende adsorptsioonivõimes.

Kokkuvõttes võib öelda, et BiOI-põhised nanomaterjalid on näidanud suurt potentsiaali saasteainete adsorbeerimiseks ja lagundamiseks, eriti raskmetallide puhul. BiOI oli efektiivne vase biosaadavuse vähendamisel, mis omakorda vähendas selle toksilisust bakteritele *E.coli*. See viitab sellele, et BiOI võiks olla kasulik materjal keskkonnasaaste vähendamisel, sidudes kahjulikke aineid ja minimeerides nende mõju. Erinevalt BiOI-st ei suutnud BiOI-GO adsorbeerida vaske piisavalt tõhusalt, mis näitab, et BiOI ja BiOI-GO erinevad oma adsorptsioonivõimekuses. Seetõttu on BiOI-põhised nanomaterjalid potentsiaalne lahendus keskkonna puhastamiseks, samas kui BiOI-GO vajab veel täiendavat arendamist, et saavutada sarnane efektiivsus.

Tänuavaldused

Tahaksin avaldada sügavat tänu oma juhendajale, Monika Mortimerile, väärtuslike nõuannete, pideva toetuse ja juhendamise eest kogu minu töö vältel. Samuti soovin tänada kogu Keskkonnatoksikoloogia laboratooriumi meeskonda, kes andis mulle võimaluse nendega koostööd teha.

Soovin tänada oma perekonda, kelle pidev toetus ja mõistmine on olnud mulle hindamatu kogu töö protsessi jooksul. Samuti tänan oma õppekaaslasi nende toetuse ja positiivse suhtumise eest, mis aitasid mul ületada kõik raskused ning viia töö edukalt lõpule.

Kasutatud allikad

1. Asghar, Nosheen, Alamdar Hussain, Duc Anh Nguyen, Salar Ali, Ishtiaque Hussain, Aurangzeb Junejo, and Attarad Ali. 'Advancement in Nanomaterials for Environmental Pollutants Remediation: A Systematic Review on Bibliometrics Analysis, Material Types, Synthesis Pathways, and Related Mechanisms'. Journal of Nanobiotechnology 22, no. 1 (10 January 2024): 26.
2. Alegbeleye, Oluwadara, Oluwafemi Bamidele Daramola, Adewole Tomiwa Adetunji, Odunayo T. Ore, Yemisi Juliet Ayantunji, Richard Kolade Omole, Damilare Ajagbe, and Susanna Oluwaseyi Adekoya. 'Efficient Removal of Antibiotics from Water Resources Is a Public Health Priority: A Critical Assessment of the Efficacy of Some Remediation Strategies for Antibiotics in Water'. Environmental Science and Pollution Research 29, no. 38 (August 2022): 56948–20.
3. Yang, Qiulian, Yuan Gao, Jian Ke, Pau Loke Show, Yuhui Ge, Yanhua Liu, Ruixin Guo, and Jianqiu Chen. 'Antibiotics: An Overview on the Environmental Occurrence, Toxicity, Degradation, and Removal Methods'. Bioengineered 12, no. 1 (January 2021): 7376–7416.
4. Blair, Jessica M. A., Mark A. Webber, Alison J. Baylay, David O. Ogbolu, and Laura J. V. Piddock. 'Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance'. Nature Reviews Microbiology 13, no. 1 (January 2015): 42–51.
5. Mortimer, M., Winchell, A., & Holden, P. A. (2020). Evaluation of frameworks proposed as protective of antimicrobial resistance propagation in the environment. Environment International, 144, 106053. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106053
6. Briffa, Jessica, Emmanuel Sinagra, and Renald Blundell. 'Heavy Metal Pollution in the Environment and Their Toxicological Effects on Humans'. Heliyon 6, no. 9 (September 2020): e04691.
7. Hamid, Nur Hafizah Ab. 'The Current State-Of-Art of Copper Removal from Wastewater: A Review', 2022.
8. Jayakumar, Manickam, Udayarpillai Surendran, Pushpanathan Raja, Amit Kumar, and Venkatramanan Senapathi. 'A Review of Heavy Metals Accumulation Pathways, Sources and Management in Soils'. Arabian Journal of Geosciences 14, no. 20 (October 2021): 2156.
9. Wu, Yingji, Yubo Liu, Hesam Kamyab, Manivasagan Rajasimman, Natarajan Rajamohan, Gia Huy Ngo, and Changlei Xia. 'Physico-Chemical and Biological Remediation Techniques for the Elimination of Endocrine-Disrupting Hazardous Chemicals'. Environmental Research 232 (September 2023): 116363.
10. Javeed Ganaie, Rafiya, Samreen Rafiq, and Ashita Sharma. 'Recent Advances in Physico-Chemical Methods for Removal of Dye from Wastewater'. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 1110, no. 1 (1 February 2023): 012040.
11. Malaviya, Piyush, and Asha Singh. 'Physicochemical Technologies for Remediation of Chromium-Containing Waters and Wastewaters'. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 41, no. 12 (28 April 2011): 1111–72.
12. Kumar, Vanish. 'Metal-Organic Frameworks for Photocatalytic Detoxification of Chromium and Uranium in Water'. Coordination Chemistry Reviews, 2021.

13. Kumar, Amit. 'Bio-Inspired and Biomaterials-Based Hybrid Photocatalysts for Environmental Detoxification_ A Review'. Chemical Engineering Journal, 2020.
14. Rashid, Ruhma, Iqrash Shafiq, Parveen Akhter, Muhammad Javid Iqbal, and Murid Hussain. 'A State-of-the-Art Review on Wastewater Treatment Techniques: The Effectiveness of Adsorption Method'. Environmental Science and Pollution Research 28, no. 8 (February 2021): 9050–66.
15. Abas, Siti Nur Aeisyah, Mohd Halim Shah Ismail, Lias Kamal, and Shamsul Izhar. 'Adsorption Process of Heavy Metals by Low-Cost Adsorbent: A Review', 2013.
16. Alaqarbeh, Marwa. 'Adsorption Phenomena: Definition, Mechanisms, and Adsorption Types: Short Review' 13 (2021).
17. Thommes, Matthias, and Katie A. Cychosz. 'Physical Adsorption Characterization of Nanoporous Materials: Progress and Challenges'. Adsorption 20, no. 2–3 (February 2014): 233–50.
18. Atif, Muhammad, Hafiz Zeshan Haider, Roberta Bongiovanni, Maria Fayyaz, Tayyaba Razzaq, and Sara Gul. 'Physisorption and Chemisorption Trends in Surface Modification of Carbon Black'. Surfaces and Interfaces 31 (July 2022): 102080.
19. Ejaz, Mahnoor, Alvina Gul, Munir Ozturk, Ahmed Hafeez, Bengu Turkyilmaz Unal, Sami Ullah Jan, and Muhammad Taimur Siddique. 'Nanotechnologies for Environmental Remediation and Their Ecotoxicological Impacts'. Environmental Monitoring and Assessment 195, no. 11 (November 2023): 1368.
20. Sun, Zaichun, and Tahta Amrillah. 'Potential Application of Bismuth Oxyiodide (BiOI) When It Meets Light'. Nanoscale 16, no. 10 (2024): 5079–5106.
21. Dai, Wen-Wu, and Zong-Yan Zhao. 'Electronic Structure and Optical Properties of BiOI as a Photocatalyst Driven by Visible Light'. *Catalysts* 6, no. 9 (3 September 2016): 133.
22. Huang, Yan, Jinlong Lai, Yang Huang, Xuegang Luo, Xu Yang, Zewei Liu, Yue Duan, and Chen Li. 'Response Mechanism of Chlamydomonas Reinhardtii to Nanoscale Bismuth Oxyiodide (Nano-BiOI): Integrating Analysis of Mineral Nutrient Metabolism and Metabolomics'. Journal of Environmental Sciences 121 (November 2022): 13–24.
23. Dong, Renfeng, Yan Hu, Yefei Wu, Wei Gao, Biye Ren, Qinglong Wang, and Yuepeng Cai. 'Visible-Light-Driven BiOI-Based Janus Micromotor in Pure Water'. Journal of the American Chemical Society 139, no. 5 (8 February 2017): 1722–25.
24. Martínez-Montelongo, Jorge H., Carlos A. Pineda-Arellano, Rafael Hernandez-Rangel, M.L. Jiménez-González, Israel Betancourt, Juan Manuel Peralta-Hernández, and Iliana E. Medina-Ramírez. 'Bismuth-Based Nanocomposites as Potential Materials for Indoor Air Treatment'. Chemosphere 367 (November 2024): 143539.
25. Su, Minhua, Chun He, Linfei Zhu, Zhenjie Sun, Chun Shan, Qiong Zhang, Dong Shu, Rongliang Qiu, and Ya Xiong. 'Enhanced Adsorption and Photocatalytic Activity of BiOI–MWCNT Composites towards Organic Pollutants in Aqueous Solution'. Journal of Hazardous Materials 229–230 (August 2012): 72–82.
26. Jagt, Robert A., Ivona Bravić, Lissa Eyre, Krzysztof Gałkowski, Joanna Borowiec, Kavya Reddy Dudipala, Michał Baranowski, et al. 'Layered BiOI Single Crystals Capable of Detecting Low Dose Rates of X-Rays'. Nature Communications 14, no. 1 (28 April 2023): 2452.

27. Luo, Yanni, Xuecai Tan, David J. Young, Quanyou Chen, Yuehui Huang, Defen Feng, Chenhao Ai, and Yan Mi. 'A Photoelectrochemical Aptasensor for the Sensitive Detection of Streptomycin Based on a TiO2/BiOI/BiOBr Heterostructure'. Analytica Chimica Acta 1115 (June 2020): 33–40.
28. Prasad, Muvva D., M. Ghanashyam Krishna, and Sudip K. Batabyal. 'Facet-Engineered Surfaces of Two-Dimensional Layered BiOI and Au–BiOI Substrates for Tuning the Surface-Enhanced Raman Scattering and Visible Light Photodetector Response'. ACS Applied Nano Materials 2, no. 6 (28 June 2019): 3906–15.
29. Mera, Adriana C., Yanko Moreno, Jean-Yves Pivan, Octavio Peña, and Héctor D. Mansilla. 'Solvothermal Synthesis of BiOI Microspheres: Effect of the Reaction Time on the Morphology and Photocatalytic Activity'. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 289 (September 2014): 7–13.
30. Gao, Peng, Nanting Qiu, Li Feng, and Liqiu Zhang. 'Dimension-Controlled Synthesis of BiOI for Efficient Visible Light Photodegradation of Tetracycline: Role of Pore Structure'. Environmental Science and Pollution Research 31, no. 20 (3 April 2024): 29101–12.
31. Gallegos-Alcaíno, Alejandra, Nathaly Robles-Araya, Camila Avalos, Alexander Alfonso-Alvarez, Carlos A. Rodríguez, Héctor Valdés, Norma A. Sánchez-Flores, et al. 'Synthesis of BiOI/Mordenite Composites for Photocatalytic Treatment of Organic Pollutants Present in Agro-Industrial Wastewater'. Nanomaterials 12, no. 7 (31 March 2022): 1161.
32. Ye, Liqun, Lihong Tian, Tianyou Peng, and Ling Zan. 'Synthesis of Highly Symmetrical BiOI Single-Crystal Nanosheets and Their {001} Facet-Dependent Photoactivity'. Journal of Materials Chemistry 21, no. 33 (2011): 12479.
33. Gao, Peng, Ze Yin, Li Feng, Yongze Liu, Ziwen Du, Zhiying Duan, and Liqiu Zhang. 'Solvothermal Synthesis of Multiwall Carbon Nanotubes/BiOI Photocatalysts for the Efficient Degradation of Antipyrine under Visible Light'. Environmental Research 185 (June 2020): 109468.
34. Wang, YuanYou, SuoJin Chen, DangQin Jin, AiQin Gong, XueJiao Xu, and Changle Wu. 'Facile One-Step Solvothermal Synthesis of Active Carbon/BiOI Microspheres with Enhanced Visible Light-Driven Photocatalytic Activity in the Reduction of Cr(vi)'. RSC Advances 8, no. 14 (2018): 7518–22.
35. Yang, Yuping, Haibo Yin, Huifan Li, Quan Zou, Ziping Zhang, Wenkai Pei, Liulin Luo, Yuning Huo, and Hexing Li. 'Synergistic Photocatalytic-Photothermal Contribution to Antibacterial Activity in BiOI-Graphene Oxide Nanocomposites'. ACS Applied Bio Materials 1, no. 6 (17 December 2018): 2141–52.
36. Gostaviceanu, Andreea, Simona Gavrilaş, Lucian Copolovici, and Dana Maria Copolovici. 'Graphene-Oxide Peptide-Containing Materials for Biomedical Applications'. International Journal of Molecular Sciences 25, no. 18 (22 September 2024): 10174.
37. Chung, Chul, Young-Kwan Kim, Dolly Shin, Soo-Ryoon Ryoo, Byung Hee Hong, and Dal-Hee Min. 'Biomedical Applications of Graphene and Graphene Oxide'. Accounts of Chemical Research 46, no. 10 (15 October 2013): 2211–24.
38. Seabra, Amedea B., Amauri J. Paula, Renata De Lima, Oswaldo L. Alves, and Nelson Durán. 'Nanotoxicity of Graphene and Graphene Oxide'. Chemical Research in Toxicology 27, no. 2 (17 February 2014): 159–68.

39. Gholampour, Aliakbar, Meisam Valizadeh Kiamahalleh, Diana N. H. Tran, Togay Ozbakkaloglu, and Dusan Losic. ‘From Graphene Oxide to Reduced Graphene Oxide: Impact on the Physiochemical and Mechanical Properties of Graphene–Cement Composites’. ACS Applied Materials & Interfaces 9, no. 49 (13 December 2017): 43275–86.
40. Badrigilan, Samireh, Fatemeh Heydarpanahi, Jalal Choupani, Mahdi Jaymand, Hadi Samadian, Mojtaba Hoseini-Ghahfarokhi, Thomas J Webster, and Lobat Tayebi. ‘A Review on the Biodistribution, Pharmacokinetics and Toxicity of Bismuth-Based Nanomaterials’. International Journal of Nanomedicine Volume 15 (September 2020): 7079–96.
41. Hu, Chen, Yujun Yang, Yuqing Lin, Linlin Wang, Rongyang Ma, Yanli Zhang, Xiaoli Feng, Junrong Wu, Lili Chen, and Longquan Shao. ‘GO-Based Antibacterial Composites: Application and Design Strategies’. Advanced Drug Delivery Reviews 178 (November 2021): 113967.
42. Sun et al., Highly sensitive and selective colorimetric visualization of streptomycin in raw milk using Au nanoparticles supramolecular assembly, Chem. Commun., 2011, 47, 9888–9890.
43. Suppi, Sandra, Kaja Kasemets, Angela Ivask, Kai Künnis-Beres, Mariliis Sihtmäe, Imbi Kurvet, Villem Aruoja, and Anne Kahru. ‘A Novel Method for Comparison of Biocidal Properties of Nanomaterials to Bacteria, Yeasts and Algae’. Journal of Hazardous Materials 286 (April 2015): 75–84.
44. Ivask, Angela, Taisia Rõlova, and Anne Kahru. ‘A Suite of Recombinant Luminescent Bacterial Strains for the Quantification of Bioavailable Heavy Metals and Toxicity Testing’. BMC Biotechnology 9, no. 1 (2009): 41.
45. Aruoja, V.; Pokhrel, S.; Sihtmae, M.; Mortimer, M.; Madler, L.; Kahru, A., Toxicity of 12 metal-based nanoparticles to algae, bacteria and protozoa. Environ. Sci. Nano 2015, 2, (6), 630-644.
46. Falke, Sven, and Christian Betzel. ‘Dynamic Light Scattering (DLS): Principles, Perspectives, Applications to Biological Samples’. In Radiation in Bioanalysis, edited by Alice S. Pereira, Pedro Tavares, and Paulo Limão-Vieira, 8:173–93. Bioanalysis. Cham: Springer International Publishing, 2019.
47. Malvern Panalytical. (2018). Zetasizer Nano ZS kasutusjuhend.
48. Ottoson, K. Erineva koostisega metall-fenoolsete võrgustike efektiivsus metallide keskkonnareostuse vähendamisel, magistritöö, Tallinna Ülikool 2025
49. Vo, T.T.T., Peng, TY., Nguyen, T.H. et al. The crosstalk between copper-induced oxidative stress and cuproptosis: a novel potential anticancer paradigm. Cell Commun Signal 22, 353 (2024).

Annotatsioon

Keskkonnareostus, mida põhjustavad näiteks sellised ühendid nagu antibiootikumid ja raskmetallid, on olnud pikka aega tõsine ülemaailmne probleem ning on tänapäeval aktuaalsem kui kunagi varem. Selle probleemi lahendamiseks on vaja välja töötada kaasaegsed materjalid, mis on saasteainete eemaldamisel väga tõhusad. Selle töö eesmärk oli hinnata BiOI-põhiste nanomaterjalide efektiivsust selliste saasteainete nagu streptomütsiin ja $CuSO_4$ adsorptsioonil ja lagunemisel. BiOI-põhiste nanomaterjalide (BiOI ja BiOI-GO) toimivuse hindamiseks kasutati erinevaid meetodeid, sealhulgas nanoosakeste suuruse ja ζ-potentsiaali mõõtmist vesisuspensioonides dünaamilise valgushajumise meetodi abil. Uuriti ka kummiaraabiku kui pindaktiivse aine mõju nanomaterjalide suspendeeritavusele ja bioaktiivsusele. Bioloogilise aktiivsuse hindamiseks kasutati spot-testi meetodit, mis on spetsiaalselt välja töötatud nanomaterjalide mõju testimiseks mikroorganismidele. Nanomaterjalide võimet tekitada vesikeskkonnas reaktiivseid hapnikuühendeid (ingl. k. *reactive oxygen species*, ROS) mõõdeti fluorestseeruvat indikaatorvärvi kasutades ja nanomaterjalide efektiivsust vaseioonide adsorbeerimisel mõõdeti rekombinantsete luminestseerivate bakterite abil. Tulemused näitasid, et kummiaraabik (0,4% ja 1%) muutis BiOI nanoosakeste suurusjaotuse suspensioonis ühtlasemaks, kuid ei vähendanud statistiliselt olulisel määral keskmist osakese diameetrit võrreldes ilma kummiaraabikuta suspendeeriud nanomaterjaliga. BiOI ja BiOI-GO nanomaterjalid ei avaldanud toksilist toimet *Escherichia coli* bakteritele (maksimaalne testitud kontsentratsioon oli 250 mg/l) ega tekitanud abiootilistes tingimustes vesisuspensioonis olulist ROS-i taset. Kummagi nanomaterjali lisamine streptomütsiini lahustele ei vähendanud antibiootikumi antibakteriaalsus, mis näitas, et ei BiOI ega BiOI-GO ei adsorbeerinud streptomütsiini olulisel määral ega mõjutanud selle antibakteriaalset aktiivsust. Samas vähendas BiOI oluliselt raskmetalli ($CuSO_4$) antibakteriaalsust, mis viitas sellele, et BiOI adsorbeeris efektiivselt vaseioone ja seeläbi vähendas selle toksilisust bakteritele. Erinevalt BiOI-st selle komposiit BiOI-GO ei avaldanud sarnast mõju $CuSO_4$ antibakteriaalsusele. See võis olla tingitud kahe nanomaterjali erinevustest vaseioonide adsorbeerimisel, nagu kinnitasid biosaadava vase kontsentratsioonide tasemed. Kokkuvõttes näitas käesolev töö, et BiOI-põhistel nanomaterjalidel on suur potentsiaal keskkonnasaaste vähendamisel ja eriti raskmetallide, nagu vase, adsorbeerimisel.

Abstract

Environmental pollution caused by compounds such as antibiotics and heavy metals has long been a serious global problem and is more relevant today than ever before. To address this issue, it is essential to develop advanced materials that are highly effective in removing pollutants. The aim of this work was to evaluate the efficiency of BiOI-based nanomaterials in the adsorption and degradation of pollutants, including streptomycin and $CuSO_4$. Various methods were employed to evaluate the performance of BiOI-based nanomaterials (BiOI and BiOI-GO), including measurements of the size and ζ-potential of nanoparticles in aqueous suspensions using the dynamic light scattering method. The effect of gum arabic as a surfactant on the suspendability and bioactivity of nanomaterials was also investigated. The spot test method, specifically developed for evaluating the effect of nanomaterials on microorganisms, was used to assess biological activity. The ability of the nanomaterials to generate reactive oxygen species (ROS) in aqueous media was measured using a fluorescent indicator dye, and the efficiency of the nanomaterials to adsorb copper ions was measured using recombinant luminescent bacteria. The results showed that gum arabic (0.4% and 1%) made the size distribution of BiOI nanoparticles in suspension more uniform, but did not significantly reduce the average particle diameter compared to the nanomaterials suspended without gum arabic. BiOI and BiOI-GO nanomaterials did not exert a toxic effect on *Escherichia coli* (the maximum tested concentration was 250 mg/l) and did not generate significant levels of ROS in aqueous suspension under abiotic conditions. The addition of either nanomaterial to streptomycin solutions did not reduce the antibacterial activity of the antibiotic, indicating that neither BiOI nor BiOI-GO adsorbed streptomycin to a significant extent nor affected its antibacterial activity. However, BiOI significantly reduced the antibacterial activity of heavy metal ($CuSO_4$), suggesting that BiOI effectively adsorbs copper ions and thereby reduces its toxicity to bacteria. Unlike BiOI, its composite BiOI-GO did not have a similar effect on the antibacterial activity of $CuSO_4$. This may be due to the differences in the adsorption of copper ions between the two nanomaterials, as confirmed by the levels of bioavailable copper concentrations. In conclusion, the present work demonstrated that BiOI-based nanomaterials have great potential in reducing environmental pollution, particularly in adsorbing heavy metals such as copper.

Lisa
rektori 07.04.2020 käskkirjale nr 1-8/17

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks[1]

Mina Anneli Marhel

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
BiOI-põhiste nanomaterjalide efektiivsus saasteainete adsorbeerimisel ja lagundamisel,

mille juhendaja on Monika Mortimer,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

04.06.2025

[1] *Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. jq 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.*