

UNIWERSYTET SZCZECIŃSKI
INSTYTUT NAUK O MORZU I ŚRODOWISKU



Weronika Brzozowska

**„OUTSOURCING” OKRZEMEK W SYNTEZIE
3D USTRUKTURYZOWANEJ BIOKRZEMIONKI
FUNKCJONALIZOWANEJ NANOCZĄSTKAMI
METALI (Ti, V, Nd, Ag)**

Rozprawa doktorska
napisana pod kierunkiem
dra hab. inż. Myrosława Spryńskiego, prof. UMK
i dra Przemysława Dąbka

Szczecin 2023

Podziękowania

Chciałabym podziękować tym wszystkim, bez pomocy i wsparcia których praca ta nie mogłaby powstać.

Dziękuję:

dr hab. inż. Myrosławowi Sprynskiemu, promotorowi tej pracy, za całą przekazaną mi przez te lata wiedzę oraz wszelką pomoc. Składają się na nią między innymi: niezliczone godziny konsultacji, setki zapisanych czerwonym kolorem stron kolejnych wersji tej pracy, gigabajty klasycznej informacji przesyłanej pomiędzy nami za pomocą Internetu oraz wiele minut rozmów telefonicznych.

dr Przemysławowi Dąbkowi, promotorowi pomocniczemu tej pracy, za opiekę merytoryczną, za cenne uwagi i sugestie.

prof. dr hab. Andrzejowi Witkowskiemu, za stoicki spokój i dobrą radę, które pomagały mi w natłoku naukowych spraw.

prof. dr hab. Bogusławowi Buszewskiemu, za dostrzeżenie we mnie potencjału i danie możliwości rozwoju w świecie nauki.

mgr Izabeli Wojtczak, za miliony godzin spędzonych wspólnie w laboratorium, za niezliczone ilości minut spędzonych nad artykułami, za każdą sekundę wsparcia, gdy ilość rzeczy związanych z rozprawą przerastała nawet najśmielsze oczekiwania.

W sposób szczególny jednak chciałabym podziękować swojej Rodzinie, w szczególności:

Mamie, za to, że gdy nie było obok mnie nikogo innego, Ona była przy mnie zawsze – i jest do tej pory, niezmiennie. Dziękuję Ci, Mamo.

Tacie, za to, że mimo wszystko pomógł ukształtować mi siebie taką, jaka jestem obecnie.

Cioci Ani, za rozbudowanie we mnie zamiłowania do nauk ścisłych, a w szczególności do nauk przyrodniczych.

Babci, za to, że była moim największym i najwierniejszym kibicem.

Dusi, za wszechobecne wsparcie, anielską cierpliwość i nieocenioną pomoc w sprawdzaniu niniejszej pracy.

„By dojść do źródła, trzeba płynąć pod prąd”

Stanisław Jerzy Lec

OŚWIADCZENIE DOKTORANTA

Oświadczam, że moja praca pt.: **„Outsourcing” okrzemek w syntezie 3D ustrukturyzowanej biokrzemionki funkcjonalizowanej nanocząstkami metali (Ti, V, Nd, Ag)**

została napisana przeze mnie samodzielnie,

- a. nie narusza praw autorskich w rozumieniu ustawy z dnia 14 lutego 1994 roku o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz.U. 2021 r. poz. 1062) oraz dóbr osobistych chronionych prawem,
- b. nie zawiera danych i informacji, które uzyskałem / uzyskałam w sposób niedozwolony,
- c. nie była podstawą nadania tytułu naukowego lub zawodowego ani mnie ani innej osobie.

Ponadto oświadczam, że treść pracy przedstawionej przeze mnie do obrony, zawarta na przekazanym nośniku elektronicznym jest identyczna z jej wersją drukowaną.

Szczecin, dn.

podpis doktoranta

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy doktorskiej pt: **„Outsourcing” okrzemek w syntezie 3D ustrukturyzowanej biokrzemionki funkcjonalizowanej nanocząstkami metali (Ti, V, Nd, Ag)**

Szczecin, dn.

podpis doktoranta

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	9
2. CZĘŚĆ LITERATUROWA	12
2.1. OKRZEMKI – PIĘKNO ZAMKNIĘTE W 3-D KRZEMIONKOWYM PANCERZYKU	12
2.1.1. Systematyka	13
2.1.2. Rodzaje i warunki życia okrzemek	14
2.1.3. Cykl komórkowy	16
2.1.3.1. Biomineralizacja	20
2.1.4. Funkcja, struktura i morfologia pancerzyków krzemionkowych	22
2.1.5. Charakterystyka wybranego gatunku okrzemek	25
2.1.5.1. <i>Pseudostaurosira trainorii</i> E. A. Morales	25
2.1.6. Hodowla okrzemek	27
2.1.6.1. Warunki fizyczne i chemiczne	27
2.1.6.1.1. Medium hodowlane	28
2.1.6.1.2. Światło	31
2.1.6.1.3. pH	32
2.1.6.1.4. Napowietrzenie i mieszanie	33
2.1.6.1.5. Temperatura	34
2.1.6.1.6. Zasolenie	35
2.1.6.1.7. Sterylizacja	35
2.1.6.2. Techniki hodowli okrzemek	36
2.1.6.2.1. Zasady hodowli okresowej	36
2.1.6.2.2. Zasady hodowli ciągłej	37
2.1.6.2.3. Systemy produkcji alg	38
2.1.6.2.4. Dynamika wzrostu okrzemek	40
2.1.6.3. Metody zbioru biomasy okrzemek	42
2.1.6.4. Metody izolacji biokrzemionki	42
2.1.7. Zastosowanie okrzemek w przemyśle	45
2.1.7.1. Zastosowanie okrzemek w biodegradacji zanieczyszczeń środowiska	46
2.1.7.2. Biopaliwa	47

2.1.7.3.	Perspektywy zastosowania okrzemek w nanotechnologii-----	48
2.1.7.3.1.	Filtracja -----	49
2.1.7.3.2.	Biosensory -----	51
2.1.7.3.3.	Kryształy biofotoniczne-----	53
2.1.7.3.4.	Komputery z okrzemek -----	54
2.2.	METODY MODYFIKACJI BIOKRZEMIONKI OKRZEMKOWEJ-----	55
2.3.	"OUTSOURCING" OKRZEMEK W WYTWARZANIU DOMIESZKOWANEJ METALAMI BIOKRZEMIONKI O STRUKTURZE 3D -----	57
2.3.1.	<i>Tytan</i> -----	58
2.3.2.	<i>German</i> -----	64
2.3.3.	<i>Glin</i> -----	68
2.3.4.	<i>Nikiel</i> -----	69
2.3.5.	<i>Europ</i> -----	69
2.3.6.	<i>Wapń</i> -----	70
2.3.7.	<i>Cyrkon i cyna</i> -----	72
2.3.8.	<i>Cynk i żelazo</i> -----	73
3.	CEL PRACY -----	76
4.	CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA -----	79
4.1.	HODOWLA WYBRANEGO GATUNKU OKRZEMEK BEZ DODATKU DO MEDIUM HODOWLANEGO PIERWIASTKÓW MODYFIKUJĄCYCH-----	79
4.1.1.	<i>Badanie kinetyki wzrostu biomasy komórek okrzemek</i> -----	79
4.1.2.	<i>Badanie kinetyki pobierania (absorpcji) przez komórki okrzemek składników odżywczych (Si, N, P) i zmiany wartości pH w medium hodowanym</i> -----	79
4.2.	SYNTEZA KOMPOZYTÓW NA BAZIE OKRZEMEK Z GATUNKU <i>PSEUDOSTAUCOSIRA TRAINORII</i> ---	80
4.2.1.	<i>Synteza kompozytów biokrzemionki okrzemek domieszkowanej tytanem</i> -----	80
4.2.2.	<i>Synteza kompozytów pirolizowanej biomasy okrzemek domieszkowanej tytanem i srebrem w postaci nanoczątek</i> -----	81
4.2.3.	<i>Synteza kompozytów pirolizowanej biomasy okrzemek domieszkowanej nanocząstkami wanadanu neodymu</i> -----	82
4.3.	CHARAKTERYSTYKA UZYSKANYCH KOMPOZYTÓW -----	83

4.3.1.	<i>Metody mikroskopowe</i>	83
4.3.1.1.	Mikroskopia optyczna (LM)	83
4.3.1.2.	Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)	83
4.3.1.3.	Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)	84
4.3.2.	<i>Rentgenowska dyfraktometria proszkowa (XRD)</i>	84
4.3.3.	<i>Potencjał zeta (ζ)</i>	84
4.3.4.	<i>Analiza termogravimetryczna (TG)</i>	85
4.3.5.	<i>Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR)</i>	85
4.3.6.	<i>Fotoluminescencja (PL)</i>	85
4.4.	BADANIA WŁAŚCIWOŚCI ANTYBAKTERYJNYCH	86
4.5.	METABOLICZNE DOMIESZKOWANIE 3D BIOKRZEMIONKI OKRZEMKOWEJ TYTANEM	88
4.5.1.	<i>Wprowadzenie do problematyki badawczej</i>	88
4.5.2.	<i>Wpływ wartości pH, początkowego stężenia Ti i stosunku Ti:Si w medium hodowlanym na absorpcję tytanu przez komórki okrzemek</i>	92
4.5.3.	<i>Kinetyka pobierania (absorpcji) składników (Si, N, P i Ti) przez komórki okrzemek z medium hodowlanego</i>	99
4.5.4.	<i>Analiza zsyntezowanych kompozytów za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej</i>	101
4.5.5.	<i>Analiza zsyntezowanych kompozytów za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej</i>	104
4.5.6.	<i>Widma rentgenowskiej dyfrakcji proszkowej</i>	107
4.5.7.	<i>Pomiary potencjału zeta</i>	109
4.5.8.	<i>Analiza termogravimetryczna</i>	112
4.5.9.	<i>Widma FT-IR</i>	114
4.5.10.	<i>Właściwości fotoluminescencyjne</i>	116
4.6.	KOMPOZYTY PIROIZOWANEJ BIOMASY OKRZEMEK DOMIESZKOWANEJ HETEROEPITAKSJALNIE ROSNĄCYMI NANOCZĄSTKAMI Ag/TiO ₂ : SYNTEZA, CHARAKTERYSTYKA I ZASTOSOWANIE ANTYBAKTERYJNE	119
4.6.1.	<i>Zarys problematyki badawczej</i>	119
4.6.2.	<i>Badania przy użyciu spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energii (EDX)</i>	122

4.6.3.	<i>Badania przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej</i>	123
4.6.4.	<i>Analiza techniką proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej</i>	126
4.6.5.	<i>Badania potencjału zeta</i>	128
4.6.6.	<i>Właściwości fotoluminescencyjne</i>	130
4.6.7.	<i>Właściwości antybakteryjne</i>	133
4.7.	BIOSYNTeza NOWYCH MATERIAŁÓW KOMPOZYTOWYCH (NdVO₄NPS/PIROLIZOWANA BIOMASA OKRZEMKOWA) O LUMINESCENCJI UP-KONWERSYJNEJ	136
4.7.1.	<i>Problematyka badawcza</i>	136
4.7.2.	<i>Badania mikroskopowe</i>	138
4.7.3.	<i>Badania techniką proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej</i>	140
4.7.4.	<i>Analiza termogravimetryczna</i>	141
4.7.5.	<i>Właściwości fotoluminescencyjne</i>	143
5.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI	147
6.	STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	152
6.1.	STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ W JĘZYKU POLSKIM	152
6.2.	STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ W JĘZYKU ANGIELSKIM	155
7.	DOROBEK NAUKOWY	158
7.1.	LISTA PUBLIKACJI	158
7.2.	KONFERENCJE NAUKOWE	159
7.3.	PROJEKTY BADAWCZE	164
7.4.	GRANTY BADAWCZE	164
7.5.	NAGRODY	164
7.6.	WYJAZDY ZAGRANICZNE	165
7.7.	INNE AKTYWNOŚCI NAUKOWE	165
8.	BIBLIOGRAFIA	166

1. WSTĘP

Wzrost tempa, z jakim różnego rodzaju mikro – i nanostruktury zaczęły pojawiać się w procesie tworzenia wszelakich urządzeń dla potrzeb zaawansowanych nowoczesnych technologii jest imponujący. W poszukiwaniu rozwiązania umożliwiającego tworzenie funkcjonalnych, hierarchicznych biokompozytów o zdefiniowanej strukturze 3D, na dużą skalę łatwym procesem i tanim kosztem, człowiek skierował swoją uwagę na zasoby naturalne. Przez miliardy lat ewolucji natura wytworzyła całą gamę funkcjonalnych biologicznych struktur 3D. Szczególnie w mikro- i nanoskali złożoność i funkcjonalność struktur biologicznych jest znacznie większa aniżeli w przypadku równoważnych struktur syntetycznych, co czyni te biologiczne ażurowe struktury odpowiednim substratem (lub inspiracją) dla nowoczesnych technologii. Mikrouządzenia o pożądanej strukturze i właściwościach można zatem otrzymać, wykorzystując mikro- lub nanostruktury biologiczne. W tym aspekcie jednokomórkowe mikroglony, a mianowicie okrzemki wydają się być jednym z najbardziej spektakularnych przykładów, ze względu na ich wybitną zdolność do syntezy amorficznej krzemionki (krzemionkowych egzoszkieleatów) o hierarchicznej, trójwymiarowej strukturze. Niesamowita różnorodność precyzyjnych, trójwymiarowych struktur krzemionkowych z własną, oryginalną, ażurową morfologią jest reprezentowana przez krzemionkowe pancerze (frustule) ponad 100 000 znanych gatunków okrzemek. Te wyjątkowe możliwości okrzemek („mikrotechnologów”) budzą duże zainteresowanie ze względu na perspektywę kontrolowanej biosyntezy trójwymiarowych, uporządkowanych struktur krzemionkowych poprzez hodowlę tych mikroorganizmów w sztucznych, przyjaznych dla środowiska warunkach.

Dodatkowym walorem płynącym z biosyntezy trójwymiarowej biokrzemionki przez okrzemki jest możliwość chemicznej modyfikacji ich krzemionkowych pancerzyków podczas wzrostu komórek ("metaboliczna insercja"). Modyfikacja materiału jest ważnym

podejściem do zmiany właściwości fizykochemicznych lub funkcji krzemionkowych frustul i otwiera duże możliwości syntezy nowych materiałów krzemionkowych. Propozycja włączenia (domieszkowania) metali, zwłaszcza tytanu, wanadu i neodymu, do komórek okrzemek opiera się na dobrze znanej zdolności komórek okrzemek do metabolicznego wprowadzania śladowych ilości domieszek różnych metali do ich krzemionkowych frustul, oraz możliwościach izomorficznego podstawiania krzemu innymi pierwiastkami w strukturze naturalnej krzemionki i minerałów krzemianowych. Wykorzystanie okrzemek do wytwarzania i metabolicznego domieszkowania 3D ustrukturyzowanej biokrzemionki było przez prof. Myroslava Spryńskiego metaforycznie nazwane - "outsourcingiem" okrzemek.

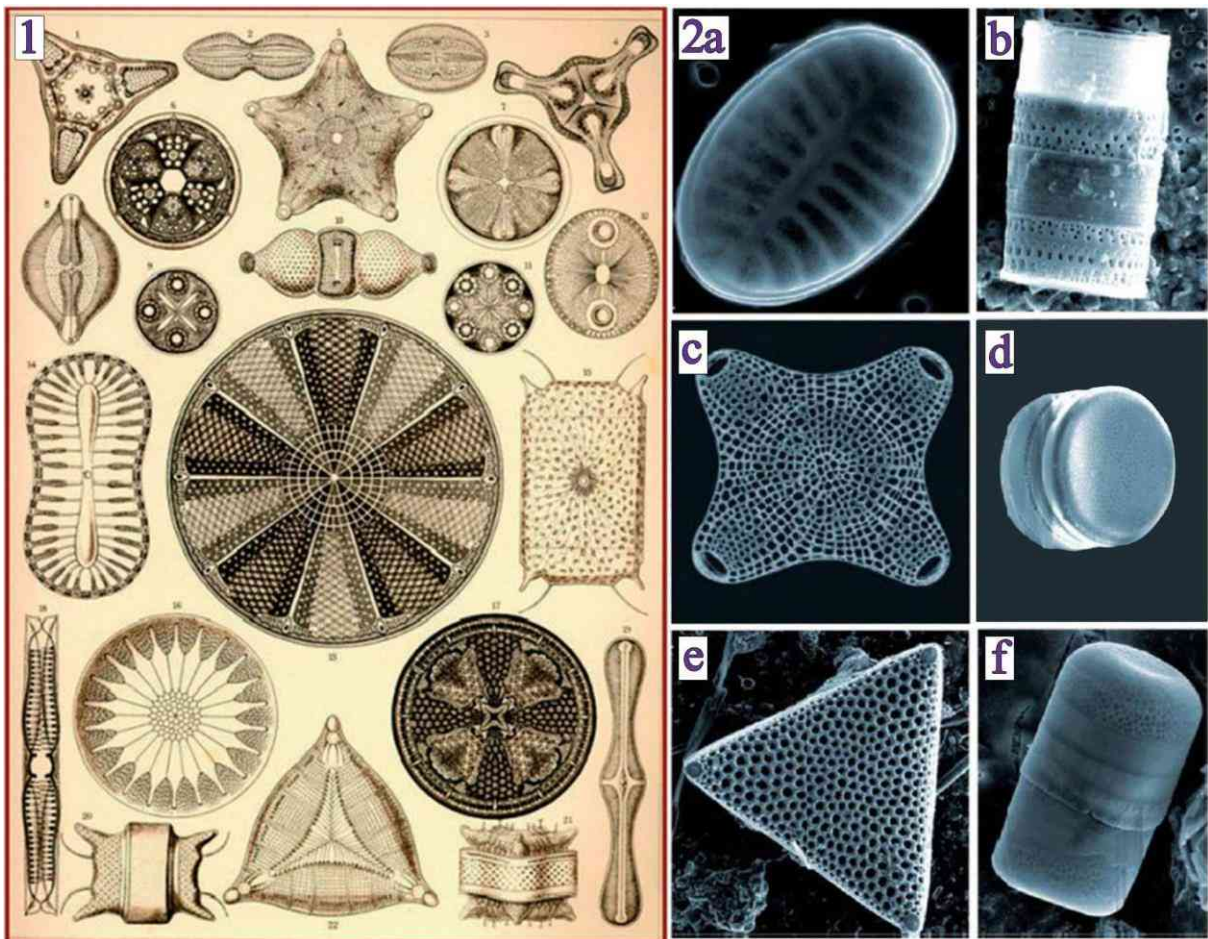
W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono wyniki opracowania oryginalnych metod otrzymywania nowych 3D materiałów krzemionkowych bazując na funkcjonalizacji (domieszkowaniu) wybranymi metalami (Ti, V, Nd, Ag) biokrzemionki okrzemek hodowanych w warunkach laboratoryjnych. W syntezie zaprojektowanych materiałów wykorzystano metodę metabolicznego domieszkowania komórek okrzemek przez wybrane metale (Ti, V, Nd) oraz metodę impregnacji biokrzemionki roztworem soli metali (Ag). Opracowane metody pozwoliły na uzyskanie nowych mikro-nanostrukturyzowanych kompozytów, które łączą w sobie hierarchiczną, uporządkowaną, trójwymiarową strukturę biokrzemionkowych frustul okrzemek z ich unikalnymi właściwościami optycznymi, periodycznym systemem porów, dobrymi właściwościami mechanicznymi i termicznymi, chemiczną obojętnością i kompatybilnością biologiczną oraz specyficzne, funkcjonalne właściwości (katalityczne, optyczne, antybakteryjne) domieszkowanych pierwiastków. W ramach pracy uzyskano trzy rodzaje kompozytów: mikro-nanokompozyty biomasy okrzemek i biokrzemionki domieszkowanych nanocząstkami tytanu (Ti/DB i Ti/DBioSiO₂); kompozyty

pirolizowanej biomasy okrzemek domieszkowanej nanocząstkami dwutlenku tytanu i nanocząstkami metalicznego srebra (AgNPs/TiO₂/DBP i AgNPs/TiO₂/DBP); kompozyty pirolizowanej biomasy okrzemek domieszkowanej nanocząstkami wanadanu neodymu (NdVO₄/DBP). Cechy morfologiczne i strukturalne, skład pierwiastkowy, skład mineralny i strukturę krystaliczną, potencjał zeta, właściwości fotoluminescencyjne, charakter i stabilność termiczną wiązań strukturalnych otrzymanych materiałów oraz specyfikę immobilizacji i dystrybucji pierwiastków domieszkowanych w strukturze zsyntezowanych kompozytów zbadano stosując szereg metod instrumentalnych (LM, SEM, SEM-EDS, TEM, TEM-EDS, XRD, FTIR, TGA, ELS, ICP/MS, spektrofluorometria). Przeprowadzono badania właściwości antybakteryjnych uzyskanych kompozytów (AgNPs/TiO₂/DBP) z wykorzystaniem metod biologicznych, zwłaszcza metody wyznaczenia minimalnego stężenia hamującego (MIC).

2. CZĘŚĆ LITERATUROWA

2.1. Okrzemki – piękno zamknięte w 3-D krzemionkowym pancerzyku

„Pastwiska morskie”[1], „klejnoty morza”, „żywy opał” czy „krzemowe cuda” to tylko niektóre określenia tych jedynych w swoim rodzaju mikroglonów [2]. Okrzemki to jednokomórkowe, eukariotyczne, fotosyntetyzujące glony szeroko rozpowszechnione w środowiskach wodnych [3]. Od momentu pojawienia się (ok. 200 mln lat temu) okrzemki rozwinęły się w największą grupę glonów eukariotycznych, liczącą ok. 100 tys. szacowanych gatunków [4].



Rys. 1. 1 - ilustracja okrzemek słynnego niemieckiego biologa Ernsta Haeckela; 2 - SEM pancerzyków okrzemek specyficznych dla danego gatunku (a–f); słupki skali: 10 μm [5]

Fakt, że charakteryzują się one aktywnością fotosyntetyczną prawie taką samą jak wszystkie lasy deszczowe razem wzięte oraz że wytwarzają prawie 20% całkowitego

tlenu i 40% rocznej produkcji węgla w oceanie, ilustruje ich ogromne znaczenie ekologiczne [6]. Ich wyjątkową cechą jest także to, że syntezują i zamykają się w wysoce uporządkowanej, trójwymiarowej, porowatej ścianie komórkowej, zwanej pancerzykiem lub frustulą (od angielskiego terminu *frustule*) (Rys. 1), zbudowanej z amorficznej krzemionki oraz posiadającej dwie okrywy, które łączą się ze sobą niczym wieczko z denkiem, przypominając szalkę Petriego [7]. Od tej cechy pochodzi angielska nazwa tych unikatowych mikroglonów: *diatoms*, utworzona od greckich słów *dia* ‘przez’ i *temnein* ‘przeciąć na pół’ [8].

2.1.1. Systematyka

W tradycyjnym podziale opartym na morfologii okrzemki dzielą się na dwie grupy. Centriceae (obecnie nazywane Biddulphiales), które mają prążki zastawkowe ułożone względem punktu, pierścienia lub centralnej otoczki i wydają się promieniście symetryczne, oraz Pennateae (obecnie nazywane Bacillariales), które mają prążki zastawkowe ułożone względem linii i wydają się dwustronnie symetryczne. Podział ten jest jednak podziałem sztucznym, który nie posiada odzwierciedlenia w danych molekularnych. Pomimo ponad stu lat obserwacji morfologicznych i prawie trzech dekad molekularnych analiz filogenetycznych, badania nad filogenezą okrzemek postępowały powoli i w większości były kontrowersyjne [9]. Medlin i wsp. [10] stworzyli pierwszą filogenezę okrzemek z wykorzystaniem danych molekularnych i zasugerowali, że okrzemki centryczne i pierzaste okrzemki nie posiadające szczeliny nie są monofiletyczne. W oparciu o prawie 20-letnie niedopasowanie klasyfikacji molekularnej i morfologicznej, Medlin & Kaczmarska [11] zrewidowały system klasyfikacji okrzemek, tworząc dwa nowe podtypy, Coscinodiscophytina: z promienistymi centrami w zmienionej Coscinodiscophyceae, oraz Bacillariophytina z dwoma klasami: okrzemki pierzaste w zmienionej Bacillariophyceae i dwubiegunowe centra w nowej klasie -

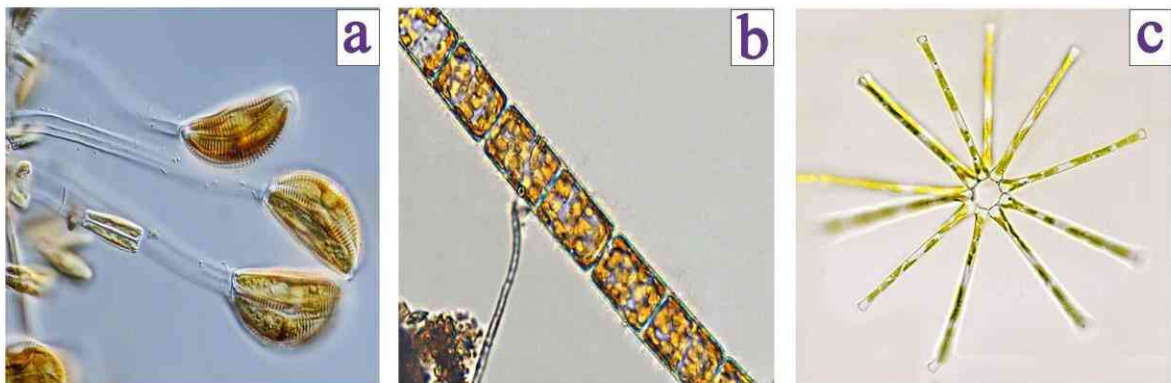
Mediophyceae. Te trzy klasy ((Coccinodiscophyceae = radialne centryczne okrzemki) (Mediophyceae = polarne centryczne okrzemki + radialne Thalassiosirales; Bacillariophyceae = pierzaste okrzemki)) dokładniej odzwierciedlają ewolucję i różnorodność okrzemek niż trójklasowy system okrzemek centrycznych oraz okrzemek pierzastych zawierających i niezawierających podłużnej szczeliny w ścianie komórkowej przedstawiony w pracy Rounda i wsp. [12].

2.1.2. Rodzaje i warunki życia okrzemek

Okrzemki to organizmy charakteryzujące się niesamowitym zróżnicowaniem w przystosowaniu do warunków panujących w danym środowisku. Występują w prawie wszystkich ekosystemach wodnych oraz w wilgotnych siedliskach np. na skałach, w glebie czy wśród mchów. Okrzemki żyją zarówno w wodach czystych jak i zanieczyszczonych. Mogą zasiedlać kanały ściekowe, w których często nie obserwujemy nawet makroorganizmów. Obecność tych jednokomórkowych alg odnotowano także na pustyniach, gdzie występują mgły np. na pustyni Namib w południowo-zachodniej Afryce [14]. Okrzemki potrafią przeczekać niekorzystne warunki takie jak niedotlenienie, wysychanie lub zupełny brak tlenu przez okres nawet kilku dziesięcioleci na dnie zbiornika wodnego pod postacią osadu lub w postaci komórek przetrwalnikowych. Warto wspomnieć o tym, iż osady szlamu okrzemkowego zostały po raz pierwszy zebrane przez chiński statek badawczy na głębokości 7000 m w Rowie Mariańskim [15]. Występowanie okrzemek w tak odmiennych i zróżnicowanych obszarach świadczy o ich ogromnych zdolnościach adaptacyjnych w stosunku do czynników środowiskowych. W celu przystosowania się do różnych środowisk, organizmy te cechują się niesamowitą elastycznością. Mogą one zmieniać swoje cechy fizjologiczne i morfologiczne w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne, takie jak temperatura, zaopatrzenie w zasoby, światło, pH i zasolenie, co pokrywa się z ich

globalnym rozmieszczeniem. Reakcją na wymienione czynniki są zmiany dotyczące objętości komórek czy układu oraz rozmiaru porów [16].

Wyjątkowe zdolności do przystosowania się do panujących warunków pozwoliły tym jednokomórkowym organizmom żyć zarówno na dnie zbiorników wodnych, tworząc zbiorowiska zwane bentosem, jak i na powierzchni wody tworząc plankton. Żyjące w toni wodnej okrzemki planktonowe wytworzyły cechy umożliwiające im unoszenie się na powierzchni wody, w celu poprawy dostępu do promieniowania słonecznego. Umiejętność tę wykształciły tworząc komórki o małych rozmiarach, charakteryzujące się niskim skrzemieniem ścian. Dodatkowo, zdolność do magazynowania tłuszczów oraz obecność wodniczek tętniących, które stanowią podstawę regulacji objętości wody w komórce pomaga biomasie unosić się na wodzie. Innym sposobem zapewniającym okrzemkom unoszenie się na powierzchni wody jest tworzenie kolonii, powodując zwiększenie ich powierzchni a tym samym zapewniając odpowiednią wyporność [14,17]. Różnorodne formy tworzone przez okrzemki przedstawiono na rysunku (Rys. 2).



Rys. 2. Różnorodne formy tworzone przez okrzemki; A) *Cymbella* sp. przymocowana do podłoża za pomocą łodyżki śluzu; B) *Melosira varians*, kolonia komórek połączonych ze sobą i przymocowanych do podłoża za pomocą osłonek śluzu; C) Gwiazdna kolonia *Asterionella formosa*

Utworzone kolonie mogą być ze sobą połączone za pomocą śluzu lub chitynowych nici. Wydzielany przez okrzemki śluz może również służyć do wytworzenia otoczki

śluzowej, która ułatwia poruszanie się w toni wodnej [18]. W celu usprawnienia procesu poruszania się okrzemki wytworzyły takie struktury jak wyrostki i szczecinki, które zwiększają powierzchnię pławną. Żyjące w morzach czy jeziorach okrzemki planktonowe tworzą ogromne kolonie, które mogą przyczyniać się do wyjąławiania wody z krzemionki, która jest niezbędnym materiałem budulcowym ich pancerzyków. Na deficyty krzemionki okrzemki reagują tworzeniem cienkich ścian komórkowych [17]. Z kolei okrzemki bentosowe mają pancerzyki zdecydowanie grubsze od okrzemek planktonowych. W bentosie dominują gatunki z grupy okrzemek pierzastych, które mogą przyczepiać się do podłoża lub roślin za pomocą posiadanej szczeliny (np. *Amphora*), galaretowatych rurek (np. *Cymbella*) lub galaretowatych stylików (np. *Didymosphenia*) [17,18].

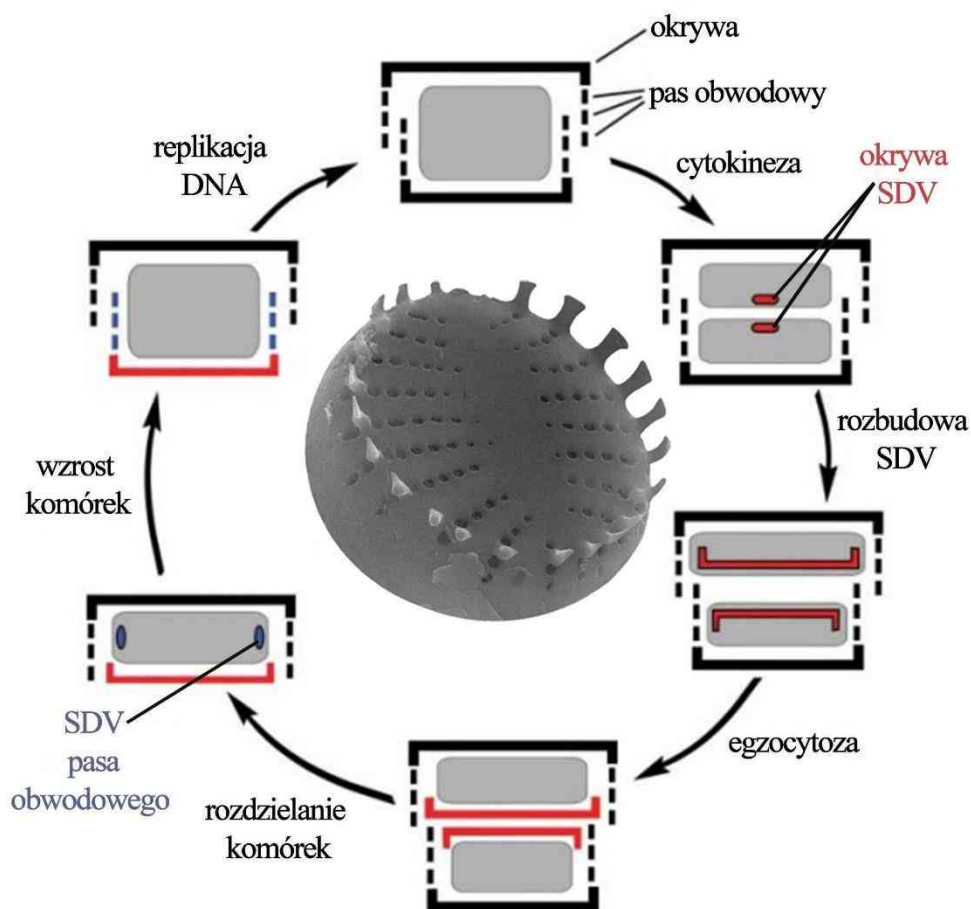
2.1.3. Cykl komórkowy

Okrzemki należą do organizmów posiadających zdolność rozmnażania płciowego i bezpłciowego. Umiejętność ta jest jednym z przystosowań organizmów do zmieniających się warunków środowiskowych. Rozmnażanie wegetatywne u okrzemek jest ściśle związane z ich główną cechą charakterystyczną, czyli ścianą komórkową (Rys. 3). Ten krzemionkowy pancerzyk, składa się z dwóch nierównych połówek: większego *epivalve* (gr. *epitheca*) i mniejszego *hypoalve* (gr. *hypotheca*), które pasują do siebie jak wieczko do pudełka i są utrzymywane razem przez krzemionkowe struktury, zwane pasami obwodowymi [12]. Już ponad 100 lat temu badania mitozy okrzemek przeprowadzone za pomocą mikroskopii świetlnej przez Lauterborna (1897 r.) ujawniły, że podział komórek w okrzemkach wykazuje znaczne różnice w porównaniu z klasycznymi paradygmatami komórek zwierzęcych i roślinnych [19]. Badania wewnętrznych struktur komórek okrzemek przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykazały, że okrzemki mają unikalne cechy ultrastrukturalne i

cytologiczne, co sugeruje istnienie specyficznych cech istotnych dla podziału komórek [20].

Wśród gatunków okrzemek istnieją znaczne różnice w liczbie chloroplastów przypadających na jedną komórkę, dzieląc tym samym okrzemki na pięć różnych grup, w których wyróżniamy: gatunki monoplastydowe, diplastydowe, tetraplastydowe, oligoplastydowe i polioplastydowe. We wszystkich gatunkach z wyjątkiem polioplastydów ruch, podział i rozwój chloroplastów są ściśle powiązane z postępowaniem cyklu komórkowego [21–23]. Prawdopodobnie przyczynia się to do równego rozkładu potomnych chloroplastów po obu stronach przyszłej płaszczyzny podziału. Obserwacje cytologiczne i analiza transkrypcyjna zsynchronizowanych kultur wykazały, że podział chloroplastów poprzedza podział jądrowy i komórkowy u okrzemek pierzastych *Seminavis robusta* [22] i *Phaeodactylum tricornutum* [23]. Jednak molekularne mechanizmy ruchu i podziału chloroplastów w okrzemkach nadal pozostają niejasne. Wykazano, że w roślinach, algach czerwonych *Cyanidioschyzon merolae* i okrzemkach zawierających więcej niż dwa chloroplasty ruch chloroplastów jest zależny od aktyny [24–26]. Indukcja transkrypcyjna β -tubuliny w *S. robusta* podczas segregacji i reorganizacji chloroplastów sugeruje udział mikrotubul, ale nie wyklucza udziału aktyny w tym procesie. [22]. Komórki okrzemkowe zazwyczaj posiadają jedno centrum mikrotubul (ang. *microtubule center*, MC). Jest nim gęste, kuliste ciało umieszczone obok jądra międzyfazowego, z którego promieniują mikrotubule. Okrzemkowe MC przypomina centrum organizacji mikrotubul (ang. *microtubule-organizing center*, MTOC) komórek zwierzęcych, zwane centrosomem, [27] ale bez centrioli [20,28]. Poza różnicami strukturalnymi okrzemkowe centrum mikrotubul zachowuje się inaczej w trakcie cyklu komórkowego. Podczas gdy centrosomy zwierzęce powielają się przed mitozą i dają początek biegunom wrzeciona [29], MC okrzemek bierze udział w początkowej fazie tworzenia wrzeciona, po czym

rozpada się. W czasie mitozy okrzemek pojawiają się nowe, funkcjonalne MTOC, określane jako kompleksy polarne (ang. *polar complex*, PC), które zakrywają bieguny wrzeciona okrzemkowego. PC znikają podczas cytokinezy, gdy powstaje nowy MC [19,28]. Ponadto mitozą okrzemek obejmuje działanie niezwykle, wysoce zorganizowanego „centralnego wrzeciona”, które początkowo tworzy się poza jądrem i składa się z równoległych mikrotubul ułożonych jako dwa przeplatane półwrzeciona, tworząc centralny obszar nakładania się mikrotubul [28,30,31].



Rys. 3. Cykl komórkowy okrzemek [34].

Wrzeciono okrzemki jest otoczone gęstą matrycą, „kołnierzem”, która ma pomóc przyczepić wrzeciono do nietypowego typu „domniemanych kinetochorów”, czyli miejsc przyczepu chromosomu [30]. Obserwacje te różnią się od tego, co jest znane u zwierząt

i roślin, dlatego okrzemki wydają się przechodzić podziały komórkowe w dość wyjątkowy sposób [20]. Oprócz organizacji wrzeciona, cytokineza okrzemek różni się również od cytokinezy zwierząt i roślin: podczas gdy komórki roślinne budują nową błonę komórkową i ścianę komórkową odśrodkowo (na lewą stronę, na zewnątrz), komórki okrzemek najpierw dzielą się dośrodkowo (na zewnątrz do wewnątrz) przez wgłębienie ich błony plazmatycznej (jak komórki zwierzęce), a następnie tworzą odśrodkowo, wewnątrz pęcherzyka osadzania krzemionki (ang. *silica deposition vesicle*, SDV), nową hipozastawkę. Podczas tego procesu nowy MC jest umieszczony w sąsiedztwie SDV, co sugeruje jego istotną rolę podczas syntezy zastawki [32,33]. Kiedy nowa hipozastawka jest w pełni wykształcona w SDV, jest wydzielana z komórki przez egzocytozę, po czym komórki potomne mogą się rozdzielić. Wieczko i denko u dojrzałej komórki potomnej nie są ze sobą zrośnięte, lecz połączone za pomocą pasa obwodowego. Czas syntezy tego pasa jest charakterystyczny dla poszczególnych gatunków okrzemek. U niektórych gatunków synteza pasa obwodowego odbywa się po utworzeniu „zastawki”, ale jeszcze przed separacją komórek. Z kolei u innych gatunków najpierw zachodzi separacja komórek, a dopiero potem tworzony jest pas obwodowy. Rozwój i rozbudowa komórek zachodzą podczas syntezy pasa obwodowego. Proces ten jest również zależny od długości cyklu komórkowego wybranych gatunków. U niektórych gatunków rozbudowa występuje równolegle z tworzeniem pasa obwodowego, natomiast u innych jest kontynuowana po wytworzeniu tej specyficznej obręczy [35].

Sezonowa dominacja okrzemek w zbiorowiskach fitoplanktonu ekosystemów morskich i słodkowodnych sugeruje, że posiadają one wydajne mechanizmy wykrywania i sygnalizacji, które pozwalają im odpowiednio reagować lub dostosowywać się do wahań środowiskowych, takich jak natężenie światła i dostarczanie składników

odżywczych. Odbywa się to poprzez aktywację określonych punktów kontrolnych cyklu komórkowego [36,37]. Dostępność krzemu w otoczeniu komórki okrzemki ma duży wpływ na tempo zachodzenia cyklu komórkowego. Ograniczona dostępność tego surowca wydłuża cały cykl komórkowy, poprzez rozciągnięcie każdej z faz w czasie. Brak krzemu w środowisku może doprowadzić do całkowitego wstrzymania podziału. Zatrzymanie cyklu komórkowego w trakcie konkretnej fazy jest elementem różnicującym poszczególne gatunki okrzemek. Pauza ta zazwyczaj występuje w trakcie fazy G1 lub fazy G2 (faz wzrostowych komórki) oraz bezpośrednio przed fazą syntezy DNA (G1/S). Gdy w środowisku pojawi się krzem następuje wznowienie cyklu w sposób zsynchronizowany, dzięki czemu wszelkie braki w postaci białek, mRNA czy związków strukturalnych, niezbędnych do progresji cyklu są uzupełniane [38].

2.1.3.1. Biomineralizacja

Krzemionkowe pancerzyki okrzemek tworzone są w procesie biomineralizacji, podczas wegetatywnej fazy wzrostu. Proces biomineralizacji zachodzi w warunkach fizjologicznych, w temperaturze: 0-36°C, przy obojętnym pH oraz ciśnieniu otoczenia [39]. Zdolność do tworzenia krzemionkowych ścian komórkowych u alg odnotowano już u chryzofitów i sunurofitów, u których ściana miała postać krzemionkowych łusek. Tworzenie wzorów i struktur frustul jest jednym z najbardziej intrygujących aspektów krzemionkowania u okrzemek. U okrzemek centrycznych tworzenie zaworów w SDV rozpoczyna się w miejscu krzemionkowania pierwotnego (ang. *primary silicification site*, PSS). Miejsce to nazywane jest również centrum wzoru i stanowi punkt centralny, z którego rozchodzą się wzory morfologiczne [40]. Następny etap, ekspansja, jest wspólny dla wszystkich gatunków centrycznych. Na przykład u *Thalassiosira pseudonana* i *Ditylum brightwellii*, które wytwarzają bardzo wyraźne zastawki, podobnie rozgałęziające się żebra rozchodzą się promieniście od PSS. Przestrzeń pomiędzy tymi

żebrami wypełnia się w miarę ich rozszerzania, pozostawiając szczeliny dla porów w skali nano [7,41,42]. Szczegółowa analiza półproduktów tworzenia zastawek w *T. pseudonana* przy użyciu SEM (skaningowej mikroskopii elektronowej, ang. *scanning electron microscopy*) ujawniła, że nanoskalowa morfologia krzemionki osadzonej między żebrami i wokół porów ma charakter rozgałęziony, idealny do efektywnego wypełnienia przestrzeni. Otwory porowe w *T. pseudonana* były początkowo nieregularne, ale ostatecznie stały się gładkie, gdy rozgałęziona krzemionka wypełniła się wokół nich [43]. Te wczesne etapy formowania zastawek definiują "warstwę bazową" zastawek, która istnieje głównie w płaszczyźnie X/Y. Po utworzeniu warstwy podstawowej, krzemionka odkłada się w płaszczyźnie Z na dystalnej powierzchni zastawki, tworząc wzorzyste struktury [40,43]. Morfologia krzemionki na powierzchni dystalnej jest zwykle bardzo zróżnicowana w porównaniu do warstwy bazowej. U *T. pseudonana* powierzchnia dystalna jest ozdobiona kulistymi cząstkami krzemionki [43]. Podobne procesy zachodzą również w tworzeniu zastawek okrzemek pierzastych, choć w przypadku okrzemek pierzastych posiadających szczelinę (rafę), centralny guzek osadzonej krzemionki służy jako centrum wzoru, z którego rozszerza się rafa, a żebra następnie rozciągają się prostopadle do niej [40]. W ekspansji rafy biorą udział elementy cytoszkieletu, szczególnie mikrotubule [19,44,45]. W rzeczywistości centrum organizacyjne mikrotubul znajduje się w sąsiedztwie guzka centralnego, a mikrotubule rozciągają się od niego na całej długości rafy. Udokumentowano, że u okrzemek pierzastych najpierw powstaje SDV, a następnie wiąże się z nim MC [40]. Mikrotubule umożliwiają dalekosiężną kontrolę nad procesem rozszerzania SDV, co pozwala na precyzyjne pozycjonowanie. Badanie tworzenia się struktury w okrzemkach centrycznych i pierzastych wskazuje, że w procesie tym zaangażowane są trzy różne skale. Polimeryzacja krzemionki z rozpuszczalnych prekursorów tworzy strukturę

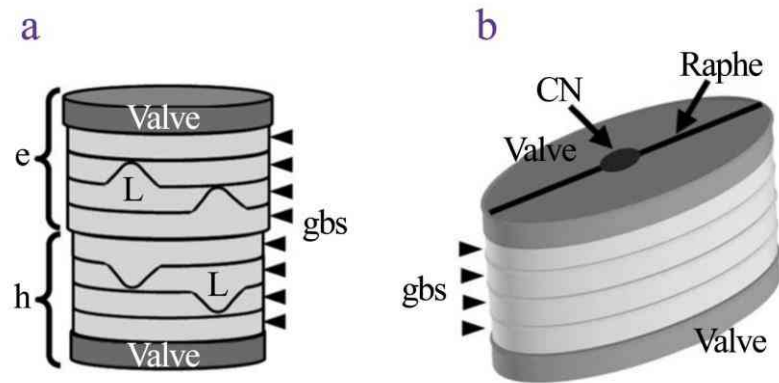
w nanoskali. Przekroje i obrazowanie (ang. *atomic force microscope*, AFM) ujawniają, że rzeczywista nanoskalowa struktura krzemionki okrzemek jest amalgamatem połączonych cząstek krzemionki [3,46]. U różnych badanych gatunków wielkość cząstek krzemionki mieści się w zakresie 20-200 nm. Mikroskalowa struktura zastawki, określająca jej ogólny rozmiar i kształt, jest podyktowana ekspansją SDV i elementów cytoszkieletu, które kontrolują ten proces. Struktury mezoskalowe są pośredniej wielkości. Obejmują one żebra i większe pory, a procesy ich powstawania są najslabiej poznane, choć za ich powstawanie prawdopodobnie odpowiadają aktywny i matryce organiczne.

2.1.4. Funkcja, struktura i morfologia pancerzyków krzemionkowych

Okrzemki to mikroorganizmy, charakteryzujące się najczęściej dwoma rodzajami przyjmowanej struktury. Pierwsza z nich to taka, w której komórki przyjmują symetrię obrotową, natomiast w drugim rodzaju występującej struktury, komórki cechuje symetria obustronna. Centrales wykazują symetrię względem własnej osi i przyjmują zazwyczaj formę okrągłą. Pennales cechuje forma wydłużona, a wykazywana przez nich symetria jest obustronna lub w niektórych przypadkach spiralna. Według doniesień szeregu badaczy, pierwsze powstały okrzemki centryczne które zidentyfikowano w środowisku wodnym. Z perspektywy ewolucyjnej mogły one ewoluować w okrzemki pierzaste [18,38].

Krzemionkowe pancerzyki okrzemek tworzą dwie zachodzące na siebie części, które przypominają nałożone na siebie dwie szalki Petriego. Epitheca to górna część nazywana również wieczkiem, natomiast hypotheca to dolna część stanowiąca denko krzemionkowego pancerzyka. Wieczko i denko nie są ze sobą zrosnięte, a jedynie szczelnie na siebie zachodzą. Posiadają górną warstwę, powierzchnię zwaną okrywą

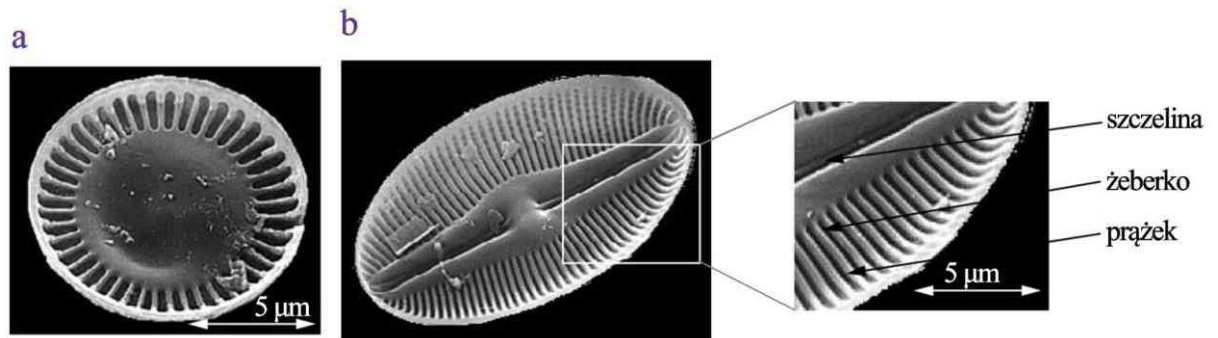
(valve). Dodatkowo w budowie pancerzyka możemy wyróżnić pas obwodowy będący zespołem obręczy (ang. *girdle bands*, gbs), składający się z cienkich warstw krzemionki. Ponadto, pas obwodowy zawiera wstawki przylegające do okrywy (valvocopula) i wstawki łączące (pleura). Za pas obwodowy przyjmuje się przestrzeń znajdującą się między wieczkiem a denkiem (Rys. 4).



Rys. 4. Schemat budowy krzemionkowego pancerzyka okrzemek; a) Centrales - górna powierzchnia wieczka (e - epitheca) i denka (h - hypotheca) to okrywa, zaznaczona ciemnoszarym kolorem (valve); strzałkami oznaczone są poszczególne obręcze (gbs) pasa obwodowego; b) Pennales – oznaczenie podstawowych składowych pancerzyka jest analogiczne jak w przypadku okrzemka centrycznego (a); u Pennales możliwe jest dodatkowo wyznaczenie raphe, czyli szczeliny przebiegającej przez środek denka i wieczka (albo tylko jednego z nich) oraz centralnego guzka (CN) [38].

Zależnie od kąta patrzenia na komórkę okrzemki, przybiera ona różne kształty [38]. Pancerzyk okrzemek składa się z charakterystycznych elementów strukturalnych (tworzących ornamentację pancerzyka), podłużnych (apikalnych) i poprzecznych (transapikalnych), których rozmieszczenie jest specyficzne dla poszczególnych taksonów. Ornamentacja oraz rozmiary okrzemek są podstawą identyfikacji poszczególnych gatunków, która bazujące na elementach morfologicznych (Rys. 5). Występowanie rafy umożliwia kontakt protoplastu ze środowiskiem zewnętrznym, a znajdujący się w jego centrum guzek pełni funkcję wydzielniczą. Wewnątrzkomórkowy układ włókien aktynowo-miozynowych, poprzez interakcję z wytwarzanym śluzem,

umożliwia komórce poruszanie się w wodzie i na przedmiotach zanurzonych. Odmienna budowa szczeliny może stanowić istotny element przy identyfikacji okrzemek, szczególnie w przypadku, kiedy pozornie dane gatunki wyglądają podobnie [17].



Rys. 5. Zdjęcia SEM ukazujące morfologię przedstawicieli okrzemek centrycznych (*Cyclotella* sp.) (a) oraz pierzastych (*Diploneis* sp.) (b) [35]

Ornamentacja okrzemek możliwa jest do zaobserwowania pod mikroskopem świetlnym. Przyjmuje ona kształt charakterystycznych prążków czy żeberk widocznych na obu stronach okrywy. Bardziej zaawansowaną analizę morfologii okrzemek umożliwia skaningowa mikroskopia elektronowa. Za pomocą mikroskopu elektronowego można zobaczyć (w obszarze pojedynczego prążka), koliste lub wieloboczne struktury zwane areolami, które przechodzą przez pokrywę. Areola zwykle jest pokrywą delikatnie ornamentowaną, cienką krzemionkową błoną – cribrum lub welum. Wewnętrzna strona okrywy zawiera swego rodzaju żeberka i wstawki, których zadaniem jest wzmocnienie struktury pancerzyka [17,35]. Wszystkie elementy składające się na budowę pancerzyka okrzemek są charakterystyczne dla danego gatunku. Przy dokonywaniu klasyfikacji okrzemek do poszczególnych gatunków brane są pod uwagę następujące jego cechy: kształt, długość i szerokość okrywy wraz z jej zakończeniem, ilość prążków, żeberk na jednostkę długości (zazwyczaj na 10 µm), budowę szczeliny oraz wewnętrzną okrywę pozbawioną prążków. Zaawansowana analiza wyszczególnionych cech morfologicznych

możliwa jest do przeprowadzenia w momencie usunięcia części organicznej z komórki okrzemki [35].

Pancerzykom okrzemek przypisuje się wiele funkcji, wśród których wymienić można np.: zapewnienie okrzemkom odporności mechanicznej, funkcję ochronną przed wirusami, umożliwienie absorpcji promieniowania słonecznego, co w konsekwencji pozwala okrzemkom przeprowadzać proces fotosyntezy. Dodatkowo pancerzyk okrzemek może zapobiegać dostawaniu się szkodliwego promieniowania ultrafioletowego i światła niebieskiego powodującego stres tlenowy w aparacie fotosyntetycznym oraz może wykazywać właściwości soczewki. Funkcja ta jest niezwykle istotna, ponieważ dzięki skupieniu światła wewnątrz cytoplazmy, możliwe jest przemieszczanie się chloroplastów [35].

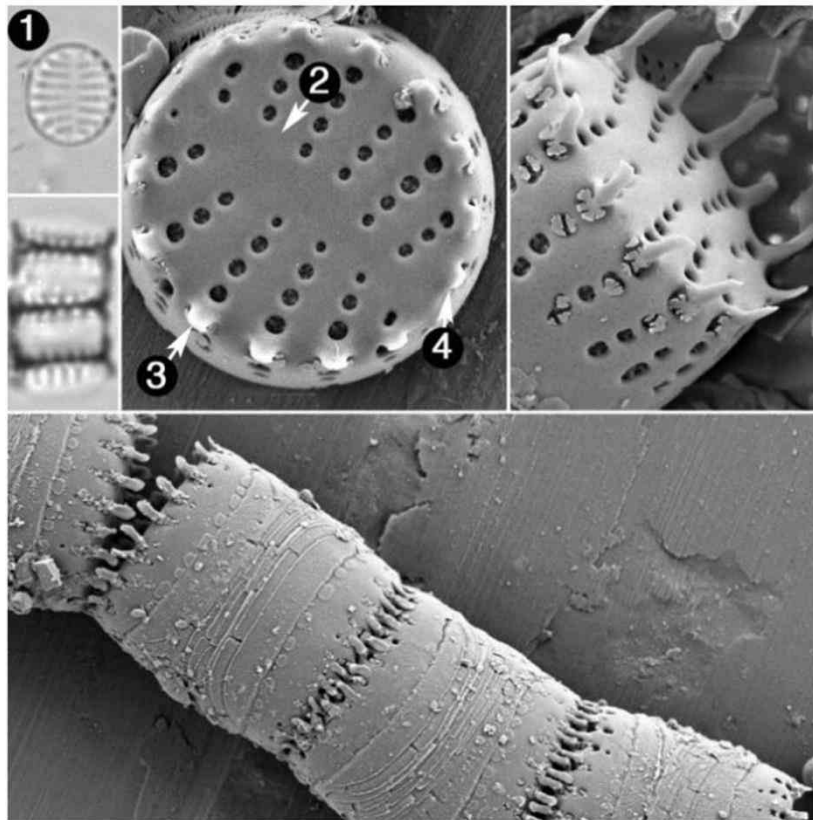
Należy zwrócić szczególną uwagę na to, że parametry takie jak temperatura oraz pH wywierają istotny wpływ na proces tworzenia się pancerzyka. Prowadzenie hodowli w obrębie jednego szczepu w różnych warunkach temperatury i wartości pH całego układu, może doprowadzić do zmian w morfologii pancerzyków [35,47].

2.1.5. Charakterystyka wybranego gatunku okrzemek

2.1.5.1. *Pseudostaurosira trainorii* E. A. Morales

Pseudostaurosira trainorii jest gatunkiem, który po raz pierwszy został scharakteryzowany morfologicznie przez Eduardo A. Moralesa [48,49]. Takson ten był powszechnie podawany jako *Staurosira elliptica*, jednakże wynikało to z błędnej identyfikacji przez wcześniejszych badaczy oraz niewystarczających danych morfologicznych, które w późniejszym czasie dały podstawę wydzielenia nowego rodzaju *Pseudostaurosira*. Dokonując analizy komórek okrzemek opisywanego gatunku

z perspektywy pasa obwodowego, można zauważyć, że charakteryzują się one prostokątnym kształtem i mogą tworzyć kolonie przyjmujące postać wstęgi, gdzie każda następna komórka łączy się ze sobą za pomocą kolców. *Pseudostaurosira trainorii* posiada okrywy charakteryzujące się okrągłym lub lekko eliptycznym kształtem. Przednia część okrywy jest płaska lub lekko pofalowana, co uwarunkowane jest przez występowanie wystających żeberek. Ponadto, jest ona połączona z płaszczem okrywy pod kątem ostrym.



Rys. 6. Mikrofotografia SEM okrzemek z gatunku *Pseudostaurosira trainorii*: kształt okrywy od owalnej do lekko eliptycznej (1), powierzchnia osiowa lancetowata do liniowej (2), kolce lite (3), kolce rozmieszczone wzdłuż prążków (4)[50]

Powierzchnia między krawędzią okrywy a centralną częścią komórki/pancerzyka jest uwypuklona. *P. trainorii* posiada wyraźne, naprzemienne prążki, składające się z okrągłych areol, których rozmiar zmniejsza się od krawędzi okrywy do sternum (pseudorafy), czyli zgrubienia okrywy o orientacji podłużnej (apikalnej). Areolami

określa się otwory w ścianie komórkowej okrzemki o przekroju kolistym, które zazwyczaj są zamknięte od zewnątrz za pomocą delikatnie ornamentowanej błony składającej się z SiO₂. Następnym elementem, który zaliczyć można do elementów budowy pancerzyka okrzemek są kolce. Posiadają łyżeczkowaty kształt, są dość masywne, mają ząbkowany brzeg i klapki u podstawy, które zakrywają otwory sąsiadujących areol. Kolce znajdują się w obrębie prążków (w ich wnętrzu) na styku powierzchni okrywy oraz na jej krawędziach. W budowie nie obserwuje się występowania wyrostka (rimoportula). Pory ułożone są w pozycji transapikalnej, a apikalne pory są zazwyczaj nieobecne lub ich ilość jest mocno zredukowana (Rys. 6) [50].

2.1.6. Hodowla okrzemek

2.1.6.1. Warunki fizyczne i chemiczne

Najważniejszymi parametrami regulującymi wzrost i prawidłowy rozwój okrzemek są: ilość i jakość komponentów odżywczych, pH, światło, zasolenie, temperatura oraz napowietrzenie, które pozwala utrzymać “hodowlę w ciągłym ruchu” (Tab. 1.) [51].

Okrzemki są głównie klasyfikowane jako algi fotosyntetyzujące. Oznacza to, że asymilują one węgiel nieorganiczny przy użyciu światła a następnie, poprzez szereg procesów, przetwarzają go na materię organiczną. Istnieje kilka gatunków, które mogą wykorzystywać związki organiczne jako składniki odżywcze bez użycia światła. Ten typ hodowli, w którym światło nie jest istotnym czynnikiem wzrostu glonów, nazywany jest heterotroficznym. Hodowla ta jest bardzo korzystna dla masowej produkcji alg, ponieważ eliminuje potrzebę dostępu do światła. Służy ona namnażaniu komórek okrzemek, które później wykorzystywane są w procesach fermentacyjnych.

Tab. 1. Uogólniony zestaw warunków hodowlanych dla okrzemek [51].

Parametry	Zakres	Optimum
Temperatura [°C]	16-27	18-24
Zasolenie [g/L]	12-40	20-24
Intensywność światła [lux]	8,5-85,0*	21,3-42,5
Naświetlanie [h:h]	-	16:8 (minimum) 24:0 (maksimum)
pH	7,0-9,0	8,2-8,7

*wartość zależna od objętości fotobioreaktora oraz gęstości komórek okrzemek

Dla przykładu: gatunek *Nitzschia inconspicua* hodowany w obecności glukozy lub octanu może osiągnąć większe zagęszczenie niż podczas hodowli fotoautotroficznej, czyli z dostępem do światła, co może stanowić idealne rozwiązanie w sytuacji zwiększenia produkcji interesującego metabolitu [51].

2.1.6.1.1. Medium hodowlane

Związkami chemicznymi niezbędnymi do prawidłowego wzrostu okrzemek są azot, krzem, fosfor (określane mianem makroelementów), a także pierwiastki w ilości śladowej (tzw. mikroelementy), w tym różne metale, zwłaszcza żelazo w formie rozpuszczalnej (Tab. 2.). Wymienione elementy zaliczyć można do grupy pierwiastków biogennych, które wchodzą w skład organizmów roślinnych i zwierzęcych i są warunkiem życia. Dodatkowo są także materiałem budulcowym oraz stanowią składową enzymów kontrolujących procesy metaboliczne w organizmie, a także regulują równowagę jonową. Do niezbędnych witamin natomiast należą tiamina (B1), biotyna (B7, H) oraz cyjanokobalamina (B12). Do wykorzystywanych pożywek stosowanych

przy hodowli okrzemek zaliczyć można: Walne, Provasoli czy F/2. W celu zwiększenia produktywności hodowli możliwe jest modyfikowanie składu pożywki hodowlanej o naturalne krzemiany z metalami alkalicznymi [51,52]. Skuteczna hodowla okrzemek na dużą skalę wymaga wykorzystania wody morskiej jako medium i uzupełnienie jej o konieczne składniki odżywcze.

Tab. 2. Skład chemiczny najpopularniejszego z medium hodowlanego F/2 Guillarda

Roztwór (1 L)		Składnik	Masa
A	roztwór podstawowy azotanów i fosforanów	NaNO ₃	84,15 g
		Na ₂ HPO ₄ ×H ₂ O	6,0 g
B	roztwór podstawowy krzemu	Na ₂ SiO ₃ ×9H ₂ O	33,0 g
C	roztwór podstawowy metali śladowych	CuSO ₄ ×5H ₂ O	1,96 g
		ZnSO ₄ ×7H ₂ O	4,40 g
		NaMoO ₄ ×2H ₂ O	1,26 g
		MnCl ₂ ×4H ₂ O	36,0 g
		CoCl ₂ ×6H ₂ O	2,0 g
D	roztwór podstawowy witamin	FeCl ₃ ×6H ₂ O	2,90 g
		Na ₂ EDTA×2H ₂ O	10,0 g
		witamina B ₁	0,4 g
		witamina B ₁₂	0,002 mg
		biotyna	0,10 mg

Azot uważany jest za jeden z najważniejszych pierwiastków mających wpływ na produktywność hodowli. Okrzemki są w stanie wykorzystywać azotany, azotyny i amoniak jako źródła azotu. W pracy Chelf i wsp. [53] wykazano, iż ilość azotu jest zmienną, która ma największy wpływ na syntezę obojętnych lipidów oraz ich akumulację w AFDW (suchej wadze bezpopiołowej, ang. *ash-free dry weigh*) u *Navicula saprophila*. Wpływ stężenia N w medium na kultury okrzemek był badany przez Ketchuma [54], Chu [55], Vollenweidera [56], Spencera [57] oraz Kaina i Fogga [58]. Hodowla prowadzona w chemostacie (bioreaktorze, do którego w sposób ciągły dostarcza się świeżą dawkę pożywki, jednocześnie odprowadzając końcowe produkty przemiany materii), wymaga utrzymania stałego tempa wzrostu i podstawowego metabolizmu kultury poprzez dostarczanie stałej ilości azotu. Oprócz pigmentów podstawowych, takich jak chlorofil a, c i fukoksantyna, marenina jest wytwarzana przez pierzastą okrzemkę morską *Haslea ostrearia*. Zauważono, że niedobór azotu w hodowli komórkowej tej okrzemki generuje stres komórkowy zwiększając syntezę lipidów (które pełnią formę materiału zapasowego w sytuacji niedoboru składników odżywczych) oraz rozpuszczalnego w wodzie niebieskiego pigmentu – mareniny. Syntetyzowany pigment posiada działanie alopatyczne, przeciwbakteryjne oraz przeciwwirusowe, co jest czynnikiem hamującym wzrost komórek okrzemek. W przypadku deficytu azotu, marenina działa jako swoisty inhibitor wzrostu, alarmując tym samym komórkę, aby zatrzymać jej wzrost. Mechanizm ten jest formą adaptacji wymienionego wyżej gatunku do zmieniających się warunków środowiskowych [51].

Krzemionka to główny składnik ściany komórkowej okrzemek. Jej obecność ma znaczący wpływ na wzrost okrzemek. Jednakże wnioski dotyczące obecności tego składnika odżywczego są niejednoznaczne. Wykazano, że obecność krzemionki w większym lub mniejszym stopniu niekorzystnie wpływa na produkcję lipidów.

Przeprowadzone badania dla okrzemek z gatunku *Nitzschia inconspicua* wykazały, że stężenie krzemionki ma pozytywny wpływ na wzrost komórek, zawartość związków biochemicznych i kwasów tłuszczowych [51].

2.1.6.1.2. Światło

Dla każdego fotosyntetyzującego organizmu, w tym okrzemek, światło jest wyjątkowo ważnym czynnikiem wpływającym na wzrost. Z uwagi na to, że okrzemki potrafią rosnąć w szerokim zakresie długości fal światła oraz jego intensywności, uważa się, że wykształciły one specjalne mechanizmy fotoaklimatyzacji i fotoadaptacji [59–61]. Podobnie jak u większości innych gatunków fitoplanktonu, czas podziału komórek okrzemek może być regulowany przez naprzemienne okresy światła i ciemności, co sugeruje, że cykl komórkowy składa się z segmentów zależnych i niezależnych od światła [62,63]. Zgodnie z powyższym, zarówno poprzez eksperymenty z ograniczeniem, jak i nadmierną ilością światła, u kilku gatunków okrzemek zidentyfikowano kontrolowane przez światło punkty restrykcyjne, odnoszące się albo tylko do fazy G1, albo zarówno do fazy G1, jak i G2/M cyklu komórkowego [62,64–67]. Interesującym jest również fakt, że oparte na okresach światła i ciemności etapy podziału komórkowego u *Thalassiosira weissflogii* mogą zostać zablokowane przez podanie okresowych impulsów azotowych, co sugeruje, że kontrola odżywcza cyklu komórkowego jest u tej okrzemki usytuowana poniżej świetlnego punktu kontrolnego lub że szlaki regulujące punkt kontrolny odżywczy i świetlny mogą być ze sobą ściśle powiązane [68].

Wnikliwe badania głównych grup czynników transkrypcyjnych (ang. *transcription factors*, TF) u okrzemek doprowadziły do zidentyfikowania domniemanych ortologów TF zaangażowanych w przekazywanie sygnałów świetlnych [69,70]. Ponadto znaleziono sekwencje podobne do aureochromów oraz białka bZIP-PAS, które mogą

reprezentować klasy fotoreceptorów zawierających receptory przypuszczalnie czułe na światło i domeny wiążące DNA. Co szczególnie interesujące, poza domenami bZIP (podstawowy zamek leucynowy), aureochromy zawierają również domenę LOV (światło, tlen lub napięcie), która także jest obecna w rodzinie fotoreceptorów światła niebieskiego [71,72]. Ostatnie badania białka Aureochrome1a u *P. tricornutum* wskazały, że TF w rzeczywistości funkcjonuje jako sensor światła niebieskiego [73,74]. Z powodu tego, że światło niebieskie (350-500 nm) jest najbardziej dominującym pasmem pod powierzchnią wód oceanicznych [75], spodziewa się, że efektywne mechanizmy wyczuwania i sygnalizacji światła niebieskiego będą odgrywać kluczową rolę w kontroli wzrostu okrzemek. W związku z tym, w *P. tricornutum* zidentyfikowano i scharakteryzowano niedawno czujnik światła niebieskiego - kryptochromową fotolizę z rodziny 1 (ang. *cryptochrome/photolyase family 1*, CPF1). Nadekspresja tego białka wpłynęła na indukowaną światłem niebieskim ekspresję genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego i naprawę DNA, co sugeruje rolę CPF1 w odbieraniu i sygnalizacji warunków świetlnych środowiska oraz związek ich z progresją cyklu komórkowego [76].

2.1.6.1.3. pH

Optymalny zakres pH dla hodowli większości gatunków okrzemek wynosi 7 - 9. Jeśli hodowla osiągnie wysoką gęstość i pH wzrośnie powyżej optymalnego zakresu, jego wartość można dostosować, stosując napowietrzanie dwutlenkiem węgla lub dodając wodorowęglanu sodu wraz z pożywką hodowlaną. Równowaga między CO_2/HCO_3 utrzymuje stabilne pH, a pożywka hodowlana działa jak bufor. Utrzymanie optymalnej wartości pH jest bardzo ważne, ponieważ gwarantuje prawidłowość procesów komórkowych. Przy prowadzeniu hodowli okrzemek ważne jest zachowanie pH o odczynie lekko kwasowym, gdyż przedkłada się to na proces silifikacji ścian

krzemionkowych okrzemek. Proces formowania pancerzyków w takich warunkach jest wydajniejszy i szybszy, ponieważ SiO₂ łatwiej agregują ze sobą, tworząc dojrzałe pancerzyki odporne na uszkodzenia mechaniczne. Utrzymywanie optymalnego zakresu pH wpływa wydajnie na produkcję kwasu eikozapentaenowego (ang. *eicosapentaenoic acid*, EPA) – organicznego związku chemicznego, z grupy kwasów omega-3 oraz aminokwasów [51,77].

2.1.6.1.4. Napowietrzenie i mieszanie

Mikroalgi wytwarzają tlen podczas fotosyntezy, dlatego też w zamkniętych hodowlach łatwo osiągnąć poziom rozpuszczonego tlenu odpowiadający kilkukrotnemu nasyceniu powietrza. Stężenia tlenu powyżej nasycenia powietrza generalnie hamują fotosyntezę w mikroalgach [78] i prowadzą do spadku wydajności biomasy [79].

Aby zapewnić wszystkim komórkom z populacji jednakowe warunki hodowlane należy poddawać je procesowi mieszania. Jest ono niezbędne, aby zapobiec sedymentacji glonów oraz zapewnić, wszystkim komórkom populacji dostęp do światła i składników odżywczych, aby uniknąć stratyfikacji termicznej (np. w hodowlach na wolnym powietrzu) i poprawić wymianę gazową między medium hodowlanym a powietrzem. Pod pojęciem mieszania rozumiemy codzienne ręczne mieszanie, napowietrzanie lub stosowanie kół łopatkowych i pomp strumieniowych. Niemniej jednak, nie wszystkie gatunki glonów mogą tolerować energiczne mieszanie. Tak jest w przypadku okrzemek dennych (np. *H. ostrearia*). Ze względu na sztywne pancerzyki, okrzemki mogą cierpieć z powodu naprężeń ścinających. Zjawisko to zostało wykazane przez Albijanic i wsp. [80] w pionowej kolumnie pęcherzykowej przy braku gazu (w celu zapewnienia homogenizacji cieczy), gdy zastosowano mechaniczne mieszanie. Małe pęcherzyki powietrza pękające na powierzchni hodowli były najwyraźniej główną przyczyną

uszkodzenia komórek w hodowlach okresowych w laboratoryjnych kolumnach pęcherzykowych z *P. tricornutum* [81]. W celu przezwyciężenia tej wady wykazano, że uzupełnienie medium hodowlanego mikroalg karboksymetylocelulozą (ang. *carboxymethylcellulose*, CMC) - modyfikatorem właściwości międzyfazowych, w stężeniu co najmniej 0,2%wag. chroni komórki alg przed wywołanym przez napowietrzanie stresem hydrodynamicznym. CMC miało czysto fizyczny efekt ochronny i nie miało żadnego fizjologicznego wpływu na komórki alg [81].

2.1.6.1.5. Temperatura

Temperatura odgrywa ważną rolę we wzroście komórek i syntezie metabolitów. Do czasu osiągnięcia optymalnej wartości temperatury, ciągły jej wzrost prowadzi do zwiększenia aktywności enzymatycznej i tempa fotosyntezy, jak również poboru składników odżywczych. Te wzrosty wskaźników życiowych prowadzą z kolei do wyższych wskaźników wzrostu [82]. Ponadto, wzrost temperatury może również wzmocnić kinetykę aktywacji i dezaktywacji aparatu fotosyntetycznego, a tym samym wpłynąć na potencjał aklimatyzacyjny [83]. I odwrotnie, wzrost temperatury może mieć negatywny wpływ na przeżywalność w ciemności niektórych gatunków okrzemek [84] i może prowadzić do zwiększenia oddychania w fazie ciemnej [85,86]. Jak podsumował Couteau [87], najczęściej hodowane gatunki mikroalg tolerują temperatury w zakresie 16-27°C. Temperatury niższe niż 16°C spowalniają wzrost, natomiast wyższe niż 35°C są zabójcze dla wielu gatunków. W razie potrzeby hodowle glonów mogą być chłodzone przez przepływ zimnej wody nad powierzchnią naczynia hodowlanego lub przez kontrolę temperatury powietrza za pomocą urządzeń klimatyzacyjnych.

2.1.6.1.6. Zasolenie

Okrzemki zaliczają się do glonów, a te z kolei cechują się dużą tolerancją zasolenia środowiska, w którym żyją. Większość gatunków preferuje zasolenie nieco niższe niż te, które jest obecne w ich pierwotnym środowisku. Optymalna wartość zasolenia wynosi 20-24 g/L. Takie stężenie soli można uzyskać poprzez rozcieńczenie wody morskiej zwykłą wodą wodociągową lub destylowaną. Roztwór można przygotować również poprzez wymieszanie wody wodociągowej lub destylowanej z odpowiednią naważką soli morskiej [88]. Przy poziomach zasolenia zwykle spotykanych w morzach, można oczekiwać, że okrzemki będą produkować bardziej uwodnioną, mniej skondensowaną biokrzemionkę, podczas gdy w bardziej słonawych środowiskach biokrzemionka okrzemek mogłaby być mniej uwodniona i bardziej gęsto upakowana [89].

2.1.6.1.7. Sterylizacja

Hodowla mikroorganizmów wymaga absolutnej czystości podłoża i sterylności procesu namnażania biomasy. Sterylne medium hodowlane musi być wolne od wszelkich organizmów, zarówno ich form wegetatywnych, jak i przetrwalnikowych. Pożądaną sterylność uzyskuje się poprzez wyjaławianie elementów niezbędnych do prowadzenia hodowli. Ryzyko zanieczyszczenia kultur alg heterotrofami jest zmniejszone, gdy pożywka hodowlana nie posiada prekursorów węgla organicznego. Zainfekowanie biomasy okrzemek hetero- i fotoautotrofami jest głównym problemem w efektywnym prowadzeniu hodowli [51,52,90]. Z tego też powodu przed założeniem hodowli bioreaktor, w którym będzie prowadzony proces namnażania biomasy powinien zostać dokładnie wysterylizowany. Wszelkie wyposażenie laboratoryjne, niezbędne do zapoczątkowania hodowli mikroalg powinno być odporne zarówno na chemiczny jak i fizyczny proces sterylizacji. Wymagane jest również zachowanie sterylności

w postępowaniu z materiałem biologicznym. Proces sterylizacji można przeprowadzić na różne sposoby, z wykorzystaniem wysokiej temperatury, promieniowania UV, β , γ , X, związków chemicznych czy filtracji [90].

Podczas procesu hodowli mogą wystąpić interakcje między komórkami glonów a bakteriami. Ten rodzaj interakcji może mieć pozytywny wpływ na namnażany gatunek, ponieważ bakterie mogą wydzielać witaminy i składniki odżywcze, stymulując tym samym komórki okrzemek do efektywnego wzrostu. Ten rodzaj symbiozy może być pożądany, jeśli w trakcie hodowli nie jest wymagana sterylność gatunkowa. Jednakże, nie zawsze interakcja między bakteriami a algami musi być pozytywna. Konkurencja o substancje odżywcze oraz wydalanie metabolitów szkodliwych dla glonów powoduje, że bakterie mogą wpływać negatywnie na rozwój okrzemek. Algicydy wytwarzane przez niektóre szczepy bakterii są szczególnie skuteczne w hamowaniu wzrostu glonów poprzez degradację polisacharydów, co ostatecznie prowadzi do zniszczenia komórek glonów. [51].

2.1.6.2. Techniki hodowli okrzemek

2.1.6.2.1. Zasady hodowli okresowej

Hodowla okresowa (ang. *batch culture*) jest najprostszą i najczęściej stosowaną metodą hodowli alg. Podczas tej hodowli nie są dostarczane świeże składniki odżywcze i nie są usuwane produkty metabolizmu. Warunkiem prowadzenia takiego procesu jest zachowanie optymalnych warunków środowiskowych dla wybranego szczepu glonów tj. temperatury, pH, naświetlenia czy napowietrzenia. W hodowlach okresowych wzrost organizmów jest regulowany obecnością substratu i trwa do jego wyczerpania. Z czasem stężenie produktów przemiany materii wzrasta, co jest efektem ubocznym metabolizmu alg. Jeśli stężenie metabolitu osiągnie zbyt wysoką wartość, będzie miało to toksyczny

wpływ na namnażaną biomasę, co w konsekwencji spowoduje zahamowanie jej wzrostu [52,77]. Ten rodzaj hodowli ma wiele zalet. Po pierwsze, takie hodowle są łatwe w obsłudze, co pozwala na szybką zmianę parametrów fizykochemicznych procesu czy zmianę szczepów hodowlanych. Jednocześnie tego typu hodowla charakteryzuje się raczej niską wydajnością. Ponadto, istnieje dość wysokie ryzyko zakażenia hodowli. We wczesnym stadium namnażania biomasy, gdy liczba komórek okrzemek jest niska, a dostępność składników odżywczych wysoka, środowisko hodowlane może zostać łatwo zdominowane przez inne gatunki glonów, bakterii lub grzybów. W celu uniknięcia tego typu sytuacji tuż przed osiągnięciem fazy stacjonarnej algi zostają przeniesione do większej objętości, umożliwiającej im wzrost do maksymalnej gęstości, a następnie zebrane w całości plonu [52,91].

2.1.6.2.2. Zasady hodowli ciągłej

Metoda hodowli ciągłej (ang. *continuous culture*) polega na nieprzerwanym pompowaniu nawożonej wody morskiej lub medium hodowlanego do komory wzrostu, podczas gdy nadmiar kultury glonów jest natychmiastowo wypłukiwany. Pozwala ona na utrzymanie hodowli w stopniu bardzo zbliżonym do maksymalnego tempa wzrostu. Można wyróżnić dwie kategorie hodowli ciągłych:

1. hodowla turbidostatyczna, w której stężenie glonów jest utrzymywane na ustalonym poziomie poprzez rozcieńczanie kultury świeżą pożywką przy użyciu zautomatyzowanego systemu;
2. hodowla chemostatyczna, w której strumień świeżej pożywki jest wprowadzany do hodowli ze stałą, z góry określoną szybkością. Końcowy przepływ dodaje ograniczające życie składniki odżywcze (takie jak azotany) ze stałą szybkością

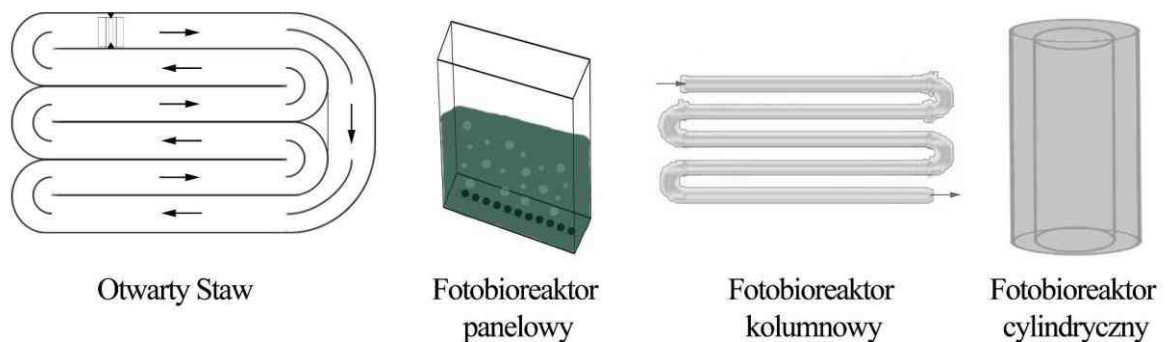
przez co tempo wzrostu, a nie gęstość komórek jest utrzymywane na stałym poziomie.

Laing [52] opisał budowę i działanie systemu ciągłego o pojemności 40L, odpowiedniego do hodowli wiciowców, takich jak *Tetraselmis suecica* i *Isochrysis galbana*. Zbiornik hodowlany składał się z wewnętrznie oświetlonej rury polietylenowej wspartej na metalowej ramie. Ten system turbidostatu wytwarzał 30L biomasy dziennie przy gęstości komórek, która zapewnia optymalne plony dla każdego gatunku wici. Stosunkowo łatwy i niedrogi w budowie system chemostatyczny jest produkowany przez firmę Seasalter Shellfish Co. Ltd. w Wielkiej Brytanii. Ta firma hoduje *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Dunaliella tertiolecta* i *Skeletonema costatum* przy użyciu pionowych worków polietylenowych o pojemności 400L, wspartych na ramach. Jedną z wad tego systemu jest duża średnica worka (60 cm), co prowadzi do samozacieniania i stosunkowo niskiego zagęszczenia pozyskiwanych alg. Wadą systemów ciągłych jest ich stosunkowo wysoki koszt i niesamowita złożoność. Wymagania dotyczące stałego oświetlenia i odpowiedniej temperatury ograniczają ciągłe systemy do zamkniętych przestrzeni. Powoduje to możliwość zastosowania tej metody hodowli tylko w przypadku małej skali produkcji. Jednakże ciągła hodowla ma tę zaletę, że produkuje glony o bardziej przewidywalnej jakości. Ponadto proces hodowli ciągłej nadaje się do kontroli technicznej i automatyzacji, co zwiększa niezawodność systemu i zmniejsza zapotrzebowanie na siłę roboczą.

2.1.6.2.3. Systemy produkcji alg

Istnieją różne systemy produkcji glonów, a wybór odpowiedniego rozwiązania zależy od wiedzy hodowcy, dostępnych funduszy i warunków środowiskowych. Systemy

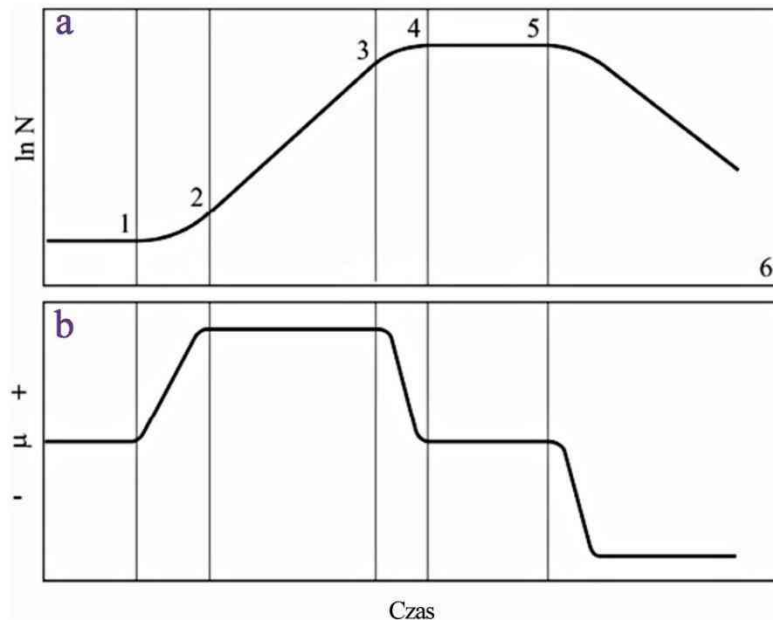
produkcji alg można podzielić na naturalne i sztuczne, gdzie można precyzyjnie kontrolować proces rozmnażania i być niezależnym od warunków środowiskowych. Obecnie stosuje się stawy hodowlane lub fotobioreaktory (ang. *photobioreactors*, PBRs) - kolumnowe, panelowe i cylindryczne (Rys. 7.) [92–96]. Oba typy systemów różnią się wydajnością, kosztami utrzymania i potencjałem uprawowym. Chcąc produkować biomasę z glonów na skalę przemysłową wykorzystuje się hodowle ciągłe, stanowiące systemy otwarte np. stawy na otwartym powietrzu lub zamknięte fotobioreaktory. Hodowla glonów w otwartych stawach jest mniej kosztowna niż w fotobioreaktorach, jednak wydajność produkcji biomasy w takich zamkniętych układach jest znacznie wyższa [77,97].



Rys. 7. Różne typy systemów produkcji alg [77].

2.1.6.2.4. Dynamika wzrostu okrzemek

Wzrost okrzemek, podobnie jak i innych glonów, w hodowli okresowej można opisać w sposób graficzny (Rys. 8).



Rys. 8. Krzywa wzrostu okrzemek w hodowli okresowej; 1-faza lag; 2-faza przyspieszenia; 3-faza log; 4-faza spowolnionego wzrostu; 5-faza stacjonarna; 6-faza zamierania [77]

Krzywa wzrostu drobnoustrojów przedstawia zależność liczby komórek/biomasy od czasu prowadzenia hodowli. Komórki glonów umieszczone w świeżym i bogatym w substancje odżywcze środowisku wykazują typowe tempo wzrostu składające się z sześciu faz [77,98].

- 1) Faza adaptacyjna – na tym etapie komórki nie rozmnażają się. Jest to okres przygotowawczy, w którym algi przystosowują się fizjologicznie do podziału komórek, na przykład wzrastają poziomy wymaganych enzymów. Ta faza może być krótsza lub dłuższa w zależności od tego, jak poważne są zmiany środowiskowe i jakie jest aktualne stadium wzrostu zaszczerpionych komórek.
- 2) Faza przyspieszenia – jest to krótka faza, w której rozpoczyna się podział komórki i przyspiesza do najwyższego tempa podziału (najkrótszy cykl komórkowy).

- 3) Faza wykładnicza – podczas tej fazy tempo podziału pozostaje na stałym, maksymalnym poziomie, a liczba żywych komórek wzrasta logarytmicznie. Ten etap jest stosunkowo krótki. Jest to związane z faktem, iż komórki szybko zaczynają rosnąć jedna na drugiej, co powoduje spadek tempa wzrostu.
- 4) Faza spowolnionego wzrostu – w tej fazie współczynnik podziału maleje, głównie ze względu na zmniejszoną ilość światła wpadającego do powstałej zawiesiny czy wyczerpywania składników odżywczych.
- 5) Faza stacjonarna – na tym etapie szybkość podziału i liczba komórek utrzymują się na stałym poziomie. Z biegiem czasu jakość komórek może ulec pogorszeniu, mogą pojawić się toksyczne metabolity wtórne, a skład chemiczny komórki okrzemki ulec degradacji.
- 6) Faza zamierania – w tej fazie liczba komórek zaczyna spadać w wyniku braku składników odżywczych, a także nadmiernych zmian pH lub infekcji. Komórki zachowują żywotność do wyczerpania materiału magazynowego. Czasami w procesie rozpadu komórkowego powstają różnego rodzaju zarodniki, które zaczną rosnąć, gdy tylko poprawią się warunki zewnętrzne [77,91,98].

Każda z tych faz charakteryzuje się odmiennymi stanami metabolizmu komórkowego oraz przebiegiem procesów fizjologicznych, takich jak fotosynteza, oddychanie, pobieranie składników pokarmowych, absorpcja jonów czy wytwarzanie metabolitów. Wszystkie te procesy determinują tempo podziału i wzrostu komórek, co znajduje odzwierciedlenie w dynamice wzrostu populacji w trakcie każdej z wyżej wymienionych faz.

2.1.6.3. Metody zbioru biomasy okrzemek

Zbieranie biomasy okrzemek jest procesem wymagającym najwięcej energii i zależy od koncentracji komórek, ich wielkości i ładunku powierzchniowego, zwłaszcza gdy hodowle prowadzone są w otwartych stawach [99]. Ważne jest, aby rozpocząć proces zbierania zanim okrzemki osiągną stacjonarną fazę wzrostu. Najlepszym momentem na zbiory jest końcowy etap wykładniczej fazy wzrostu, gdyż zebrana biomasa powinna składać się z samych żywych komórek. Zbieranie przeprowadza się w celu oddzielenia komórek od płynnej pożywki hodowlanej. Ta procedura daje skoncentrowaną zawiesinę komórek, która stanowi 5-25% jej suchej masy. Bardzo ważnym czynnikiem jest pozyskanie biomasy o stosunkowo niskiej wilgotności. Zbyt duża wilgotność lub zawilgocenie powstałej biomasy może niekorzystnie wpływać na kolejne procesy, którym jest poddawana. Często konieczne jest odwodnienie próbki na gorąco w celu usunięcia nadmiaru wody. Flokulacja, sedymentacja i filtracja są powszechnie stosowanymi technikami zbioru [100].

2.1.6.4. Metody izolacji biokrzemionki

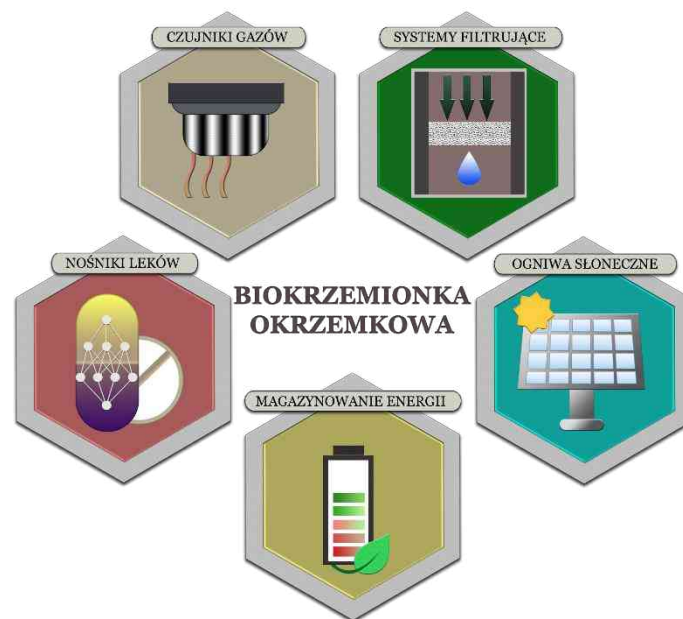
Od dawna wiadomym jest, że frustule okrzemek mogą pochodzić z dwóch źródeł: z ziemi okrzemkowej (diatomitu) i z żywych komórek okrzemek. Diatomit składa się w 70-90% z dwutlenku krzemu (rozłożone komórki okrzemek) i kilku tlenków metali (np. tlenku glinu i tlenku żelaza). Jako rodzaj taniego materiału, duże rezerwy diatomitu są dostępne na całym świecie (np. 390 milionów ton diatomitu może znajdować się w Chinach). Diatomity są szeroko stosowane w wielu produktach przemysłowych, takich jak adsorbenty, złoża filtracyjne, nośniki katalizatorów, środki owadobójcze i materiały budowlane [101–104]. W ostatnich badaniach nad okrzemkami w nanoskali stwierdzono dwie główne wady diatomitu. Po pierwsze, wielopoziomowe struktury porowe (zwłaszcza pory sitowe i cribrum) frustul w diatomitach łatwo ulegały uszkodzeniu

i kalcynacji w 600 - 900°C [105], znacznie zmniejszając powierzchnię tych frustul, a tym samym zmniejszając ich wpływ na aplikacje filtracyjne, mikroprzepływowe i biosensoryczne. Po drugie, liczba rodzajów okrzemek, które można znaleźć w diatomicie jest o wiele mniejsza niż żywych gatunków okrzemek. W Chinach są tylko trzy rodzaje diatomitów o wysokiej czystości, z których wszystkie osobno zawierają pancerzyki różnych gatunków okrzemek. W przeciwieństwie do nich, frustule żywych komórek okrzemek występują w tysiącach różnych rozmiarów i trójwymiarowych kształtów, ze świeżymi i kompletnymi strukturami w mikro- i nanoskali oraz oryginalnymi właściwościami fizycznymi i chemicznymi (takimi jak adsorpcyjność i fotoluminescencja) [106]. Dlatego też, pancerzyki żywych komórek mogą być najlepszym materiałem do badań nad nanotechnologią, aplikacją urządzeń i biologią okrzemek. Istniejące metody zbierania pancerzyków okrzemek obejmują czyszczenie tlenem, wypalanie oraz trawienie plazmą tlenową. Kwas siarkowy [107,108], nadtlenuk wodoru [109–112], kwas azotowy [108] lub roztwory dodecylosiarczanu sodu kwasu etylenodiaminotetraoctowego [113] są powszechnie stosowane jako utleniacze do usuwania materii organicznej, która pokrywa strukturę krzemionki lub znajduje się w niej. Po oczyszczeniu zwykle następuje odwirowanie, rozcieńczenie lub filtracja, aby usunąć utleniacze i uzyskać czyste frustule (biokrzemionkę). Wypalanie komórek w temperaturze 400-800°C może również usunąć składniki organiczne z frustul okrzemek [114], jednak długotrwałe wypalanie może powiększyć pory i uszkodzić cribrum. Ponadto, produkty reakcji (węgiel) mogą adsorbować się na frustulach i stać się trudne do oczyszczenia. Wytrawianie w plazmie O₂ jest jedną z nowszych, opisanych metod oczyszczania biomasy [115]. W tradycyjnej metodzie izolacji biokrzemionki, stężony kwas siarkowy, kwas azotowy lub nadtlenuk wodoru, używane są jako utleniacze do oczyszczania frustul. Proces izolacji części nieorganicznej od fazy organicznej

prorowadzony jest w temperaturze 60°C i trwa od 5 do 10 minut. Późniejszy proces wirowania lub rozcieńczania może wiązać się z kilkunastogodzinnym usuwaniem kwasu i węgla. Ponadto wydajność oczyszczania tą metodą jest ograniczona. Metoda czyszczenia wyżej wymienionymi utleniaczami powszechnie oczyszcza niewielką ilość komórek okrzemek zebranych z ~5 mL do 100 mL podłoża do hodowli okrzemek. Przetwarzanie dużych ilości komórek mogłoby zmniejszyć efekty izolacji. Na przykład, biomasa okrzemek z 500 mL podłoża hodowlanego (hodowanych przez 2-3 tygodnie) będzie wymagała co najmniej 300 mL stężonego H₂SO₄/HNO₃/H₂O₂ i 1 h trwania reakcji oraz wytworzenia 1 - 2 L cieczy odpadowej. Dodatkowo, często zdarza się, iż materiał organiczny jest niekompletnie usuwany z powodu spiętrzenia komórek okrzemek i słabego kontaktu między utleniaczem a częścią organiczną biomasy. Istniejące metody ekstrakcji biokrzemionki muszą być zatem udoskonalone, aby sprostać wymaganiom badań nad okrzemkami wykorzystującymi większe ilości krzemionkowych pancerzyków.

2.1.7. Zastosowanie okrzemek w przemyśle

Koncepcja zastosowania biokrzemionki okrzemkowej jako materiału wdrożeniowego w nowoczesnych technologiach, zwłaszcza w nanotechnologii, była zaproponowana stosunkowo niedawno, bo dopiero w 1994 roku przez Gordon R. i Drum R.W. [116]. Od tego czasu fenomenalna zdolność okrzemek do syntezy unikalnych trójwymiarowych struktur z amorficznej krzemionki o specyficznych właściwościach fizykochemicznych (optycznych, elektrycznych, filtracyjnych, termicznych, mechanicznych) wywołuje rosnącą fascynację biologów, chemików i fizyków. [2,117,118]. Rozmiar i morfologia okrzemek są ściśle uzależnione od gatunku, a krzemionkowe frustule wykazują różnorodność wzorów i unikalnych mikro- i nanostruktur, które mogą być rozważane jako nowe biofunkcjonalne materiały.



Rys. 9. Schemat przedstawiający gamę zastosowań biokrzemionki okrzemkowej w nowoczesnych technologiach [34]

Unikalna, hierarchicznie porowata struktura 3D pancerzyków okrzemek powoduje, że stają się one atrakcyjnym źródłem rozwiązań dla rozwoju nowoczesnej inżynierii

materiałowej. Takie materiały dostarczają szerokiego wachlarza możliwości ich wykorzystania (Rys. 9), chociażby w produkcji biosensorów, urządzeń optycznych, katalizatorów, półprzewodników, efektywnych adsorbentów, szablonów dla nanolitografii, w projektowaniu nośników leków czy implantów kości [118–120]

2.1.7.1. Zastosowanie okrzemek w biodegradacji zanieczyszczeń środowiska

Substancja zanieczyszczająca środowisko może być zdefiniowana jako czynnik wpływający na estetyczną, fizyczną, chemiczną i biologiczną jakość i zdrowotność środowiska [121–123]. Materiały powodujące zanieczyszczenia powinny być zarządzane i kontrolowane. Na całym świecie stosuje się pewne metody, aby przezwyciężyć ten problem. Rozwiązania te polegają na degradacji fizycznej, chemicznej lub biologicznej. Ze względu na uwalnianie często toksycznych materiałów, metody chemiczne i fizyczne nie są uważane za odpowiednie do pozbycia się tych zanieczyszczeń. Dlatego też metody biologiczne i ich unikalne cechy kwalifikują je do zastosowania w biodegradacji odpadów. Okrzemki, ze względu na swoje cechy strukturalne i fizjologiczne, mogą być wykorzystywane w degradacji materiałów. Na przykład, niektóre okrzemki usuwają odpady w środowisku i inne zanieczyszczenia. W Malezji badano degradację zanieczyszczeń wodnych w dorzeczu rzeki Penang przez okrzemki [124]. W tym badaniu zastosowano różne gatunki okrzemek na różnych próbkach zebranych z wielu stacji pomiarowych. Wyniki pokazały, że strukturę zbiorowiska okrzemek i ich specyficzną wrażliwość można powiązać ze stopniem jakości wody w badanym dorzeczu [124]. W kolejnym badaniu dowiedziono, że niektóre słodkowodne zielone algi (np. *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda* i *Selenastrum capricornutum*) są zdolne do pobierania i degradacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (ang. *polycyclic aromatic hydrocarbon*, PAH) [125–129]. *Laminaria joapnica*, znana makroalga, rosnąca w wodach przybrzeżnych wzdłuż

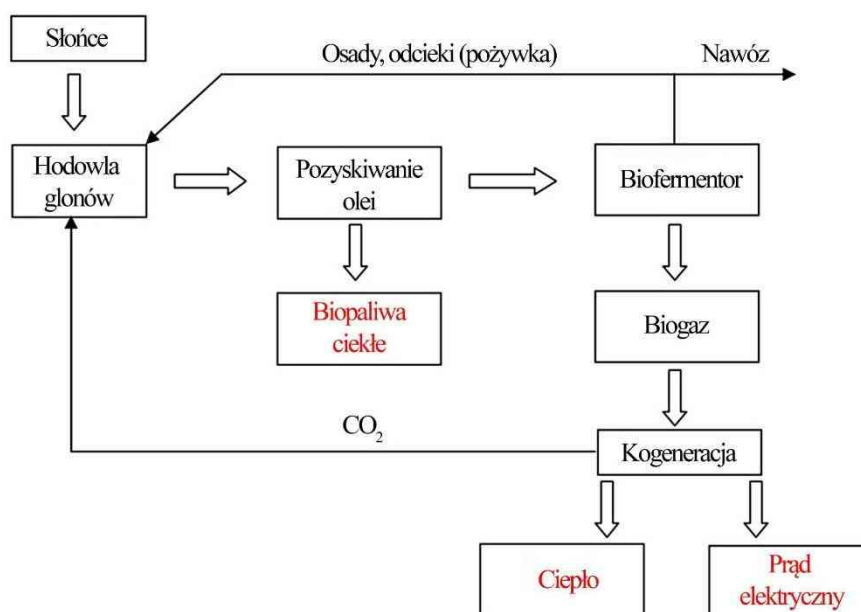
wschodniego wybrzeża Chin, pobiera i degraduje dwa WWA (wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne) - fenantren i piren, będącymi głównymi składnikami trwałych zanieczyszczeń organicznych [130]. Mikroglony te, uprawiane w różnych stężeniach fenantrenu i pirenu, wykazywały zmienne reakcje na stres, określane przez ich aktywność enzymatyczną. Metabolizm fenantrenu i pirenu w okrzemkach odbywał się głównie poprzez proces enzymatycznego utleniania, przekształcający WWA do mniej lub bardziej nietoksycznych form związków [130].

2.1.7.2. Biopaliwa

Biodiesel jest odnawialnym, wydajnym i czystym paliwem, które jest produkowane z różnych biozasobów [131]. Powstaje w wyniku długotrwałej konwersji oleju i tłuszczu z alg, roślin i zwierząt do (bio)oleju napędowego [132,133]. Profil kwasów tłuszczowych zmienia się zarówno jakościowo jak i ilościowo w zależności od warunków środowiskowych i stanu fizjologicznego okrzemki. Okrzemki mogą produkować znaczną ilość bogatych w energię olejów, mając potencjał do gromadzenia dużej ich ilości w suchej biomacie.

Naturalnie okrzemki produkują nowatorskie związki bioaktywne i drobne substancje chemiczne, takie jak pigmenty, związki halogenopochodne, kwas domoikowy i jego izomery, atraktanty i detergenty oraz poliaminy. Zarówno *T. pseudonana*, jak i *P. tricornutum* mogą dostarczyć dużej ilości głównych kwasów tłuszczowych omega-3, gdzie *P. tricornutum* gromadzi 30% EPA i śladowe ilości kwasu dokozaheksaenowego (ang. *docosahexaenoic acid*, DHA), podczas gdy *T. pseudonana* gromadzi 26% EPA i nieco wyższy poziom DHA niż *P. tricornutum* z całkowitej zawartości lipidów. Wiele gatunków roślin zostało odkrytych jako wysoce odpowiednie źródło oleju do produkcji biodiesla. Jednakże wszystkie wymagają żywej ziemi do uprawy, przez co bezpośrednio

konkurują o ziemię z roślinami spożywczymi. Jest to powód, dla którego okrzemki mogą stanowić lepszy substrat do produkcji biopaliw, aniżeli rośliny. Dodatkowo, pozostałości utylizowanej biomasy okrzemek mogą być dalej wykorzystywane do tworzenia innych bioproduktów i nawozów (Rys. 10). W rezultacie czyni to okrzemki idealnymi kandydatami do sekwestracji CO₂, produkcji biodiesla i fitoremediacji ścieków [134].

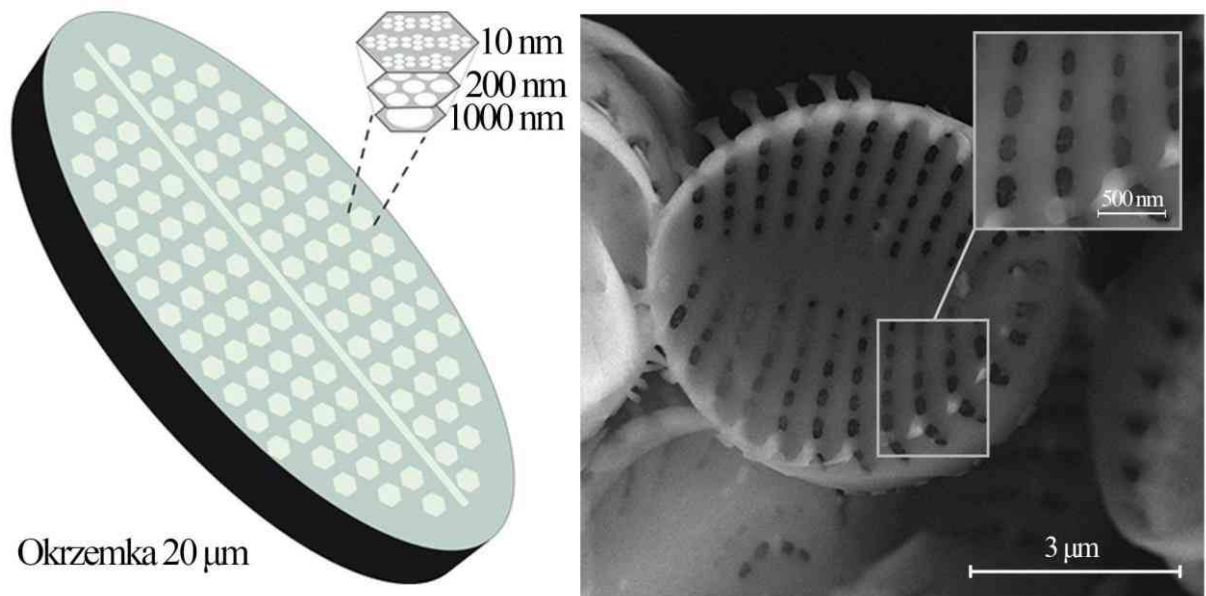


Rys. 10. Przykładowy schemat układu technologicznego wykorzystania biomasy glonów [135].

2.1.7.3. Perspektywy zastosowania okrzemek w nanotechnologii

Amorficzna krzemionka budująca pancerzyki okrzemek wyróżnia się dzięki wyjątkowym cechom swojej ściśle zdefiniowanej struktury, zwłaszcza dzięki misternie ornamentowanym trójwymiarowym układom porowatym (Rys. 11). Dzięki unikatowym właściwościom fizykochemicznym i fotonicznym, które zmieniają się pod wpływem różnych domieszkujących substancji chemicznych, poszerza się skala ich zastosowań [142,143]. Połączenie oryginalnej hierarchicznej, trójwymiarowej struktury biokrzemionkowych pancerzyków okrzemek z ich unikatowymi właściwościami optycznymi, periodycznym systemem porów [108], dobrymi właściwościami

mechanicznymi i termicznymi, chemiczną obojętnością i kompatybilnością biologiczną oraz możliwością funkcjonalizacji powierzchni pancerzyków [144] sprawia, że stają się one pożądanym materiałem w rozwoju licznych nowoczesnych technologii.



Rys. 11. Schemat hierarchicznej, porowatej struktury pancerzyka okrzemki [136]

2.1.7.3.1. Filtracja

Ze względu na wysoki potencjał filtracji ziemia okrzemkowa (ang. *diatomaceous earth*, DE) została zbadana pod kątem zastosowania w oczyszczaniu wody [145,146]. Ponieważ to rozmiar największych porów w medium określa jego przepuszczalność, właściwości filtracyjne DE zależą od upakowania materiału krzemionkowego. Jeśli możemy zidentyfikować i wybrać te właściwości szkielecików okrzemek, które prowadzą do zmniejszenia wielkości porów międzyfrustulowych, powinniśmy być w stanie zaprojektować szereg pancerzyków frustratów okrzemek zdolnych do działania jako media filtracyjne o potencjalnie zwiększonym zakresie. Ze względu na jednorodną naturę biomasy użytej do uzyskania materiału krzemionkowego, przepuszczalność będzie stała i będzie zależała od gatunku okrzemek użytego do wytworzenia materiału oraz

sposobu upakowania frustul. Oprócz porów międzyfrustulowych, niektóre gatunki okrzemek posiadają pory na powierzchni pancrzyka, które również mogą być wykorzystane do celów filtracyjnych. Te wewnątrzfrustulowe pory wydają się mieć jednolitą średnicę, a ich wielkość jest specyficzna dla danego gatunku. Chociaż sugerowano, że pory mogą powstawać z obecności czynników blokujących w SDV [147], wykazano, że wielkość porów może być funkcją temperatury i właściwości powierzchniowych cząsteczek ulegających wytrąceniu [35]. Możliwe jest zatem, że wielkość porów można kontrolować poprzez zmianę tych parametrów, a być może także innych, takich jak chociażby stężenia soli w medium hodowlanym [148]. Konstrukcja takich frustul w połączeniu z ich względną obojętnością chemiczną miałyby ważne zastosowanie w wielu specjalistycznych procedurach filtracji.

Filtracja żelowa jest techniką powszechnie stosowaną w oczyszczaniu materiałów takich jak białka. Metoda ta polega na zastosowaniu materiałów na bazie dekstranu (np. Sephadex™) w postaci porowatych kulek; wielkość porów oznacza, że są one niedostępne dla dużych cząsteczek, a zatem materiał przechodzący przez te media jest filtrowany w taki sposób, że mniejsze cząsteczki przechodzą jako pierwsze. Manipulując warunkami hodowli okrzemek można zaprojektować pancrzyki okrzemek tak, aby posiadały pory o stałej, określonej wielkości, które następnie można wykorzystać jako medium filtracyjne. Jak wspomniano wcześniej, biologiczna natura okrzemek umożliwiłaby produkcję dużych ilości stosunkowo taniego materiału. Ponadto, w przeciwieństwie do materiałów opartych na dekstranie, pory okrzemek nie są ograniczone do ustalonej liczby rozmiarów, ale mogą się zmieniać w zależności od warunków wzrostu [35].

2.1.7.3.2. Biosensory

Dodanie do biokrzemionki przeciwciał, enzymów, leków i aptamerów DNA jako elementów rozpoznawczych może być wykorzystane do uzyskania szeregu obiecujących biosensorów. W jednym z badań chemiczna modyfikacja struktur biokrzemionki z okrzemek *Chaetoceros* sp. została przeprowadzona przy użyciu nanocząstek (ang. *nanoparticles*, NPs) tlenku żelaza w celu uzyskania innowacyjnego funkcjonalizowanego systemu zawierającego przeciwciało trastuzumab do wykrywania/różnicowania od siebie komórek raka piersi i komórek prawidłowych [149]. Funkcjonalizacja szkielecików okrzemek *Amphora* sp. została przeprowadzona przy użyciu APTES ((3-aminopropyl)trietoksyilanu) do wykrywania albuminy surowicy bydłowej. Ponadto, biomarkery białkowe układu krążenia (mieloperoksydaza i białko C-reaktywne) z próbek ludzkiej surowicy można było wykryć za pomocą szybkich, pozbawionych etykiet funkcji elektrochemicznych, stosując nanoporowate materiały biokrzemionkowe (chip krzemowy) z układem złotych elektrod. De Stefano i wsp. [108] ujawnili, że biokrzemionkowe frustule okrzemki *Coscinodiscus concinnus* mogą być wykorzystane jako odpowiednie biosensory optyczne o znacznej czułości i LOD wynoszącym ~100 nM. Te innowacyjne systemy mogą być atrakcyjną alternatywą dla zastosowań typu „lab-on-particle”. Kamińska i wsp. [150] skonstruowali nanocząstki złota (AuNPs) zintegrowane z opartym na biokrzemionce ultraczułym testem immunologicznym ze wzmocnioną powierzchniowo spektroskopią Ramana (SERS) do wykrywania interleukiny 8, IL-8, w ludzkiej krwi. Ponadto, biokrzemionka okrzemkowa została wykorzystana do produkcji ultraczułych biosensorów immunologicznych o właściwościach wzmocnionej spektroskopii fluorescencyjnej [151]. W innym badaniu, ekonomiczna i przyjazna środowisku biokrzemionka z ziemi okrzemkowej została wykorzystana do produkcji czujników nanoplazmonicznych (opartych na SERS) poprzez

wzrost in situ nanocząstek srebra (AgNPs). Czujniki te mogą mieć wiele zastosowań, zwłaszcza w wykrywaniu żywności, monitorowaniu jakości powietrza/wody oraz w badaniach medycznych/biomedycznych (wykrywanie biomolekuł) [152]. Kompozyty NPs/porowata krzemionka mogą być stosowane w obrazowaniu optycznym i obrazowaniu rezonansu magnetycznego (MRI) [153]. Różne cząsteczki barwnika fluorescencyjnego dodane do NPs opartych na krzemionce mogą zwiększyć emisję w porównaniu z pojedynczą cząsteczką barwnika. W badaniu Herr i wsp. [154] porównali intensywność fluorescencji między NPs opartymi na krzemionce z domieszką barwnika i samym barwnikiem-aptamerem. Najważniejszą zaletą NPs opartych na krzemionce z domieszką barwnika było to, że matryca krzemionkowa pozwoliła uniknąć wypłówienia barwnika i zapewniła obrazowanie komórek/tkanek nowotworowych o długim czasie działania, co czyni je odpowiednimi jako wysoce czułe biosensory [155]. Managò i wsp. [156] wykazali, że NPs/okrzemki skoniugowane z niecelującym siRNA mogą być zlokalizowane w komórkach raka płuc H1355 dłużej niż 72 h poprzez zastosowanie obrazowania ramanowskiego. Te NPs mogą być stosowane jako skuteczne środki terapeutyczne i nano-wektory przeciwko nowotworom z zaletami niskiej toksyczności systemowej, stabilności chemicznej/termicznej i efektywności kosztowej. Skonstruowano NP sprzężone z aptamerem do ekstrakcji komórek nowotworowych wraz z ich obrazowaniem fluorescencyjnym [157]. Magnetyczne NP pokryte krzemionką oraz NP na bazie krzemionki domieszkowane fluorem zostały wykorzystane do precyzyjnego wykrywania i izolowania komórek nowotworowych [158]. Ponadto, panczerzyki okrzemek zostały wykorzystane jako platformy immunologiczne do obrazowania fluorescencyjnego w celu wykrycia ważnego biomarkera chorób układu krążenia, hormonalnego N-końcowego peptydu natriuretycznego typu B (NT-proBNP) [159].

2.1.7.3.3. Kryształy biofotoniczne

Kryształy fotoniczne to materiały o przestrzennie uporządkowanych i periodycznych nanostrukturach, które mogą kontrolować propagację światła, pozwalając na przejście przez kryształ tylko pewnych długości fal (podobnie jak propagacja elektronów w kryształach półprzewodnika) [160]. Są one w stanie kontrolować fotony, wytwarzając niezwykle efekty, które są niemożliwe do uzyskania w konwencjonalnej optyce, i mają potencjał, aby zrewolucjonizować istniejące technologie elektroniczne i obliczeniowe [160]. Fotoniczne właściwości kryształów pasmowych struktur krzemek zostały już potwierdzone [161–163], co sugeruje, że okrzemki są żywymi kryształami fonicznymi. Nanotechnologia krzemek pozwala nam obecnie na wyhodowanie ogromnej różnorodności kryształów biofotonicznych. To niezwykle odkrycie rodzi pytania o biologiczne znaczenie fonicznych właściwości krzemek i ich praktyczne wykorzystanie. Motyle, chrząszcze i wiele innych organizmów od wieków wykorzystuje kryształy foniczne [164,165]. Ich funkcja jest różna, od komunikacji, kamuflażu i wymiany termicznej po ochronę przed promieniowaniem UV. Receptory fotosyntetyczne krzemek znajdują się w chloroplastach blisko krzemionkowej ściany, a właściwości kanalizujące i skupiające światło [166] ich krzemionkowej struktury mogłyby pomóc w transmisji i zbieraniu większej ilości światła do fotoreceptorów w celu poprawy wydajności fotosyntezy [162]. Kolejną unikatową właściwością, która pochodzi od krzemek jest fotoluminescencja [108,161,167]. Wizualny efekt luminescencji z krzemek jest wyraźnie widoczny po naświetleniu struktur krzemionkowych światłem UV z szerokim niebieskim pikiem luminescencji w regionie widzialnym (450 nm). Stwierdzono, że efekt ten jest podobny do fotoluminescencji sztucznie wytworzonego porowatego krzemu.

Fotoluminescencja okrzemek jest silnie zależna od gatunku i wynika zarówno z budowy ich pancerzyków, jak i otaczającego środowiska. Cechy te zostały już wykorzystane [108] do stworzenia pierwszych fotoluminescencyjnych czujników gazu opartych na okrzemkach [168]. Wykazano ultraczułe wykrywanie szeregu par związków organicznych (takich jak etanol, aceton, ksylen i pirydyna) i gazów (dwutlenek azotu, metan, tlenek węgla) [107]. W oparciu o te wyniki i różnorodność dostępnych okrzemek cechujących się odmiennymi charakterystykami fotoluminescencji w stosunku do różnych gazów, można przewidzieć rozwój uniwersalnej platformy fotoluminescencyjnej do wykrywania gazów toksycznych lub monitorowania zanieczyszczeń powietrza.

2.1.7.3.4. Komputery z okrzemek

Być może najbardziej wyrafinowanym marzeniem związanym z okrzemkami jest jak dotąd nadzieja na wyhodowanie z nich dużej liczby trójwymiarowych nanokomputerów lub komponentów komputerowych. Idea wyhodowania komputera sięga co najmniej eksperymentów zabawkarza Roberta Stewarta nad dendrytami żelaznymi w kwasie azotowym [169,170], które wyprowadził on z modelu żelaznego drutu Lillie'ego dla propagacji sygnału komórek nerwowych [171,172]. Dotychczasowym osiągnięciem jest przekształcenie trójwymiarowego kształtu amorficznej krzemionki budującej pancerzyk okrzemki w krzem, z zachowaniem morfologii oryginalnej okrzemki [173]. Szczególnie satysfakcjonujące może być połączenie nanotechnologii 3D okrzemek z nanotechnologią 3D DNA [174] i elektronicznymi właściwościami DNA [175]. Wykazano już wiązanie DNA bezpośrednio lub pośrednio z krzemionką [176] i krzemem [177,178], a należy pamiętać o zależnym od krzemionki charakterze replikacji DNA u okrzemek [179]. Wyjaśnienie tego zjawiska opiera się na fakcie, że komórki potrzebują czasu, by ustabilizować integralność systemu komórkowego podczas stresu replikacyjnego [180]. Można sobie

wyobrazić, że transkrypcja komórkowa wykorzystuje inną strategię awaryjną w głodzie krzemowym, która promuje chronologiczną reorganizację replikacyjnych czynników transkrypcyjnych: zmniejszonych, zahamowanych lub aktywowanych z opóźnieniem [181].

2.2. Metody modyfikacji biokrzemionki okrzemkowej

Modyfikacja materiału jest ważnym podejściem do zmiany właściwości fizykochemicznych lub funkcji biokrzemionki okrzemkowej i otwiera duże możliwości syntezy nowych materiałów o strukturze 3D. Obecne badania sugerują kilka funkcjonalnych czynników do dodania lub zastąpienia w pancerzykach okrzemek metodą chemiczną, hodowlaną lub replikacyjną przy zachowaniu oryginalnej struktury frustul. Rozwijana jest również hodowlana metoda metabolicznej modyfikacji szkielecików okrzemek podczas ich naturalnego wzrostu. Niektóre opublikowane w ostatnich latach badania świadczą również o tym, że okrzemki potrafią wbudowywać w strukturę swoich krzemionkowych pancerzyków tlenki innych metali, takich jak tytan, cyrkon czy gal [182–184]. Istnieją także wyniki badań nad możliwością izomorficznego zastąpienia atomów krzemu atomami germanu i tytanu w krzemionce okrzemkowej w celu uzyskania materiałów tytanowych domieszkowanych o właściwościach fotoluminescencyjnych i elektroluminescencyjnych.

Stworzenie pancerzyków składających się z więcej niż jednego materiału stanowi wyzwanie, gdyż okrzemki rozwijają się od środka na zewnątrz. Zdolność okrzemek do wbudowywania w swoją strukturę różnych materiałów zależy również od czasu w jakim formują się pancerzyki: pierwotny model pancerzyka jest tworzony między 3 a 4 minutami, natomiast samo wzrastanie na grubość trwa godzinę do dwóch. Proces wzrostu okrzemek można nieco spowolnić, aby zwiększyć szansę wbudowania nowych

pierwiastków. Można to osiągnąć poprzez obniżenie temperatury hodowli lub poprzez ograniczenie dostępu światła lub związków odżywczych w hodowli. Należy jednak uważać, aby nie nastąpiła zbyt ekstremalna zmiana warunków, gdyż może to powodować pewne zmiany morfologiczne pancerzyków (tzw. teratologii) lub w skrajnych przypadkach może dojść do nieodwracalnego uszkodzenia komórek. Bardziej bezpiecznym sposobem na zmianę pierwotnego budulca jakim jest krzemionka na inny materiał jest zmodyfikowanie szlaku metabolizmu krzemionki opartym na SDV i STV. Metoda ta zakłada zidentyfikowanie i wyizolowanie białka odpowiedzialnego za transport krzemionki do pęcherzyka depozytowego (SDV) przez system transportujący STV. Następnie takie białko poddaje się modyfikacji, wprowadzając mutację, której efektem byłoby transportowanie nowych pierwiastków tym samym szlakiem, którym odbywa się transport krzemionki. Czynnikiem fizycznym uruchamiającym wprowadzoną zmianę w białku byłaby temperatura. Wprowadzenie takiego zmodyfikowanego białka do okrzemki posiadającej oryginalny wariant białka niezmodyfikowanego, umożliwi poprzez zmianę temperatury w hodowli sterowanie procesem wbudowywania różnych pierwiastków do pancerzyka okrzemek. Wbudowywanie do pancerzyków okrzemek innych surowców niż krzemionka powoduje nadanie pancerzykom nowych unikatowych właściwości [2,118].

Okrzemkom przypisuje się funkcję specyficznej „mikrofabryki” produkującej szeroką gamę materiałów, które mogą z powodzeniem zostać wykorzystane w nanotechnologii czy biotechnologii. Porowatość, trójwymiarowa struktura i hierarchiczność porów oraz możliwość wprowadzania różnych pierwiastków i modyfikowanie ich struktury czyni z okrzemek materiał biologiczny o wysokim potencjale [35].

2.3."Outsourcing" okrzemek w wytwarzaniu domieszkowanej metalami biokrzemionki o strukturze 3D

Wykorzystując niezwykłą zdolność okrzemek do izomorficznego podstawienia w swoich pancerzykach atomów krzemu innymi atomami metali przejściowych i półmetali, można uzyskać materiał, który charakteryzować się będzie wzmocnieniem właściwości optycznych biokrzemionki okrzemkowej, nabywając przy tym specyficznych dla domieszkowanego pierwiastka właściwości [185]. Coraz to nowsze badania donoszą o możliwości zastosowania biokrzemionki okrzemkowej powlekaną TiO_2 w szeroko rozumianej fotokatalizie. Należy też zwrócić uwagę na fakt, że opracowano techniki osadzania innych związków na powierzchni pancerzyków okrzemek, co pozwoliło na otrzymanie materiału o właściwościach półprzewodnikowych [186–188]. Biokrzemionka okrzemkowa jest produkowana w sposób przyjazny dla środowiska i dzięki temu może stanowić idealny materiał do zastosowania w urządzeniach „zielonej energii”.

Niezwykle ekscytującą propozycją modyfikacji biokrzemionki jest jej redukcja do czystego krzemu, bez niszczenia jej trójwymiarowej struktury, co wiązałoby się z nowymi, szerokimi możliwościami w dziedzinie mikroelektroniki [118,173]. Obiecujące wyniki uzyskano stosując egzoszkielety okrzemek jako matrycę w syntezie nanomateriałów metodą chemiczną [2,111,189,190]. Umemura i wsp. zaproponowali wykorzystanie fragmentów egzoszkieletów biokrzemionki okrzemkowej, jako matrycy do luminescencji w fazie ciekłej [191]. Możliwość umieszczenia w strukturze pancerzyka okrzemek specyficznych białek, enzymów czy przeciwciał tworzy doskonałą perspektywę dla produkcji hybrydowych bioczuJNIKÓW, wielkości mikroczipa, będących przełomowym rozwiązaniem w dziedzinie medycyny [118,192,193].

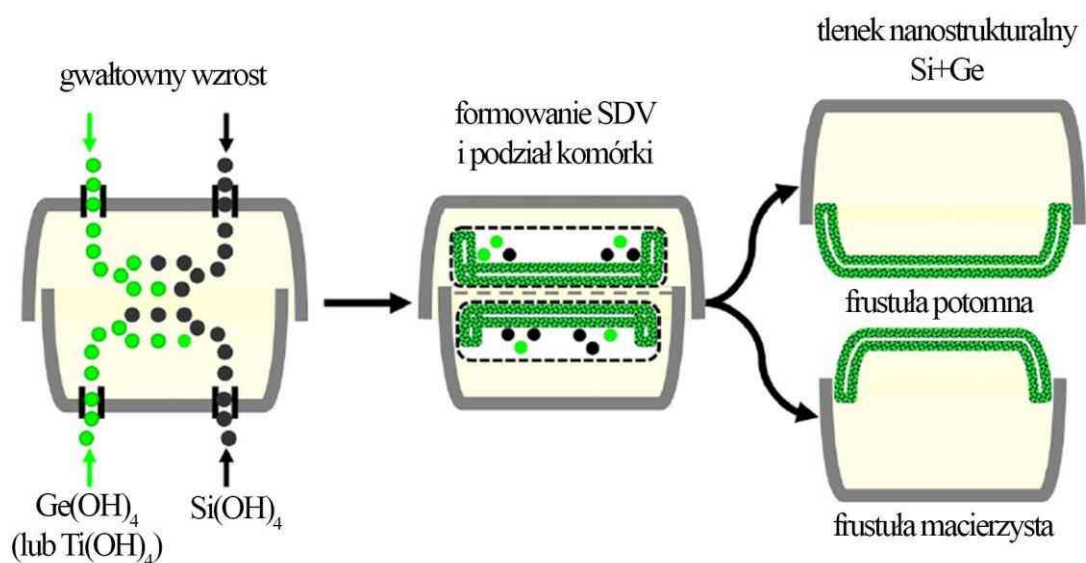
Zgodnie z dostępnymi wynikami badań dużym potencjałem aplikacyjnym wykazuje się zastosowanie krzemionki okrzemkowej jako składnika ogniwo słonecznych, zastępując tym samym droższy dwutlenek tytanu [115,194–196]. Niezwykle ciekawym, ale jeszcze nie do końca rozwiniętym pomysłem jest możliwość modyfikacji struktury biokrzemionki okrzemkowej. Istnieją dwie podstawowe metody funkcjonalizacji okrzemek [197]. Pierwsza z nich to metoda *in vitro* polegająca na przyłączeniu, na drodze reakcji kondensacji, grup funkcyjnych na powierzchni pancerzyka okrzemki po jego oczyszczeniu, czyli usunięciu organicznej matrycy komórki okrzemki. Druga to metoda *in vivo* oparta na stabilnym wbudowaniu elementu modyfikującego w nanostrukturalną architekturę biokrzemionki okrzemkowej w trakcie hodowli [198]. Metoda *in vitro* może być wykorzystana do nadania właściwości magnetycznych frustuli okrzemkowej poprzez dodanie nanocząstek żelaza poddanych działaniu dopaminy [199], a także do tworzenia matryc przeciwciał, które mogą być zastosowane w takich technikach jak immunoprecypitacja [111]. Funkcjonalizacja okrzemek *in vivo* jest możliwa po dodaniu do medium hodowlanego elementów modyfikujących. Umożliwia to wbudowanie elementu domieszkowanego w strukturę pancerzyka okrzemki. Dotychczas kilka publikacji donosi o zdolności okrzemek do metabolicznego wprowadzania tlenków metali takich jak tytan czy german w strukturę krzemionkowego szkielecika [200–212]. Istnieją również wyniki wstępnych badań nad możliwością metabolicznego podstawienia atomów krzemu niklem, cyrkonem, cyną, cynkiem, wapniem, aluminium, żelazem i europem w biokrzemionce okrzemkowej [161,201,213–220].

2.3.1. Tytan

Istnieje duże zainteresowanie bioinspirowanymi metodami syntezy półprzewodników i tlenków metali, zwłaszcza nanomateriałów z dwutlenku tytanu, ponieważ dają one możliwość samoorganizacji w trójwymiarowe, hierarchiczne

struktury. Systemy hodowli komórkowych zostały szczególnie wskazane jako podstawa biosyntezy nanostruktur fotonicznych [205].

Metoda metabolicznego wprowadzania jonów tytanu do komórek okrzemek, której schemat przedstawiono na Rys. 12 [221], została po raz pierwszy opracowana przez C. Jeffryesa i wsp. [205] z wykorzystaniem nienazwanego gatunku reprezentującego rodzaj *Pinnularia*.



Rys. 12. Prawdopodobny schemat metabolicznego wprowadzania Ge lub Ti do komórki okrzemki podczas hodowli [221].

Domieszkowanie było prowadzone w procesie dwuetapowym, w specjalnie przygotowanym do tego celu fotobioreaktorze. W pierwszym etapie okrzemki hodowano bez obecności prekursora tytanu w medium hodowlanym, aż do całkowitego zużycia krzemu (początkowe stężenie krzemu wynosiło 0,5 mM). W drugim etapie medium hodowlane zasilano roztworem zawierającym 30 mM metakrzemianu sodu i 0,5-4,5 mM rozpuszczalnego związku tytanu TiCl_4 , powstałego w wyniku syntezy TiOSO_4 i NaOH oraz rozpuszczeniu w 500 mM HCl . Skolem [208] podążyła tym samym tropem, wykorzystując schemat dwuetapowego procesu domieszkowania okrzemek w fotobioreaktorze i przeprowadziła szereg eksperymentów domieszkowania jonami

tytanu krzemionkowych pancerzyków okrzemek z gatunku *Pinnularia* sp. i *Coscinodiscus* sp., testując, w pierwszym etapie, różne kombinacje poziomu głodu krzemowego. Drugi etap polegał na dodawaniu do medium hodowlanego roztworu zasilającego zawierającego 3,6 – 8,9 mM Si i 0,36 – 0,62 mM Ti w postaci $TiCl_4$. W badaniach Chauton i wsp. [207] także wykorzystano dwuetapowy proces domieszkowania jonami tytanu okrzemek z gatunku *Pinnularia* sp. i taki sam prekursor tychże jonów, inicjując pobieranie tytanu w momencie, gdy stężenie krzemu w pożywce hodowlanej było mniejsze niż 0,5 μM . W pracy Eynde i wsp. [206] analogicznym było zastosowanie schematu dwuetapowego procesu domieszkowania *Pinnularia* sp., z tą różnicą, iż dodanie prekursora tytanu nastąpiło w momencie zakończenia wzrostu komórek, a nie w momencie pojawienia się głodu krzemowego. Natomiast, Maeda i wsp. [209] zastosowali w procesie dwuetapowego domieszkowania *Fistulifera solaris* jonami tytanu, używając TiBALDH (ang. *titanium(IV) bis(ammonium lactato)dihydroxide*) jako jego prekursora.

Metoda prowadzenia jednoetapowego procesu domieszkowania biokrzemionki okrzemek była wykorzystywana przez inne grupy badawcze. W pracy Basharina i wsp. [201] hodowla okrzemek z gatunku *Synedra acus* prowadzona była w mikroinkubatorach do których jednocześnie dodawano roztwór podstawowy, zawierający 10 mM Na_2SiO_3 i 10 mM $TiCl_4$. Podobne podejście przyjął Lang i wsp. [210], dodając do medium hodowlanego, w hodowli *Thalassiosira weissflogii*, 0,2 – 2,0 mM TiBALDH. Porównanie zastosowanych metod, parametrów hodowli oraz rodzajów prekursorów jonów tytanu znajduje się w Tab. 3.

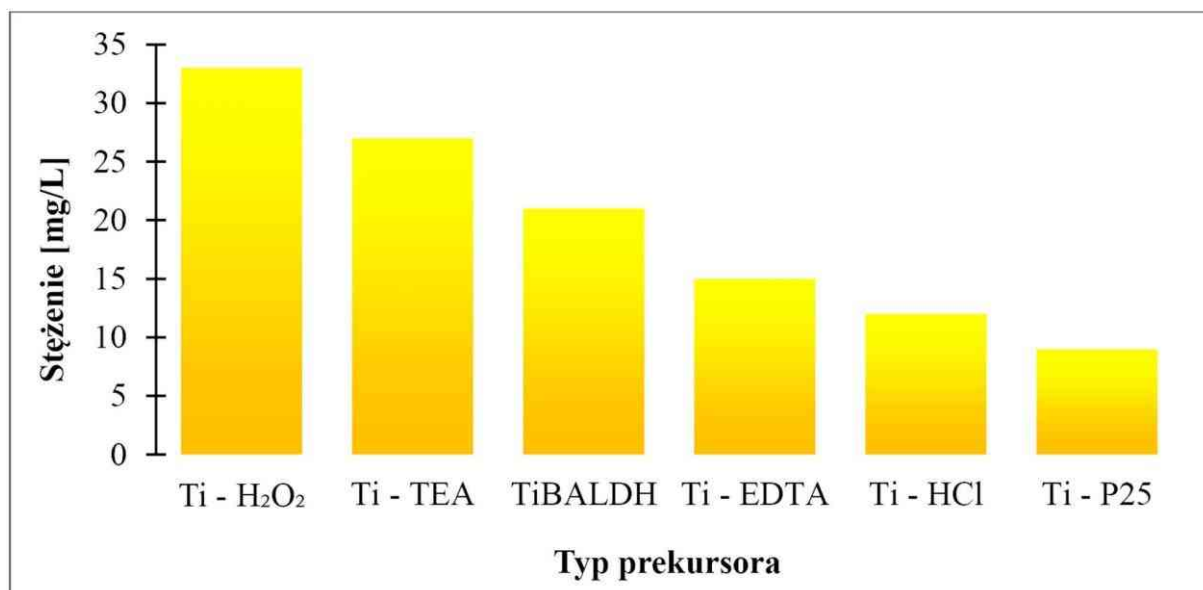
Tab. 3. Zestawienie stosowanych metod metabolicznego domieszkowania biokrzemionki okrzemkowej jonami tytanu:

Ref.	[205]	[208]	[201]	[206]	[210]	[207]	[209]
Gatunek	<i>P. sp.</i>	<i>P. sp.</i> ; <i>Cos.</i>	<i>S. ac.</i>	<i>P. sp.</i>	<i>T. weiss.</i>	<i>P. sp.</i>	<i>F. sol.</i>
Medium hodowlane	F/2	F/2	DM	WC	F/2	F/2	F/2
Światło [μmol/ m ² /s]	149	130	13- 16	30	246	130	140
Temperatura [°C]	22	20	12	20	16-22	20	25
pH	8,4 – 8,6	8,0- 8,35	7,4	7,6 – 8,4	-	8,0 – 8,4	6,4
Typ procesu	II	II	I	II	I	II	II
Prekursor	TiOSO ₄	TiOSO ₄	TiCl ₄	TiBALDH	TiBALDH	TiOSO ₄	TiBALDH
[Si] [mM]	0,48	3,6-8,9	10	-	0,2	6,2	-
[Ti] [mM]	0,0085- 0,073	0,36 – 0,62	10	0,0 – 0,56	0,2-2,0	0,36	0,25-20

Uwagi: Ref. - Referencje; *P. sp.* - *Pinnularia sp.*; *Cos.* - *Coscinodiscus*; *S. ac.* - *Synedra acus*; *T. weiss.* - *Thalassiosira weissflogii*; *F. sol.* - *Fistulifera solaris*; I – proces jednoetapowy; II – proces dwuetapowy; TiOSO₄ - TiOSO₄+NaOH/HCl; [Si], [Ti] – zawartość Si i Ti w medium hodowlanym;

Prace opisujące wpływ wprowadzenia tytanu do struktury pancerzyków okrzemek [207,208,210] wskazują na brak toksycznego efektu jonu na komórki okrzemek. Badania SEM i TEM przeprowadzone na domieszkowanych szkielecikach ilustrowały prawidłowo rozwinięte struktury bez jakichkolwiek aberracji w układzie porów. Nie zaobserwowano również ingerencji jonów tytanu w cykl komórkowy domieszkowanych okrzemek. Jedynie w pracy Basharina i wsp. [201] odnaleźć można

adnotację dotyczącą spadku wytrzymałości mechanicznej domieszkowanych struktur pancerzyków okrzemek. W większości przypadków, podczas prowadzenia metabolicznej insercji jonów tytanu, zaobserwowano istotne zwiększenie ilości wyprodukowanej biomasy. Tylko w eksperymencie przeprowadzonym przez Skolem i wsp. [208], odnotowano mniejszą wydajność biomasy okrzemek w porównaniu z próbą kontrolną.



Rys. 13. Wartość granicznego stężenia inhibicji w zależności od rodzaju zastosowanego prekursora tytanu: Ti – H₂O₂: Ti- nadtlenuk wodoru; Ti - TEA: Ti – trietanolamina; TiBALDH: diwodorotlenek tytanu(IV) bis(mleczanu amonu); Ti-EDTA: Ti - kwas etylenodiaminotetraoctowy; Ti-HCl: tytan trawiony kwasem, hydrolizowany; Ti - P25: tlenek tytanu(IV);

Badania przeprowadzone przez Eynde i wsp. [206] ukazały, iż inhibicja procesu wzrostu komórek jest zależna od rodzaju zastosowanego prekursora tytanu w medium hodowlanym w hodowli *Pinnularia* sp. (Rys. 13).

Maeda i wsp. [209] zauważyli, że wpływ prekursora na wzrost komórek okrzemek jest odmienny dla różnych gatunków okrzemek. Stosując TiBALDH jako prekursor jonów tytanu wykazał, że wzrost *P. tricornutum* i *T. pseudonana* został całkowicie zahamowany przez obecność 2,0 mM TiBALDH, podczas gdy zahamowanie wzrostu *F. solaris* przez to samo stężenie TiBALDH nie był znaczące. Statystycznie istotne

hamowanie wzrostu komórek *F. solaris* wystąpiło przy 5,0 mM TiBALDH, podczas gdy stężenia *P. tricornutum* i *T. pseudonana* były hamowane przy 1,0 mM i 0,5 mM TiBALDH, odpowiednio. Według danych badań Lang i wsp. [210] wzrost komórek *T. weissflogii* był hamowany przez 2,0 mM TiBLADH.

Tab. 4. Zestawienie stosowanych warunków hodowli okrzemek oraz stopnia inkorporacji tytanu do biokrzemionki okrzemkowej.

Ref.	[205]	[208]	[201]	[206]	[210]	[207]	[209]
Gatunek	<i>P. sp.</i>	<i>P. sp.</i> <i>Cos.</i>	<i>S. ac.</i>	<i>P. sp.</i>	<i>T. weiss.</i>	<i>P. sp.</i>	<i>F. sol.</i>
Prekursor	TiOSO ₄	TiOSO ₄	TiCl ₄	TiBALDH	TiBALDH	TiOSO ₄	TiBALDH
[Ti] [mM]	0,0085- 0,073	0,36 – 0,62	10	0,0 – 0,56	0,2-2,0	0,36	0,25-20
Ti:Si [%at.]	0,6	0,34	0,16	3,2	20	0,62	6,02
Ti:Si [%wag.]	2,3	0,93	0,6	10,4	34	2,37	10,6
Metoda analizy	ICP- AES	EDS	ICP-MS	ICP-MS	EDS	ICP-MS	ICP-AES

Porównując wyniki badań wbudowywania tytanu w pancerzyki okrzemek można zauważyć, iż w każdym eksperymencie uzyskano nierównomierną dystrybucję tytanu w strukturze krzemionkowego pancerzyka. Zauważono, że większe stężenie tytanu występuje w pobliżu porów, aniżeli w pobliżu żebra pancerzyka. Sama zawartość domieszkowanego tytanu w szkielecikach okrzemek różni się jednak znacząco w opublikowanych wynikach różnych grup badawczych. Ponadto, różne stężenia inkorporowanego tytanu przez okrzemki były wykryte przez różne grupy badawcze, które stosowały w eksperymencie taki sam prekursor jonów tytanu. Jeffryes i wsp. [205]

uzyskali zawartość inkorporowanego tytanu do biokrzemionki okrzemkowej na poziomie 0,6% at. Ti/Si. Zarówno Maeda [209], Van Eynde [206] jak i Lang [210] uzyskali wyższe wartości stężenia tytanu inkorporowanego do struktury pancerzyka okrzemek. Najwyższą, jak do tej pory zawartość inkorporowanego tytanu uzyskano przy użyciu TiBALDH jako prekursora tytanu. Zestawienie uzyskanych wyników domieszkowania jonów tytanu do biokrzemionki okrzemkowej zamieszczono w Tab. 4.

2.3.2. German

Istnieje duże zainteresowanie osadzaniem germanu w skali nano w krzemionce o właściwościach dielektrycznych dla zastosowań optoelektronicznych. Kontrolowane, metaboliczne wprowadzanie germanu do krzemionki może wytworzyć nanokompozyt krzemowo-germanowy osadzony w mikrostrukturze egzoszkieletu. Ten nanokompozyt Si-Ge mógłby nadać tej trójwymiarowej strukturze właściwości optoelektroniczne i jednocześnie w sposób kontrolowany zmieniać mikrostrukturę [212]. Wczesne badania zawartości germanu w okrzemkach były związane z toksycznością tego pierwiastka dla komórek okrzemek, zwłaszcza z jego wpływem na hamowanie tworzenia się krzemionkowego pancerzyka okrzemek [222–224].

Lewin w swojej pracy [222] zauważył, iż zawartość zaledwie 1,0 μM GeO_2 znacząco hamuje wzrost okrzemek. Wykazał również, iż najmniej wrażliwymi na hamujący wpływ GeO_2 były okrzemki z gatunku *Phaeodactylum tricornutum*, które posiadały także najmniejszą ilość krzemionki w swoim pancerzyku. Okazało się, że działanie GeO_2 hamujące wzrost okrzemek można obniżyć, dodając odpowiednio większą ilość SiO_2 do pożywki hodowlanej [222]. Taki wniosek też zgadza się z założeniem, które wysnuł Richter [225] mówiącym o tym, iż okrzemki wykazują bezwzględne zapotrzebowanie na SiO_2 w fazie swojego wzrostu. Wyniki te oraz chemiczne podobieństwo germanu

i krzemu mogą sugerować, że toksyczne działanie krzemu powoduje hamowanie tworzenia się krzemionkowego pancerzyka okrzemek. Wpływ germanu na procesy metaboliczne okrzemek wykazał Werner [223] wskazując, iż Ge(OH)_4 całkowicie zatrzymuje syntezę chlorofilu w *Cyclotella cryptica* i mniej skutecznie syntezę białek. Podobne wnioski dotyczące wpływu germanu na metabolizm okrzemek wyciągnął Azam [224] obrazując, że wysokie stężenia Ge(OH)_4 hamują syntezę chlorofilu i fotosyntetyczne wiązanie węgla przez okrzemki. Wyniki badań uzyskane całkiem niedawno przez Basharina i wsp. [201] także potwierdziły toksyczny wpływ jonów germanu(IV) na komórki okrzemek. Zaobserwowano, iż zmianie ulega kształt pancerzyków oraz ich pogrubienie, wyglądające jak dodatkowa warstwa krzemionki. Włączenie germanu do struktury pancerzyka okrzemek prowadziło do różnego stopnia jego aberracji [201]. Mubarak Ali [204] wykazał również, iż zwiększenie stężenia germanu w medium zasilającym hodowlę *Stauroneis* sp. powodowało zwiększenie stopnia aberracji pancerzyka. W pracy Qin i wsp. [202] zauważono, iż metaboliczna insercja germanu powoduje zmniejszenie w pancerzykach średnicy porów. Odmienną obserwację opisał Gale [203] wskazując na to, iż metaboliczne domieszkowanie germanu powoduje stopienie się mniejszych porów w większe, przyjmując postać szczelin. Według Basharina i wsp. [201] toksyczny wpływ Ge(OH)_4 może być związany z przedwczesną kondensacją Si(OH)_4 , która zachodzi bez kontroli komórkowej i powoduje powstawanie złóż stałej krzemionki w niewłaściwych miejscach. W przeprowadzonych badaniach metabolicznej insercji biokrzemionki okrzemkowej jonami germanu stosowano dwuetapową [200,202–204,211], jak również jednoetapową metodę hodowli okrzemek [200,201]. Zestawienie stosowanych warunków hodowli okrzemek oraz stopnia inkorporacji germanu umieszczono w Tab. 5.

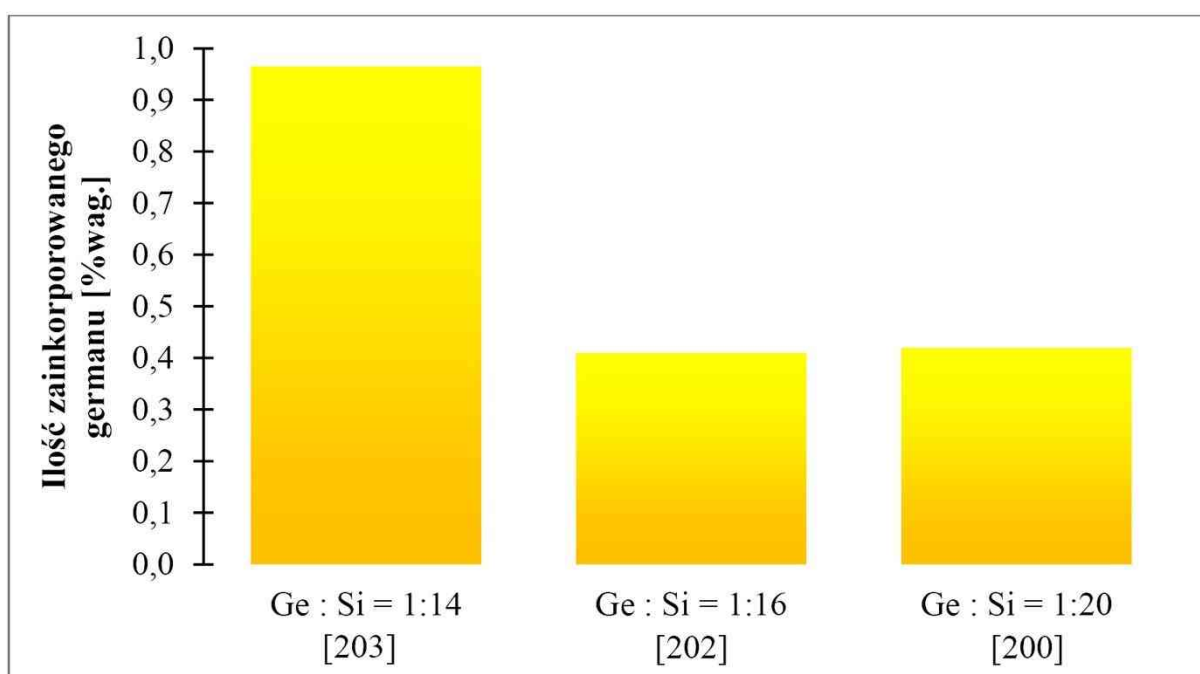
Tab. 5. Zestawienie stosowanych warunków hodowli okrzemek oraz stopnia inkorporacji germanu do biokrzemionki okrzemkowej

Ref.	[211]	[212]	[201]	[200]	[202]	[203]	[204]
Gatunek	<i>N. frust.</i>	<i>P. sp.</i>	<i>S. ac.</i>	<i>T. pseudo.</i>	<i>N. frust.</i>	<i>P. sp.</i>	<i>Stauro.</i>
Medium hodowlane	LDM	LDM	DM	-	UTEX #2042	UTEX #B679	F/2
Światło [μmol/ m ² /s]	125	50	13-16	-	150	150	164
Temperatura [°C]	22	22	12	-	22	22	-
pH	8,2-8,4	8,3	7,4	-	8,4-8,9	-	-
Typ procesu	II	II	I	I	II	II	II
Prekursor	Ge(OH) ₄	GeO ₂	TiCl ₄	Ge(OH) ₄	GeO ₂	GeO ₂	GeO ₂
[Ge] [mM]	0,384	0,53	0,11	0,1	0,72	0,78	1,07
Ge_{inkorp.}	2,74 mg Ge/g DCW	0,965 %wag.	5,1% mol Ge/Si	0,42% wag.	0,411 %wag.	0,965% wag.	bd

Uwagi: *N. frust.* - *Nitzschia frustulum*; *T. pseudo.* - *Thalassiosira pseudonana*; *Stauro.* - *Stauroneis sp.*; [Ge] – zawartość Ge w medium hodowlanym/zasilającym; Ge_{inkorp.} - zawartość germanu zainkorporowanego do pancerzyka okrzemek; LDM – Lewina medium hodowlane okrzemek morskich (Lewin's marine diatom medium); DCW – sucha masa komórek (ang. *dry cell weight*); % wag.- % wagowy biokrzemionki; bd – brak danych;

We wszystkich pracach dotyczących badań metabolicznej inkorporacji germanu wykryto nierównomierną jego dystrybucję w strukturze biokrzemionki okrzemkowej

[200–204,211,212]. Jeffryes [212] zauważył, iż german został zdyspergowany w krzemionce w postaci skupisk zarówno w skali submikronowej jak i nanometrowej. Podobne wyniki badań uzyskał Mubarak Ali [204], wskazując na brak jednorodności rozmieszczenia germanu w komórkach okrzemek. Zawartość germanu w strukturze pancerzyków okrzemek oscyluje w okolicach 1,0% wagowego we wszystkich dotychczas opublikowanych pracach. Widoczna w nich jest także zależność ilości zainkorporowanego germanu do krzemionkowego pancerzyka od początkowego stosunku stężenia Ge/Si w medium hodowlanym (Rys. 14).



Rys. 14. Zależność ilości zainkorporowanego germanu do krzemionkowego pancerzyka od początkowego stosunku stężenia Ge/Si w medium hodowlanym

Przekroczenie pewnej granicznej wartości stosunku stężenia Ge/Si ($\text{Ge:Si} = 1:100$) powoduje spadek inkorporacji germanu do struktury pancerzyka [200]. Obniżenie stopnia wbudowywania jonów germanu do szkielecika okrzemki widoczne jest także w momencie, gdy stosunek Ge/Si jest niższy niż $\text{Ge:Si} = 1:4,5$ [211]. Optymalnym

stosunkiem Ge/Si, przy którym uwidacznia się liniowa zależność pomiędzy ilością zainkorporowanego germanu, a ilością biomasy jest stosunek Ge/Si = 0,1 [224].

2.3.3. Glin

Machil i wsp. [216] przeprowadzili badania dotyczące wprowadzenia aluminium do struktury morskiej okrzemki *Stephanopyxis turris*. W badaniach stosowano sztuczną wodę morską zawierającą różne stężenia glinu (10,5; 42,5; 105,5 oraz 1055 μM) w postaci AlCl_3 . Stężenia te odpowiadają stosunkom masy Al/Si wynoszącym odpowiednio 1:10; 1:2,5; 1:1 i 10:1. Zaobserwowano, iż stężenie 10,5 μM pozwala uniknąć niekontrolowanego wytrącania glinu.

Analiza SEM, wykonana w celu oceny wpływu aluminium na morfologię ścian komórkowych okrzemek, nie wykazała żadnych znaczących różnic morfologicznych w porównaniu z morfologią okrzemek hodowanych bez dodatku glinu do pożywki hodowlanej. Zarówno dla próbki zawierającej okrzemki wzbogacone jonami glinu jak i próbki okrzemek naturalnych wykryto taki sam rozmiar i strukturę ściany komórkowej. Włączenie glinu do biokrzemionki wykryto za pomocą analizy ICP-OES (emisyjnej atomowej spektrometrii z indukcyjnie sprzężoną plazmą; ang. *inductively coupled plasma – optical emission spectroscopy*) wyekstrahowanych ścian komórkowych. Kwantyfikacja wykazała, że ilość wbudowanego aluminium w pancerzykach okrzemek gwałtownie wzrosła w środowisku wzbogaconym w aluminium, aczkolwiek nie podano wartości zawartości zainkorporowanego glinu. Zaobserwowano, iż największym otrzymanym stosunkiem Al:Si był stosunek 1:15. Biokrzemionka okrzemkowa domieszkiwana jonami glinu może być bardzo cennym materiałem stosowanym w katalizie ze względu na wysoką aktywność katalityczną [199].

2.3.4. Nikiel

W pracy Townley i wsp. [161] zaprezentowano wyniki badań domieszkowania jonami niklu komórek *Coscinodiscus wailesii*, zastosowanego w celu modyfikacji właściwości optycznych pancerzyków tego gatunku. Hodowle wybranego gatunku okrzemki prowadzono w medium sterylnie przefiltrowanej wody morskiej zawierającej pożywkę Alga-Gro z dodatkiem siarczanu(VI) niklu o stężeniu odpowiednio 5,0; 1,0; 0,5 i 0,1 mg/L. Zaobserwowano, iż maksymalnym stężeniem niklu, w obecności którego nie są widoczne znaczące zmiany we wzroście okrzemek jest stężenie równe 0,5 mg/L. Analiza SEM okrzemek wzbogaconych w nikiel wykazała, iż pory w ich szkielecikach wykazują bardziej nieregularny wzór, są większe i mniej jednolite w kształcie. Badania morfologii cytoplazmatycznej *C. wailesii* hodowanej w obecności siarczanu niklu wykazały przerwanie stosów tylakoidów oraz obrzęk mitochondriów. Wraz ze wzrostem stężenia niklu w pożywce hodowlanej została także wygaszona fotoluminescencja krzemionkowych frustul. Zawartość niklu w pancerzykach okrzemek wynosiła ok. 0,1% wag. i została potwierdzona metodą EDX. Biokrzemionka okrzemkowa domieszkowana jonami niklu może być wykorzystana w zastosowaniach biotechnologicznych ze względu na swoje unikalne właściwości optyczne.

2.3.5. Europ

Luminofory krzemianowe są obiecującymi materiałami luminescencyjnymi ze względu na ich stabilność chemiczną, odporność na wilgoć i niski koszt. Materiały te mogą być stosowane w różnych rodzajach ekspozycji, takich jak lampy fluorescencyjne, panele plazmowe, wyświetlacze z emisją polową i lampy katodowe. Zhang i wsp. [220] opublikowali wyniki dotyczące domieszkowania biokrzemionki okrzemkowej europem. Domieszkowanie to zostało przeprowadzono stosując hodowlę okrzemek *Navicula* sp. z dodatkiem w postaci prekursora europu, jakim był sześciowodny azotan(V) europu(III)

$(\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O})$ w stosunku 1 mol Eu na 4 mol Si w medium hodowlanym [220]. Hodowla była prowadzona przez 96 h, następnie komórki krzemkowe były ekstrahowane etanolem w celu usunięcia rozpuszczalnego w alkoholu materiału organicznego i pozostałości stałe wyżarzano termicznie w powietrzu w temperaturze 1000°C . Badanie XRD (dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego; ang. *X-ray diffraction*) wykazało obecność europu w postaci Eu_2O_3 i Eu_2SiO_5 . Domieszkowana europem biokrzemionka krzemkowa wykazywała właściwości fotoluminescencyjne z emisją w zakresie światła czerwonego (614 nm) i wzbudzeniu przy 394 nm.

2.3.6. Wapń

Wyniki badań domieszkowania biokrzemionki krzemkowej kationami wapnia w celu wykorzystania uzyskanego materiału w biomedycynie opublikowano niedawno przez Leone i wsp. [214]. Idea tej pracy bazowała na wiadomościach, że fibroblasty i osteoblasty bardzo dobrze rosną na podłożach krzemionkowych czy ceramicznych, a obecność jonów wapnia stymuluje wzrost tych komórek. Domieszkowaną wapniem biokrzemionkę uzyskano w trakcie hodowli okrzemek *Thalassiosira weissflogii* w autoklawowanej i ultrafiltrowanej wodzie morskiej przy kontrolowanej temperaturze $18\text{-}22^\circ\text{C}$ z dodatkiem wapnia w postaci CaCl_2 (14 mM) do pożywki hodowlanej. Przeprowadzone badania SEM dowiodły, że wprowadzanie wapnia do hodowli okrzemek nie wpływa na ich kształt i strukturę. Badania FTIR wykazały, że w uzyskanej biokrzemionce nie występują kowalencyjne wiązania z wapniem, ale, co interesujące, wapń pozostaje w pancerzykach, pomimo działania 30% nadtlenu wodoru usuwającego z komórek okrzemek materię organiczną. Wykryta zawartość wapnia w domieszkowanych pancerzykach znajdowała się w przedziale $0,9 \pm 0,05\%$ wag. Otrzymane wyniki potwierdziły także, że domieszkowana wapniem biokrzemionka może

służyć jako skuteczne podłoże do wzrostu fibroblastów i osteoblastów z możliwymi zastosowaniami w medycynie regeneracyjnej.

Li i wsp. [215] również podjęli problem związany z domieszkowaniem okrzemek jonami wapnia. W swoich badaniach zajmowali się szczepem *Coscinodiscus* sp. Włączanie wapnia do okrzemkowych frustul osiągnęto poprzez wprowadzanie chlorku wapnia CaCl_2 do pożywki hodowlanej o stężeniach 0,125; 0,25; 0,50; 1,0 i 2,0 mM. Okrzemki hodowano w ultrafiltrowanej i autoklawowanej wodzie morskiej wzbogaconej roztworem F/2 Guillard w temperaturze 21°C.

Tab. 6. Zestawienie parametrów dotyczących domieszkowania biokrzemionki okrzemkowej jonami wapnia;

Ref.	[214]	[215]
Gatunek	<i>T. weiss.</i>	<i>Cos.</i>
Prekursor	CaCl_2	
Medium hodowlane	F/2	F/2
Światło [$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$]	bd	246
Temperatura [°C]	18-22	21
pH	bd	
$\text{Ca}_{\text{inkorp.}}$ [%wag.]	0,9	bd

bd – brak danych

Obecność jonów wapnia w strukturze pancerzyków okrzemek potwierdzono za pomocą XRD i EDX, jednak nie podano konkretnych wartości. Podobnie jak w przypadku Leone [214], również w pracy Li i wsp. [215] obecność jonów wapnia

w medium hodowlanym nie spowodowała istotnych zmian w morfologii okrzemek, a autorzy wskazali, że otrzymany materiał może być stosowany jako hemostatyk. Szczegółowe dane dotyczące warunków domieszkowania biokrzemionki okrzemkowej jonami wapnia przedstawiono w Tab. 6.

2.3.7. Cyrkon i cyna

Wpływ cyrkonu i cyny na wzrost, morfologię i skład chemiczny słodkowodnej okrzemki *Synedra acus* był zbadany przez Basharina i wsp. [201]. W badaniach stosowano mikroinkubatory, zawierające medium hodowlane z dodatkiem 10 mM Na_2SiO_3 i 10 mM Na_2SnO_3 lub ZrCl_4 . Odnotowano, że domieszki jonów cyrkonu i cyny powodowały niewielki spadek tempa wzrostu komórek okrzemek. Komórki okrzemek domieszkowanych cyną i cyrkonem cechowały się nieregularnością otoczek, a także zmniejszeniem wytrzymałości mechanicznej ściany pancerzyków. Analiza uzyskanej biomasy oraz oczyszczonej biokrzemionki okrzemkowej wykazała obecność cyny i cyrkonu w komórkach, aczkolwiek zawartość tych pierwiastków była stosunkowo niewielka (3,4 % mol Zr/Si i 0,91% mol Sn/Si).

W celu uzyskania nanoporowatych kompozytów okrzemki- ZrO_2 Gannavarapu i wsp. [213] przeprowadzili badania hodowli okrzemki *Phaeodactylum tricornutum*, stosując jako medium hodowlany sztuczną wody morską przy pH równym 9 z dodatkiem 0,8 mM $\text{ZrOCl}_2 \times 8\text{H}_2\text{O}$. Obecność tlenków cyrkonu ZrO_2 na powierzchni pancerzyków *P. tricornutum*, było potwierdzone za pomocą analizy EDX. Zaobserwowano przy tym także znaczące zmniejszenie wielkości komórek okrzemek. Uzyskany kompozyt był testowany z powodzeniem jako czujnik elektrochemiczny w kierunku wykrywania parationu metylowego - pestycydu fosforoorganicznego.

2.3.8. Cynk i żelazo

W celu sprawdzenia czy okrzemki są w stanie inkorporować znaczące ilości cynku i żelaza Ellwood i Hunter [219] hodowali morskie okrzemki z gatunku *Thalassiosira pseudonana* w wodzie morskiej z dodawaniem soli Zn lub Fe. Zauważono, iż wraz ze wzrostem stężenia wolnego Zn^{2+} w pożywce wzrastała szybkość wzrostu komórek okrzemek. I odwrotnie – im mniej wolnego Zn^{2+} w pożywce, tym obserwowano wolniejsze tempo wzrostu okrzemek. Dowiedziono, że ograniczenie dostępu okrzemek do wolnego Zn^{2+} powoduje zmniejszenie rozmiaru komórek *T. pseudonana*, w porównaniu z okrzemkami hodowanymi w warunkach nieograniczonego dostępu do wolnego Zn^{2+} . Analiza składu chemicznego uzyskanej biokrzemionki potwierdziła włączenie jonów cynku i żelaza do struktury biokrzemionki okrzemkowej. W przypadku inkorporacji jonów cynku stwierdzono, że ilość Zn^{2+} wprowadzona do okrzemkowej frustuli ($2-5 \times 10^{-17}$ mol/komórka×dzień) jest bezpośrednio związana z ilością cynku pobraną przez okrzemkę, a to z kolei związane jest bezpośrednio ze stężeniem wolnego Zn^{2+} w środowisku hodowlanym. W przypadku inkorporacji jonów żelaza nie wykryto wprost proporcjonalnej zależności zawartości inkorporowanego żelaza do jego stężenia w pożywce hodowlanej. Nie określono także konkretnej wartości ilości zainkorporowanego żelaza do komórki okrzemki.

Kontynuacją badań opisanych w pracy Ellwood i Hunter [219], były badania Jaccard i wsp. [218]. Hodowali oni okrzemki z gatunku *Stephanodiscus hantzschii* w zmodyfikowanym medium CHU-10 [226] z dodatkiem kompleksu Zn-EDTA, o zawartości jonów cynku $10^{-10,6}$ – $10^{-7,6}$ M.

Tab. 7. Zestawienie wyników domieszkowania okrzemek jonami metali

	Al	Ni	Eu	Zr/Sn	Zn	Fe		
Referencje	[216]	[161]	[220]	[201]	[213]	[219]	[218]	[219]
Gatunek	<i>S. tur.</i>	<i>Cos.</i>	<i>Navi.</i>	<i>S. ac.</i>	<i>P. trico.</i>	<i>T. pseudo.</i>	<i>S. hanz.</i>	<i>T. pseudo.</i>
Medium hodowlane	ASW	Alga-Gro	„Ningbo 3”	DM	Aquil	F/2	CHU-10	F/2
Światło [μmol/m ² /s]	82	-	246	13-16	-	120	50	120
Temperatura [°C]	18	22	25	12	19	20-22	20	20-22
pH	8,0-8,2	-	-	7,4	9	7,2-8,3	6,4	8,0
Typ procesu	I	I	II	I	I	II	II	II
Prekursor	AlCl ₃	NiSO ₄	Eu(NO ₃) ₃ × 6H ₂ O	ZrCl ₄	ZrOCl ₂ × 8H ₂ O	Zn-EDTA	Zn-EDTA	Fe-EDTA
X_{inkorp.}	-	~ 0,1% wag.	-	3,4% mol Zr/Si; 0,91% mol Sn/Si	-	2-5 × 10 ⁻¹⁷ mol Zn/kom. × dzień	-	-

Uwagi: *S. tur.*- *Stephanopyxis turris*; *Navi.* - *Navicula*; *P. trico.*- *Phaeodactylum tricorutum*; *S. hanz.* - *Stephanodiscus hantzschii*; X_{inkorp.}- zawartość zainkorporowanego pierwiastka do pancerzyka okrzemek, gdzie X = Al, Ni, Eu, Zr, Sn, Zn, Fe; kom. – komórki;

Obecność jonów cynku w strukturze pancrzyków okrzemek potwierdzono badaniem ICP-MS. Nie podano wartości zawartości zainkorporowanego cynku. Stwierdzono tylko, iż największy stopień inkorporacji jonów cynku do struktury pancrzyka okrzemek osiągnięto przy stężeniu Zn^{2+} wynoszącym $10^{-8.5}M$.

Zestawienie stosowanych warunków hodowli okrzemek oraz stopnia metabolicznej insercji pierwiastków (Al, Ni, Eu, Zr, Sn, Zn, Fe) do biokrzemionki okrzemkowej przedstawiono w Tab. 7.

3. CEL PRACY

Nadrzędnym celem niniejszej pracy doktorskiej było wytworzenie nowych 3D mikro-nanostrukturyzowanych kompozytów krzemionkowych na bazie biokrzemionki okrzemkowej, które łączyłyby w sobie hierarchiczną uporządkowaną trójwymiarową strukturę biokrzemionkowych frustul okrzemek z ich unikalnymi właściwościami optycznymi, periodycznym systemem porów, dobrymi właściwościami mechanicznymi i termicznymi, chemiczną obojętnością i kompatybilnością biologiczną oraz specyficzne funkcjonalne właściwości (katalityczne, optyczne, antibakteryjne) domieszkowanych pierwiastków (Ti, V, Nd, Ag). W syntezie zaprojektowanych kompozytów zakładano wykorzystanie metody metabolicznego domieszkowania komórek okrzemek przez wybrane metale w trakcie hodowli wybranego gatunku okrzemek (*Pseudostaurosira trainorii*) w warunkach laboratoryjnych manipulując warunkami hodowli, składem pożywki i stężeniem domieszkowanych pierwiastków oraz metodę impregnacji uzyskanej biokrzemionki roztworem soli metali. Propozycja włączenia wybranych pierwiastków do biokrzemionki okrzemek opierała się na znanych zdolnościach tych pierwiastków do izomorficznego zastępowania atomów krzemu w strukturze krzemionki i minerałów krzemianowych, jak również możliwościach komórek okrzemek do metabolicznego wprowadzania różnych metali do ich krzemionkowych frustul.

Hipotezy i zadania badawcze:

1. Uzyskanie mikro-nanokompozytów 3D ustrukturyzowanej biokrzemionki okrzemkowej oraz biomasy okrzemek domieszkowanych nanocząstkami tytanu (Ti/DBioSiO₂ i Ti/DB) z wykorzystaniem oryginalnej metody metabolicznej insercji tytanem podczas kontrolowanej hodowli okrzemek w warunkach laboratoryjnych. Po raz pierwszy do tego celu wykorzystano organiczny prekursor

jonów tytanu, jakim jest tertbutanolan tytanu. Zadaniem badawczym było przeprowadzenie serii eksperymentów związanych z doborem odpowiedniego pH, początkowego stężenia tytanu i krzemu oraz optymalnego stosunku stężenia tytanu do krzemu w medium hodowlanym okrzemek, w celu określenia optymalnych warunków metabolicznego wprowadzania tytanu do komórek okrzemek. W celu optymalizacji procesu biosyntezy zaprojektowanych kompozytów zaplanowane były również badania kinetyki absorpcji azotanów, fosforanów, krzemu i tytanu przez komórki okrzemek z medium hodowlanego.

2. Synteza nowych hybrydowych kompozytów AgNPs/TiO₂/pirolizowana biomasa okrzemek zawierających nanocząstki ditlenku tytanu pokrytych epitaksjalną warstwą nanocząstek metalicznego srebra z konsekwentnym wykorzystaniem metody metabolicznego domieszkowania komórek okrzemek tytanem w trakcie hodowli okrzemek oraz metody impregnacji domieszkowanej tytanem i pirolizowanej biomasy okrzemek roztworem azotanu srebra. Syntezę kompozytów zaprojektowano również w celu zbadania ich aktywności przeciwbakteryjnej wobec szczepów Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* oraz Gram-ujemnych *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* namnażanych laboratoryjnie jak również z izolatów klinicznych. Spodziewano się wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej kompozytów, zakładając synergistyczny efekt zawartych w nich nanocząstek dwutlenku tytanu i metalicznego srebra. Należy również podkreślić, iż chemiczna redukcja srebra miała być prowadzona przy użyciu nadtlenu wodoru jako ekologicznego środka redukującego, przestrzegając zasad „zielonej chemii”.
3. Opracowanie oryginalnej metody otrzymywania nowych mikro-nano ustrukturyzowanych kompozytów krzemionkowych o właściwościach anty-

Stokesowskiej luminescencji na bazie pirolizowanej biomasy okrzemek domieszkowanej metabolicznie nanocząstkami wanadanu neodymu (NdVO_4/DBP). Ważnym aspektem metody jest to, że biosynteza krystalicznych nanocząstek NdVO_4 właściwie jest przeprowadzana przez jednokomórkowe mikroalgi (okrzemki) w warunkach przyjaznych dla środowiska, w temperaturze pokojowej i w atmosferze otoczenia. Jest to nowatorskie podejście w rozwoju oryginalnych, ekologicznych metod syntezy nanocząstek NdVO_4 i otrzymania innych nowych materiałów kompozytowych z dodatkiem REE o specyficznej luminescencji up-konwersyjnej.

4. Badanie właściwości fizykochemicznych zsyntezowanych kompozytów (cech morfologicznych i strukturalnych, składu pierwiastkowego, składu mineralnego i struktury krystalicznej, potencjału zeta, właściwości fotoluminescencyjnych, charakteru i stabilności termicznej wiązań strukturalnych otrzymanych materiałów oraz specyfiki immobilizacji i dystrybucji pierwiastków domieszkowanych) stosując szereg metod instrumentalnych (LM, SEM, SEM-EDS, TEM, TEM-EDS, XRD, FTIR, TGA, ELS, ICP/MS, spektrofluorometria).

4. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

4.1. Hodowla wybranego gatunku okrzemek bez dodatku do medium hodowlanego pierwiastków modyfikujących

Czysty szczep okrzemki *Pseudostaurosira trainorii* uzyskano z Kolekcji Kultur Glonów Bałtyckich (CCBA) Instytutu Oceanografii Uniwersytetu Gdańskiego. Gatunek okrzemek został zdefiniowany przez CCBA jako *Opephora* sp. jednak wyniki badań cech morfologicznych pancerzyków przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej pozwoliły na zdefiniowanie tego gatunku jako *Pseudostaurosira trainorii* [4].

Fotobioreaktor o pojemności 25 L z pożywką Guillarda F/2 [227] (dostosowaną do końcowego pH wynoszącego 8,4) i kulturą okrzemek inkubowano w temperaturze 20°C, z zastosowaniem ciągłego napowietrzenia, w reżimie 24 h światła przy oświetleniu dwoma lampami fluorescencyjnymi o natężeniu 1500 lux. Początkowe stężenie rozpuszczalnego krzemu ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$) w pożywce wynosiło 7 mg/L.

4.1.1. Badanie kinetyki wzrostu biomasy komórek okrzemek

Tempo wzrostu komórek okrzemek kontrolowano przez codzienne pomiary optycznej gęstości biomasy za pomocą densytometru BIOSAN DEN-1B (Ryga, Łotwa) przy 565 nm.

4.1.2. Badanie kinetyki pobierania (absorpcji) przez komórki okrzemek składników odżywczych (Si, N, P) i zmiany wartości pH w medium hodowanym

Pobieranie przez komórki okrzemek pierwiastków związanych z tworzeniem i wzrostem komórek monitorowano fotometrycznie za pomocą testów Spectroquant®. Wykonane testy były kompatybilne ze spektrofotometrem Spectroquant NOVA 60 i dotyczyły poboru krzemu (Merck Spectroquant® test kit nr 1.14794, Kenilworth, NJ,

USA), fosforu (Merck Spectroquant® test kit nr 1.14848) i azotu (Merck Spectroquant® test kit nr 1.09713).

Absorpcję tytanu przez komórki okrzemek monitorowano przy użyciu spektrometru masowego z plazmą indukcyjnie sprzężoną Shimadzu ICP-MS 2030 (Kyoto, Japonia). Próbkę 5 mL zawierającą medium hodowlane były pobierane codziennie przez 12 dni hodowli. Zebrane próbki były następnie rozcieńczane 100-krotnie w ultraczystym 1% HNO₃.

4.2. Synteza kompozytów na bazie okrzemek z gatunku *Pseudostaurosira trainorii*

4.2.1. Synteza kompozytów biokrzemionki okrzemek domieszkowanej tytanem

Biomasę okrzemkową (DB) hodowano w fotobioreaktorach o pojemności 25 L zawierających medium hodowlane Guillarda F/2. Do pożywki dodawano źródło rozpuszczalnego krzemu w postaci metakrzemianu sodu (Na₂SiO₃ × 5H₂O) o stężeniu 7-300 mg Si/L oraz źródło rozpuszczalnego tytanu o stężeniu od 2,5 do 90 mg Ti/L. Rozpuszczalne źródło tytanu otrzymano przez rozpuszczenie tertbutanolanu tytanu(IV) (C₁₆H₃₆O₄Ti) w 37% kwasie solnym. pH podłoża hodowlanego zostało dostosowane do 8,9 za pomocą 0,1 M NaOH. Hodowlę prowadzono w temperaturze pokojowej (około 25°C) przy stałym napowietrzaniu i oświetleniu 1500 lux w odstępach dzień/noc 12:12 h przez 12 dni. Po okresie wzrostu uzyskaną biomasę filtrowano przez filtry Macherey Nagel 616 G (Düren, Niemcy) przy użyciu pompy próżniowej, przemywano wodą destylowaną i suszono w temperaturze 70°C. Tą metodą otrzymano kompozyt Ti/DB.

Biokrzemionka okrzemkowa (DBioSiO₂) domieszkowana jonami tytanu została wyizolowana z wysuszonej biomasy przy użyciu 30% roztworu H₂O₂ w celu usunięcia materii organicznej z komórek okrzemek. Proces prowadzono w temperaturze 80°C przez 4 h. Pod koniec procesu dodano kilka kropel 37% kwasu solnego w celu usunięcia

węglanów wapnia i resztek H_2O_2 . Otrzymaną biokrzemionkę okrzemkową przemyto wodą destylowaną i pozostawiono do sedymentacji na 24 h. Następnie zdekantowano roztwór z nad czystej biokrzemionki. Powstały osad odwirowano na wirówce Eppendorf Centrifuge 5810 R (Hamburg, Niemcy) przy 10 000 obr/min przez 10 min. Następnie czystą biokrzemionkę przemywano i ponownie odwirowywano. Proces mycia i odwirowywania powtarzano pięciokrotnie. Na koniec, otrzymaną biokrzemionkę okrzemkową z domieszką jonami tytanu pozostawiono do wysuszenia w temperaturze $120^{\circ}C$. Tak otrzymano kompozyt $Ti/DBioSiO_2$.

4.2.2. Synteza kompozytów pirolizowanej biomasy okrzemek domieszkowanej tytanem i srebrem w postaci nanoczątek

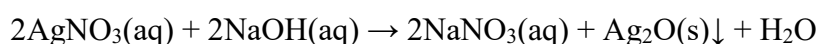
Fotobioreaktor o pojemności 25 L wypełniony medium hodowlanym Guillarda F/2 (o stałej wartości $pH = 8,4$) oraz wybranym szczepem okrzemek inkubowano w temperaturze $20^{\circ}C$ w reżimie świetlnym 24 h jasności przez dwie świetlówki o mocy 1500 lux. Początkowe stężenie rozpuszczalnego krzemu ($Na_2SiO_3 \times 5H_2O$) w podłożu wynosiło 7 mg Si/L. Początkowe stężenie rozpuszczalnego tytanu ($TiCl_3$) w pożywce wynosiło 50 mg Ti/L. Tą metodą otrzymano kompozyt TiO_2/DB .

Następnie, biomasę okrzemkową metabolicznie domieszkowaną jonami tytanu poddano pirolizie. TiO_2/DB umieszczono w ceramicznym tyglu znajdującym się w kwarcowej rurze. Rurę tą poddano próżni, wypełniono argonem i ogrzewano pod stałym przepływem argonu (Ar 5,0) (25 mL/min) w programowanym poziomym piecu rurowym (Czyłok, Polska) z szybkością grzania $100^{\circ}C/h$ do końcowej temperatury $800^{\circ}C$ i utrzymywano w tej temperaturze przez 2 h. Tak otrzymano kompozyt TiO_2/DBP .

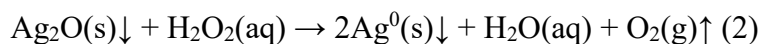
Syntezę kompozytu $AgNPs/TiO_2/DBP$ przeprowadzono poprzez impregnację pirolizowanej biomasy okrzemkowej uprzednio zmodyfikowanej metabolicznie tytanem

(TiO₂/DBP) roztworem azotanu srebra. Przygotowano wstępny roztwór AgNO₃ (Sigma Aldrich) o stężeniu 200 mg/L. Do roztworu azotanu srebra (50 mL) o określonym stężeniu jonów Ag dodano TiO₂/DBP o masie 100 mg. Syntezę kompozytu AgNPs/TiO₂/DBP przeprowadzono z wykorzystaniem roztworów azotanu srebra o dwóch różnych stężeniach jonów Ag: 5 i 10% w stosunku do użytej masy TiO₂/DBP. Impregnację prowadzono przez 12 h w temperaturze pokojowej.

Podczas oddziaływania roztworu azotanu srebra z TiO₂/DBP, zgodnie z chemią nieorganiczną srebra [228] przyjęto, że jony srebra Ag w środowisku alkalicznym ulegają utlenieniu do tlenków srebra według poniższej reakcji:



Dalszą redukcję otrzymanego tlenku srebra prowadzono za pomocą nadtlenku wodoru. Czynniki redukujące dodawano w stosunku molowym 1:3 AgNO₃/H₂O₂. Zawiesinę mieszano przez 15 minut przy 300 obr/min do momentu całkowitej redukcji jonów srebra:



Tak otrzymano kompozyt AgNPs/TiO₂/DBP.

Dodanie czynnika redukującego zmieniło pH roztworu z 9,02 do 6,88. Następnie kompozyt TiO₂/AgNPs/DBP przemyto pięciokrotnie wodą dejonizowaną, odwirowano na wirówce (Wirówka 9000, MPW-251 obr/min) i suszono w temperaturze 110°C przez 12 h.

4.2.3. Synteza kompozytów pirolizowanej biomasy okrzemek domieszkowanej nanocząstkami wanadanu neodymu

Wyżej wymieniony gatunek okrzemek hodowano w fotobioreaktorach o pojemności 25 L w temperaturze 20°C, z pożywką Guillard F/2 (o pH = 8,4) i w reżimie świetlnym

24 h jasności przez dwie świetlówki o mocy 1500 lux. Początkowe stężenie rozpuszczalnego krzemu ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$) w medium hodowlanym wynosiło 7 mg Si/L. Początkowe stężenie neodymu ($\text{Nd}(\text{NO}_3)_3$) w pożywce wynosiło 10 mg Nd/L, a wanadu (VCl_3) 10 mg V/L. Cały eksperyment hodowli biomasy okrzemek w obecności pierwiastków domieszkujących prowadzono przez 12 dni.

Otrzymaną biomasę okrzemek domieszkowaną jonami neodymu i wanadu podzielono na dwie części. Jedną część biomasy wysuszono w temperaturze 70°C , a drugą poddano pirolizie w atmosferze azotu z szybkością ogrzewania $10^\circ\text{C}/\text{min}$ do temperatury końcowej 800°C . Suszona biomasa okrzemkowa domieszkowana neodymem i wanadem została określona skrótem NdVO₄/DB, a biomasa domieszkowana, która została poddana pirolizie - NdVO₄/DBP.

4.3. Charakterystyka uzyskanych kompozytów

4.3.1. Metody mikroskopowe

4.3.1.1. Mikroskopia optyczna (LM)

Jedną z pierwszych technik stosowanych do badania topografii powierzchni jest mikroskopia optyczna, zwana również mikroskopią świetlną. Mikroskopia optyczna pozwala na obserwację ogólnej struktury kolonii okrzemek, formowania się komórek w poszczególnych dniach hodowli oraz monitorowania zachodzącej inhibicji wzrostu [229]. W trakcie prowadzonych badań wzrost komórek okrzemek monitorowano za pomocą mikroskopu świetlnego Microscope Axio Observer.D1 przy użyciu obiektywów 40x - 100x.

4.3.1.2. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Do analizy morfologii powierzchni i struktury otrzymanych materiałów wykorzystano skaningowy mikroskop elektronowy SEM/FIB Quanta 3D FEG

o zdolności rozdzielczej 1,2 nm i detekcji sygnału SE (Boynton Beach, FL, USA). Przed analizą próbki napyłano nanometryczną warstwą złota. Analizę prowadzono w trybie zmiennej próżni. Skład pierwiastkowy i rozmieszczenie tytanu badano metodą SEM-EDX.

4.3.1.3. Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

Cechy morfologiczne, strukturę porów oraz skład pierwiastkowy uzyskanych kompozytów analizowano metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) i skaningowej transmisyjnej mikroskopii elektronowej (STEM-EDS) przy użyciu aparatu TEM (FEITecnai F20 X-Twintool, Lincoln, NE, USA) sprzężonego z detektorem dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDX) z umieszczeniem próbki na siatce miedzianej pokrytej węglem (Lacey Carbon Support Film 400 mesh).

4.3.2. Rentgenowska dyfraktometria proszkowa (XRD)

Analizy dyfrakcji proszkowej promieniowania X (XRD, Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK) przeprowadzono przy użyciu urządzenia Philips X'Pert Pro z promieniowaniem Cu-K α ($\lambda = 0,1541$ nm, 40 kV, 30 mA). Otrzymane kompozyty były skanowane w zakresie kątowym 5-120° 2 θ z krokiem 0,01.

4.3.3. Potencjał zeta (ζ)

Wartości potencjału zeta biokrzemionki i biomasy domieszkowanej jonami tytanu oraz kompozytów AgNPs/TiO₂/DB i AgNPs/TiO₂/DBP wyznaczono przy użyciu aparatu Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments). Przed pomiarem analizowane próbki (o stężeniu 0,25 mg/mL) zawieszano w wodzie o określonym pH (zakres 1-12) i sonifikowano w łaźni ultradźwiękowej Polsonic przez 360 min w temperaturze 25°C. Pomiary obejmowały trzy powtórzenia dla każdej próbki.

4.3.4. Analiza termogravimetryczna (TG)

Stabilność termiczną biokrzemionki i biomasy domieszkowanej jonami tytanu oraz kompozytu NdVO_4/DBP badano w zakresie temperatur 20–1000°C za pomocą termoanalyzera Jupiter STA 449 F5 firmy Netzsch (Selb, Niemcy). Próbki ogrzewano z szybkością ogrzewania $10^\circ\text{C min}^{-1}$ w atmosferze azotu. Po zakończeniu analizy próbki wykorzystano jako próbki pirolityczne i zbadano metodą XRD.

4.3.5. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR)

Wiązania strukturalne i grupy funkcyjne biokrzemionki i biomasy domieszkowanej jonami tytanu rejestrowano przy użyciu spektrofotometru w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) (FTIR ATR, Vertex 70, Bruker Optik, Billerica, MA, USA) wyposażonego w detektor DLaTGS oraz dyspersyjnego spektrometru Ramana Senterra (Bruker Optik). Widma FTIR rejestrowano uśredniając 64 skany w zakresie liczb falowych od 400 cm^{-1} do 4000 cm^{-1} z rozdzielczością 4 cm^{-1} .

4.3.6. Fotoluminescencja (PL)

Właściwości fotoluminescencyjne uzyskanych kompozytów analizowano przy użyciu spektrofotometru fluorescencyjnego Hitachi F-2500 wyposażonego w lampę ksenonową. Widma PL rejestrowano przy długości fali wzbudzenia 235 nm, 337 nm, 425 nm (kompozyty na bazie biomasy i biokrzemionki okrzemkowej domieszkowanych jonami tytanu), 270 nm, 420 nm (kompozyty zawierające $\text{AgNPs}/\text{TiO}_2$) i 270 nm, 325 nm, 420 nm, 532 nm oraz 800 nm (kompozyty zawierające NdVO_4). Pomiaru prowadzono w temperaturze około 20°C . Analizie poddawano próbki stałe, które umieszczano w specjalnej celi. Zakres pomiarowy wynosił od 250 do 700 nm, zgodnie z możliwościami przyrządu.

4.4. Badania właściwości antybakteryjnych

Właściwości przeciwdrobnoustrojowe kompozytów zawierających AgNPs/TiO₂ badano wobec sześciu szczepów. Wyselekcjonowano dwa gram-ujemne i jeden gram-dodatni szczepy bakterii należące do gatunków *Klebsiella pneumoniae* (Gram-ujemna), *Escherichia coli* (Gram-ujemna) i *Staphylococcus aureus* (Gram-dodatnia). Trzy z nich to izolaty fotogeniczne zakupione z kolekcji Interdyscyplinarnego Centrum Nowoczesnych Technologii (CMITC), natomiast trzy pozostałe typy - z repozytorium szczepów bakteryjnych American Type Culture Collection (ATCC) (Tab. 8).

Tab. 8. Wybrane szczepy wykorzystane w pracy do badania potencjału przeciwdrobnoustrojowego.

CMITC	ATCC
<i>Staphylococcus aureus ATCC33591 THL</i>	
(DFI),	<i>Staphylococcus aureus ATCC 700699,</i>
<i>Klebsiella pneumoniae 9295_1 CHB</i>	<i>Klebsiella pneumoniae ATCC 10031,</i>
(WI), <i>Escherichia coli MB 11464 1 CHB</i>	<i>Escherichia coli ATCC 10031</i>
(WI))	

*DFI - wyizolowany z zakażenia stopy cukrzycowej;

*WI - wyizolowany z zakażenia ran.

Wrażliwość wybranych szczepów bakterii zbadano po oznaczeniu minimalnego stężenia hamującego (MIC) zgodnie z procedurami Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). W tym celu zbadano dwa rodzaje kompozytów AgNPs/TiO₂/pyrolizowanej biomasy okrzemek (1,13% AgNPs/TiO₂/DBP i 2,42% AgNPs/TiO₂/DBP) w różnych stężeniach: 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,312 mg/mL, 0,156 mg/mL. Przygotowane stężenia zmieszano w stosunku 1:1 z wyhodowanym szczepem bakterii (1×10^6 CFU/mL) i inkubowano w temperaturze 37°C. Po upływie 24 h do każdego dołka dodano 12 µL zestawu do badań

toksykologicznych *in vitro*, opartego na rezazurynie (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Rys.15). Zgodnie z zaleceniem producenta, na podstawie zmian koloru z niebieskiego na różowy, określono wartość MIC. Każdy eksperyment został wykonany w trzech egzemplarzach. Nietraktowane komórki i kompozyty TiO₂/sprolizowana biomasa okrzemkowa służyły jako próbki kontrolne.



Rys. 15. Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) metodą płytkową z dodatkiem rezazuryny.

4.5. Metaboliczne domieszkowanie 3D biokrzemionki okrzemkowej tytanem

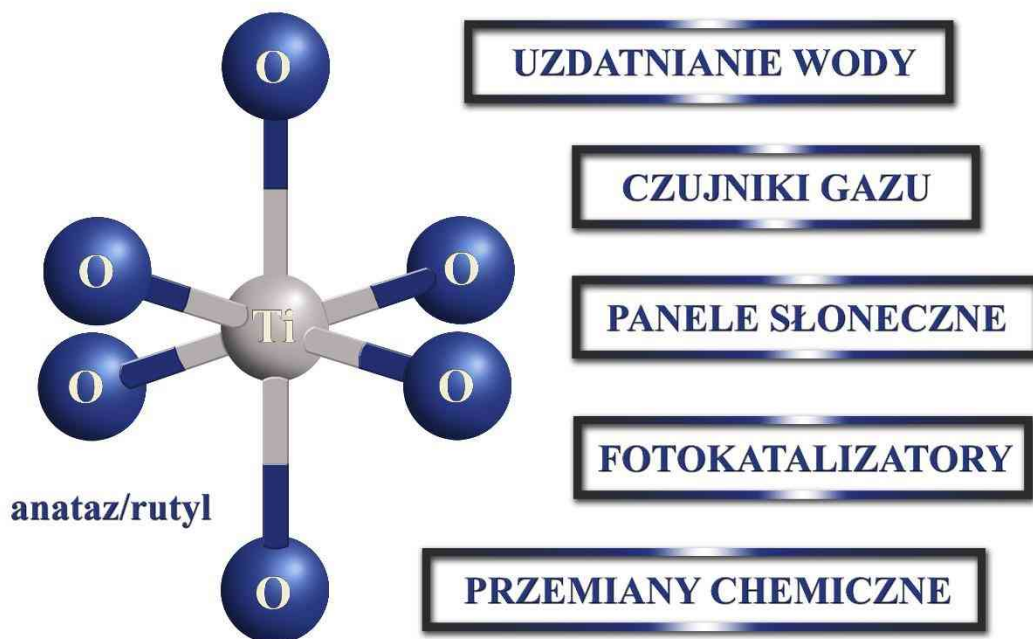
4.5.1. Wprowadzenie do problematyki badawczej

Główną przeszkodą ograniczającą szybkość opracowywania prototypowych urządzeń jest wytwarzanie materiałów o trójwymiarowej strukturze, która często jest niezbędna do osiągnięcia pożądanej wydajności i funkcjonalności [138]. W poszukiwaniu rozwiązania umożliwiającego tworzenie funkcjonalnych, trójwymiarowych biokompozytów o zdefiniowanej, hierarchicznej strukturze wielu biologów, chemików i fizyków zwróciło swoją uwagę na mikroorganizmy [118,192,201]. To właśnie w skali mikro- i nano- złożoność i funkcjonalność struktur biologicznych jest znacznie większa, aniżeli w przypadku równoważnych urządzeń wytworzonych przez człowieka [139,140]. Z tego też powodu unikatowe właściwości okrzemek doprowadziły w 1988 r. do powstania nowego, interdyscyplinarnego obszaru badań, zwanego nanotechnologią okrzemek [141]. Od tego czasu charakterystyczna zdolność tych jednokomórkowych mikroalg do tworzenia krzemionkowych pancerzyków o precyzyjnej, hierarchicznej strukturze 3D wzbudza tak duże zainteresowanie naukowców, że czyni te biologiczne, ażurowe struktury możliwym elementem budulcowym nowej generacji mikro- i nanourządzeń [162,192,230–235].

Modyfikacja materiału jest ważnym podejściem do zmiany właściwości fizykochemicznych lub funkcji krzemionkowych pancerzyków okrzemek i otwiera ogromne możliwości syntezy nowych materiałów o nanostrukturze 3D [236]. Dzięki temu można uzyskać materiał, który charakteryzować się będzie wzmocnieniem unikatowych właściwości optycznych biokrzemionki okrzemkowej, nabywając przy tym specyficznych dla domieszkowanego pierwiastka właściwości [185]. Zwłaszcza obiecująco wyglądają już uzyskane wyniki badań dotyczące możliwości domieszkowania tytanem biokrzemionki okrzemkowej w celu wytworzenia materiałów

charakteryzujących się specyficznymi właściwościami foto- i elektroluminescencyjnymi [201,205,207–210,237–240].

W dominującej ilości w przyrodzie tytan występuje pod postacią tlenku tytanu, w którym to przyjmuje +IV stopień utlenienia [241]. TiO_2 jest również najbardziej stabilnym tlenkiem tytanu [242]. Dwutlenek tytanu występuje w trzech różnych formach krystalograficznych: rutyłu, anatazu (o strukturze tetragonalnej) i brukitu (o strukturze ortorombicznej). Tylko fazy rutyłu i anatazu mają znaczenie praktyczne [243]. W obu strukturach podstawowym budulcem jest atom tytanu otoczony przez sześć atomów tlenu w mniej lub bardziej zniekształconej konfiguracji oktaedrycznej [244]. TiO_2 jest także dobrze znany jako tlenek półprzewodnikowy. Jest on niedrogi, chemicznie stabilny i nieszkodliwy oraz nie wykazuje absorpcji w obszarze światła widzialnego. Natomiast absorbuje światło UV generując parę elektronów i dziur, która wywołuje reakcje chemiczne na jego powierzchni. Z tego powodu najbardziej obiecującą cechą są jego właściwości fotochemiczne takie jak wysoka aktywność fotokatalityczna [245]. Już od lat 50 XX wieku TiO_2 był szeroko badany w celu wykorzystania go jako fotokatalizatora [246–248], elementu ogniwa słonecznego [249] oraz czujnika gazu [250]. Dodatkowo nanocząstki dwutlenku tytanu są wykorzystywane w fotokatalitycznej degradacji toksycznych substancji chemicznych w wodzie [251,252] (Rys. 16). Jednakże, proces wytwarzania nanocząstek tytanu wymaga wysokiej temperatury, ciśnienia i toksycznych substancji chemicznych, co ogranicza ich produkcję i potencjalne zastosowanie [253]. W związku z tym potrzebne jest przyjazne dla środowiska i efektywne kosztowo podejście do syntezy tych nanorozmiarowych materiałów na większą skalę z mniejszymi zagrożeniami.



Rys. 16. Gama możliwych zastosowań dwutlenku tytanu w nowoczesnych technologiach.

Naturalnym rozwiązaniem tego problemu wydaje się być modyfikacja tlenkami tytanu naturalnego nośnika, który byłby produkowany w sposób przyjazny dla środowiska, po niskich kosztach oraz taki, który wykazywałby się biokompatybilnością [254]. Idealnym tego typu „nośnikiem” wydają się być okrzemki wraz ze swoimi zdolnościami adsorpcyjnymi i zdolnością inkorporowania atomów innych niż krzem pierwiastków do swojego pancerzyka [140]. Zgodnie z wcześniej opublikowanymi doniesieniami, biokrzemionka okrzemkowa została już sfunkcjonalizowana TiO_2 w celu wykorzystania jako efektywny fotokatalizator do oczyszczania powietrza w pomieszczeniach [255,256], do fotokatalitycznej degradacji rodaminy B [239,257], jako katalizator fotodegradacji błękitu metylowego [258] oraz jako fotokatalizator w redukcji aldehydu octowego [206].

Metoda metabolicznego wprowadzania jonów tytanu do komórek okrzemek została po raz pierwszy opracowana przez C. Jeffryesa i wsp. [205] z wykorzystaniem dwuetapowego procesu hodowli nienazwanego gatunku reprezentującego *Pinnularia*. Prekursorem tytanu był roztwór $TiCl_4$. Skolem [208] podążyła tym samym tropem, stosując dwuetapowy proces domieszkowania krzemionkowych frustul okrzemek z gatunku *Pinnularia* sp. i *Coscinodiscus* sp. jonami tytanu w fotobioreaktorze z zastosowaniem tego samego prekursora jonów tytanu co Jeffryes. Chauton i wsp. [207] również zastosowali dwuetapowy proces domieszkowania *Pinnularia* sp. jonami tytanu przy czym używając tego samego prekursora, zainicjowali oni pobór tytanu, gdy stężenie krzemu w podłożu hodowlanym spadło do poziomu poniżej $0,5 \mu M$. W badaniach Eynde i wsp. [206], dwuetapowy schemat procesu domieszkowania *Pinnularia* sp. był analogiczny, różniąc się jedynie czasem dodania prekursora tytanu, co miało miejsce pod koniec wzrostu komórek, a nie po jego zakończeniu. Badania nad dwuetapowym domieszkowaniem *Fistulifera solaris* przez Maeda i wsp. [209] użyto diwodortlenku tytanu(IV) bis(mleczanu amonu) (TiBALDH) jako prekursora. Inne grupy badawcze stosowały jednoetapowy proces domieszkowania. W pracy Bashariny [201] hodowlę *Synedra acus* prowadzono w mikroinkubatorach, w których $10 \text{ mM Na}_2\text{SiO}_3$ i 10 mM TiCl_4 dodano jednocześnie do roztworu zasady. Podobne podejście zastosowali Lang i wsp. [210] przez dodanie $0,2\text{--}2,0 \text{ mM TiBALDH}$ do pożywki *Thalassiosira weissflogii*.

W tym rozdziale opisano metodę biosyntezy trójwymiarowej biokrzemionki okrzemkowej domieszkowanej jonami tytanu podczas kontrolowanej hodowli wyselekcjonowanego gatunku okrzemek *Pseudostaurosira trainorii*. Biologiczna integracja TiO_2 ze ścianami komórkowymi krzemionki została ostatnio wykazana poprzez prostą hodowlę komórek okrzemek w obecności rozpuszczalnych w wodzie prekursorów Ti (np. tlenosiarczan tytanu, $TiOSO_4$; chlorek tytanu(IV), $TiCl_4$

i diwodrotlenek tytanu(IV) bis(mleczanu amonu), TiBALDH) [205,207,210]. Podejścia te wskazują, że najwyższy procent inkorporacji tytanu uzyskano w przypadku TiBALDH, który jest organicznym prekursorem tytanu. Z tego powodu w przeprowadzonej syntezie po raz pierwszy zastosowano organiczny prekursor tytanu jakim jest tertbutanolan tytanu. W poniższych podrozdziałach przedstawiono opis badań dotyczących cech morfologicznych i strukturalnych, składu pierwiastkowego, właściwości fotoluminescencyjnych oraz stabilności termicznej uzyskanych biokompozytów przy użyciu szeregu metod instrumentalnych obejmujących skaningową mikroskopię elektronową, transmisyjną mikroskopię elektronową, spektroskopię fotoluminescencyjną UV/Vis, spektroskopię FTIR, rentgenowską dyfrakcję proszkową, termogravimetrię oraz potencjał zeta.

4.5.2. Wpływ wartości pH, początkowego stężenia Ti i stosunku Ti:Si w medium hodowlanym na absorpcję tytanu przez komórki okrzemek

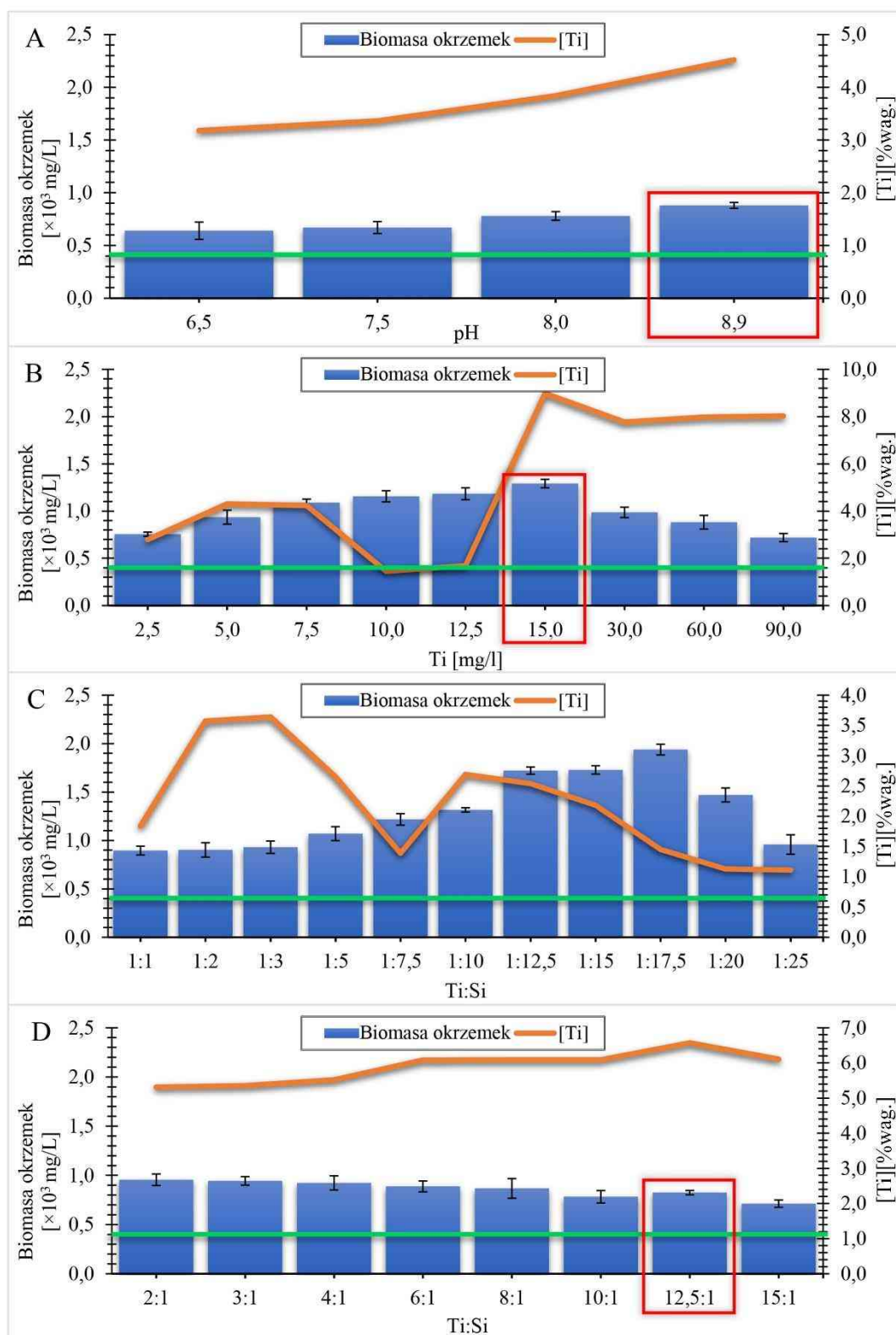
Badanie równowagi (wartości badane w ostatnim dniu hodowli) inkorporacji tytanu do komórek okrzemek, jak również wzrostu gęstości komórek gatunku okrzemek *Pseudostaurosira trainorii*, przeprowadzono w czterech oddzielnych seriach doświadczeń. Eksperyment początkowy (Seria I) polegał na doborze odpowiedniej wartości pH, będącej kompromisem pomiędzy optymalnym stopniem wzrostu okrzemek, a stopniem inkorporacji jonów tytanu do okrzemkowego pancerzyka. Druga seria (Seria II) dotyczyła doboru optymalnego początkowego stężenia jonów tytanu, dodawanego do medium hodowlanego, w celu uzyskania jak najlepszej wydajności produkcji biomasy oraz ilości zainkorporowanego tytanu. Seria trzecia i czwarta (Seria III, Seria IV) polegały na ustaleniu odpowiedniego stosunku masowego początkowych stężeń rozpuszczonego w medium tytanu i krzemu, aby uzyskać optymalną ilość materiału zawierającego największy procent wagi wbudowanego tytanu.

W badaniach wykorzystano pomiary McFarlanda niedomieszkowanej biomasy okrzemek w celu standaryzacji pomiarów kinetyki domieszkowanych materiałów. Policzono również komórki okrzemek bez domieszki tytanu w hemocytometrze i ustalono, że zawiesina o zmętnieniu 1 jednostki McFarlanda odpowiada około 4×10^5 komórek/mL [4]. Wydajność produkcyjna niedomieszkowanych komórek z gatunku *Pseudostaurosira trainorii* wynosiła ok. 0,39 mg/mL. Wartość ta została zaprezentowana w formie zielonej linii na Rys. 17.

Tab. 9. Uogólniony zestaw warunków hodowli w trakcie poszczególnych serii.

Serie (I-IV)	
Temperatura [°C]	25
Intensywność światła [lux]	1500
Cykl dzień: noc [h:h]	12:12
Pojemność fotobioreaktora [mL]	3000
Medium hodowlane	Guilarda F/2
Prekursor Si	Na ₂ SiO ₃ ×5H ₂ O
Prekursor Ti	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ Ti in 37% HCl _{aq}
Czas hodowli [dni]	12

Rys. 17 przedstawia histogramy obrazujące ilość pozyskanej biomasy [w mg/mL] w ostatnim, 12 dniu hodowli dla poszczególnych serii. Ogólne warunki kontrolowanej hodowli okrzemek domieszkowanych jonami tytanu dla wszystkich przeprowadzonych serii zestawiono w Tab. 9.



Rys. 17. Ilość wyhodowanej biomasy w ostatnim dniu hodowli (12 dzień) w funkcji (A) wartości pH; (B) stężenia Ti; (C, D) stosunku Ti:Si w odniesieniu do zawartości tytanu w biomasy okrzemek w % masy (linia pomarańczowa). Wartość produkcji komórek *Pseudostaurosira trainorii* bez domieszki jonów tytanu jest wskazana przez zieloną linię. Czerwony prostokąt wskazuje próbki cechujące się najlepszym stosunkiem pomiędzy ilością uzyskanej biomasy a zawartością w niej tytanu.

Seria I

Badania przeprowadzono dla czterech wartości pH, które wynosiły odpowiednio 6,5; 7,5; 8,5 i 8,9. Wybór zakresu pH do eksperymentu był motywowany zakresem pH dla żywych komórek okrzemek *Pseudostaurosira trainorii*. Ponadto, wraz ze wzrostem pH wzrasta możliwość zniszczenia krzemionkowej powłoki okrzemek [259], co byłoby efektem niepożądanym, gdyż intencją było zachowanie nienaruszonej, trójwymiarowej struktury pancerzyków okrzemek. Początkowe stężenie rozpuszczalnego krzemu wynosiło 7,0 mg/L, natomiast początkowe stężenie rozpuszczalnego tytanu 2,5 mg/L. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów związanych z Serią I przedstawiono na Rys. 17A. Zaobserwowano, że ilość uzyskanej biomasy wzrastała wraz ze wzrostem pH. Po 12 dniach największą ilość odnotowano w kolbie zawierającej medium hodowlane z domieszką tytanu przy pH = 8,9. Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w danych literaturowych [51], w których optymalne wartości pH dla hodowli mikroalg oszacowano w zakresie 8,2-8,9. Ilość inkorporowanego tytanu w komórkach okrzemek wzrasta również wraz ze wzrostem wartości pH (Rys. 17A). Może to być związane z faktem, że w zasadowym zakresie pH tytan występuje głównie jako $Ti(OH)_4$, a krzem jest absorbowany przez okrzemki jako $Si(OH)_4$. Z tego też powodu tytan w tej postaci może być wchłaniany do komórki w taki sam sposób jak krzem [212]. Niezależnie od pH medium hodowlanego, wartość biomasy w ostatnim dniu hodowli była wyższa niż wartość referencyjna ilości biomasy komórek okrzemek bez domieszki (dotyczy to wszystkich serii). W pracach związanych z metabolicznym wprowadzaniem jonów tytanu do komórek okrzemek obserwowano znaczny wzrost biomasy w trakcie trwania eksperymentu [207,210]. Jedynie w eksperymencie przeprowadzonym przez Skolem [208] wydajność biomasy okrzemek była niższa w porównaniu z próbą ślepą.

Seria II

W tej serii doświadczeń przeprowadzono badania dla dziewięciu początkowych wartości stężenia rozpuszczalnego tytanu w podłożu hodowlanym, które wynosiły odpowiednio 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 30,0; 60,0 i 90,0 mg/L. Początkowe stężenie rozpuszczalnego krzemu wynosiło 7,0 mg/L, a pH roztworów hodowlanych utrzymywano na poziomie 8,9. Wybór wartości pH był wynikiem przeprowadzonych eksperymentów w serii I. Wyniki badań dotyczące Serii II przedstawiono na Rys. 17B. Analizując uzyskane wartości można zauważyć, że do pewnej wartości stężenia tytanu, zwanego stężeniem granicznym, ilość uzyskanej biomasy wzrasta wraz ze wzrostem stężenia. Po przekroczeniu stężenia granicznego masa komórek okrzemek inkorporowanych tytanem zmniejszała się. Takie zachowanie może być spowodowane przekroczeniem progu tolerancji stresora, jakim są jony tytanu dla komórek okrzemek [260]. Ponadto badania przeprowadzone przez Eynde i wsp. [255] na kulturach *Pinnularia* sp. wykazały, że zahamowanie procesu wzrostu komórek może zależeć również od rodzaju prekursora tytanu użytego w podłożu hodowlanym. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki zawartość inkorporowanego tytanu zależy od wzrastającego stężenia tego pierwiastka w podłożu hodowlanym, nie ma jednak widocznej zależności pomiędzy ilością biomasy a ilością zaabsorbowanego tytanu. Największą wartość inkorporacji domieszkowanego pierwiastka (8,98% wag.) uzyskano dla materiału, w którym stężenie rozpuszczalnego tytanu w medium hodowlanym wynosiło 15 mg/L.

Seria III

Seria ta składała się z jedenastu prób, w których stosunki masowe Ti:Si wynosiły odpowiednio: 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7,5, 1:10, 1:12,5, 1:15, 1:17,5, 1:20 i 1:25. Początkowe stężenie rozpuszczalnego tytanu w medium hodowlanym wynosiło 15 mg/L (co było

konsekwencją wyników doświadczeń z Serii II) i było stałe dla wszystkich doświadczeń. Stężenie krzemu w podłożu hodowlanym zmieniało się w zależności od eksperymentu i wynosiło od 15 mg/L dla pierwszej próby (1:1) do 375 mg/L dla próby 1:25. Graficzną prezentację wyników Serii III przedstawiono na Rys. 17C. Widać, że podobnie jak w przypadku zwiększania stężenia tytanu w Serii II, również w tej serii wzrost stężenia krzemu w medium hodowlanym powoduje wzrost ilości uzyskanej biomasy. Wzrost ten następuje do momentu osiągnięcia stężenia granicznego (przy stosunku Ti:Si = 1:17,5), po przekroczeniu którego obserwuje się spadek uzyskanej masy komórek okrzemek. Może to wynikać z faktu, że inkorporacja Si związana jest głównie z czasem trwania syntezy ściany komórkowej. Ze względu na szybkie tempo wzrostu szczepu *Pseudostaurosira*, przekroczenie granicznego stężenia krzemu powoduje zmniejszenie inkorporacji krzemu do pancerzyka, a tym samym spadek liczby komórek [261,262]. Ilość biomasy ($1,94 \times 10^3$ mg/L) w punkcie odpowiadającym stężeniu krytycznemu była najwyższa w porównaniu z ilością biomasy uzyskaną w pozostałych seriach. Analizując wyniki wartości inkorporowanego tytanu można zauważyć, że nie ma widocznej korelacji pomiędzy wzrostem stężenia krzemu a wzrostem poboru tytanu do komórek okrzemek. Widać jednak, że uzyskane wartości zawartości tytanu w domieszkowanej biomacie są niższe niż w przypadku Serii II, gdzie początkowe stężenie Si wynosiło 7 mg/L. Wynika to prawdopodobnie z niewystarczającego stężenia tytanu w podłożu hodowlanym w stosunku do ilości krzemu w nim zawartego.

Seria IV

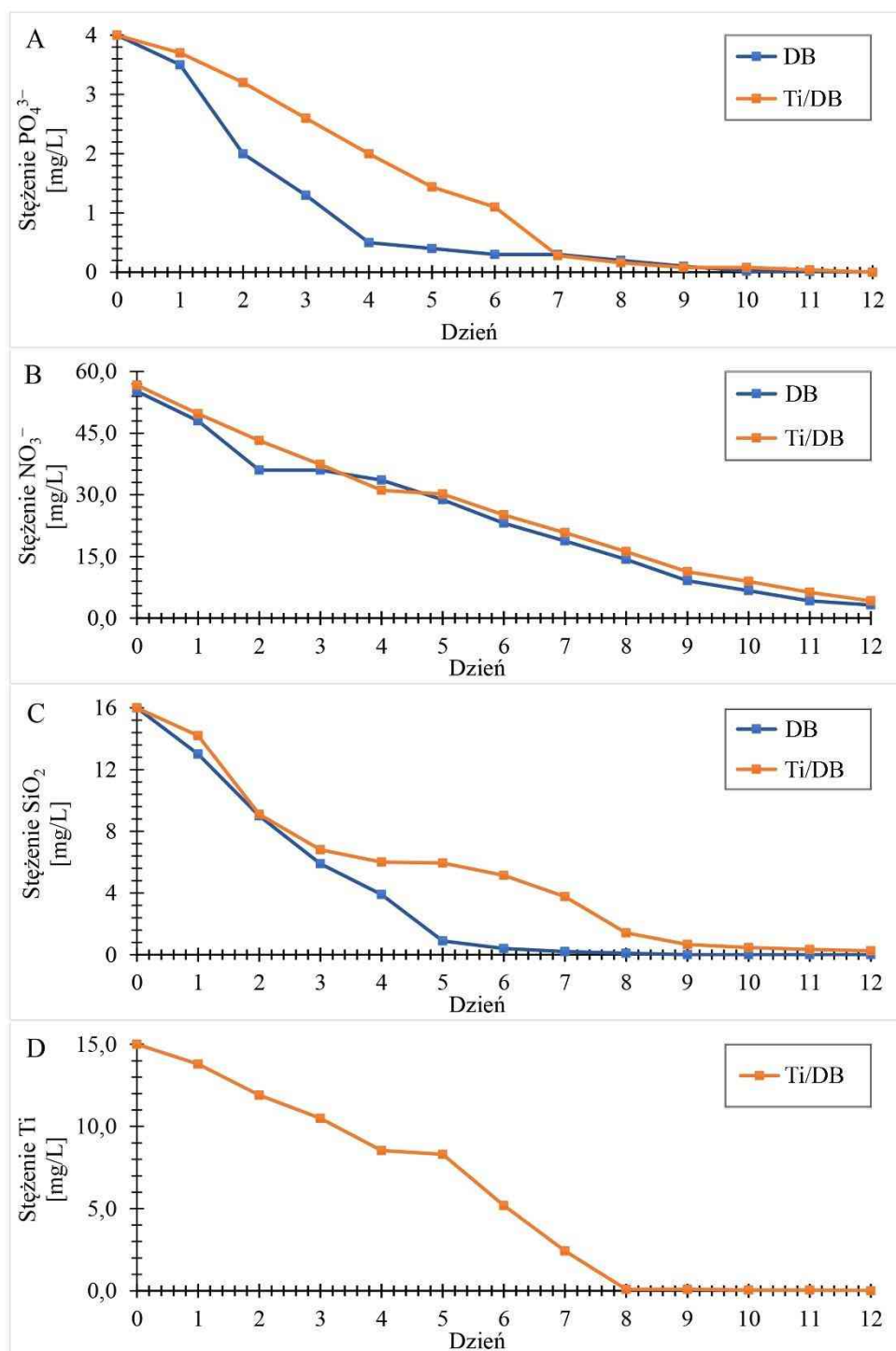
Badania przeprowadzono dla ośmiu wartości stosunków masowych Ti:Si, w których tytan był pierwiastkiem dominującym. Wartości tych stosunków wynosiły odpowiednio: 2:1, 3:1, 4:1, 6:1, 8:1, 10:1, 12,5:1 i 15:1. Stężenie inicjujące rozpuszczalnego tytanu

w medium hodowlanym wynosiło 15 mg/L (co było konsekwencją wyników doświadczeń z Serii II) we wszystkich doświadczeniach tej serii. Zawartość krzemu w medium hodowlanym zmieniała się w zależności od eksperymentu i wynosiła od 1 mg/L dla ostatniego testu (15:1) do 7,5 mg/L dla testu 2:1. Wyniki eksperymentów związanych z Serią IV przedstawiono na Rys. 17D. Można zauważyć, że ilość uzyskanej biomasy maleje wraz ze spadkiem stężenia krzemu w medium hodowlanym. Wynik ten jest zgodny z rezultatami uzyskanymi w Serii III. Może to wynikać z faktu, że ilość krzemu dostarczana do medium hodowlanego nie wystarcza na pokrycie zapotrzebowania komórek okrzemek na ten pierwiastek w cyklu tworzenia ściany komórkowej, ze względu na szybkie tempo wzrostu tego gatunku [49]. Obserwowany spadek ilości uzyskanej biomasy jest widoczny do momentu, gdy początkowe stężenie krzemu w pożywce wynosi 1,5 mg/L. Gdy wartość stężenia krzemu spada do 1,2 mg/L, widoczny jest niewielki wzrost biomasy okrzemek. Gdy wartość ta spada do 1 mg/L, następuje kolejny spadek ilości biomasy. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki zależności zawartości inkorporowanego tytanu od malejącego stężenia krzemu w podłożu hodowlanym widać, że wraz ze spadkiem ilości krzemu w podłożu wzrasta ilość tytanu absorbowanego przez komórki. Dzieje się tak do punktu, w którym stężenie krzemu w pożywce wynosi 1,2 mg/L. Jest to punkt, dla którego zawartość tytanu w komórkach okrzemek jest najwyższa i wynosi 6,57%. Po przekroczeniu tej wartości i zmniejszeniu zawartości krzemu w pożywce do 1 mg/L widoczny jest niewielki spadek ilości wbudowanego tytanu do komórek okrzemek. Po przeprowadzeniu powyższej serii eksperymentów związanych z doбором odpowiedniego pH, stężenia tytanu oraz odpowiedniego stosunku stężenia tytanu do krzemu, wybrano reprezentatywny materiał, który okazał się kompromisem pomiędzy ilością uzyskanej biomasy, a zawartością w nim tytanu. Materiałem tym okazała się biomasa domieszkowana jonami tytanu

o początkowym stężeniu 15 mg/L (i początkowym stężeniu krzemu 1,2 mg/L), poddana dalszym analizom, których wyniki opisano w niniejszym rozdziale. W dalszej części niniejszej pracy biomasa domieszkowana jonami tytanu o początkowym stężeniu 15 mg/L będzie oznaczana jako Ti/DB, natomiast domieszkowana biokrzemionka będzie określana jako Ti/DBioSiO₂. Materiały referencyjne takie jak biomasa bez domieszek jonów tytanu oraz czysta biokrzemionka okrzemkowa będą wyrażane odpowiednio symbolami DB i DBioSiO₂.

4.5.3. Kinetyka pobierania (absorpcji) składników (Si, N, P i Ti) przez komórki okrzemek z medium hodowlanego

Szybkość pobierania azotanów, fosforanów i krzemu przez komórki okrzemek *Pseudostaurosira trainorii* (bez domieszki i w obecności jonów tytanu o początkowym stężeniu w medium hodowlanym wynoszącym 15 mg/L) oceniano podczas 12-dniowych eksperymentów za pomocą testów fotometrycznych. Dodatkowo, w trakcie całego cyklu hodowlanego, przeprowadzono analizy próbek podłoża hodowlanego przy użyciu ICP-MS w celu wykazania absorpcji jonów tytanu przez komórki okrzemek. Uzyskane wyniki przedstawiono na Rys. 18. Największa część tych pierwiastków jest absorbowana w pierwszych dniach. Otrzymane wyniki potwierdzają badania literaturowe związane z kinetyką wzrostu mikroalg, które wskazują, że w ciągu pierwszych kilku dni następuje faza intensywnego wzrostu komórek okrzemek [210,263–266]. W tym okresie składniki pokarmowe nie ograniczają wzrostu mikroalg. W fazie wzrostu podziały komórek okrzemek ulegają spowolnieniu, powodując, że biomasa mikroalg gromadzi się w stałym tempie, aż do momentu, gdy składniki w podłożu hodowlanym staną się czynnikami ograniczającymi [267]. Wówczas osiągają fazę stacjonarną, która zbiega się z wyczerpaniem fosforu i krzemu w podłożu hodowlanym.



Rys. 18. Kinetyka pobierania składników: P (A), N (B), Si (C) i Ti (D) przez *Pseudostaurosira trainorii* z medium hodowlanego.

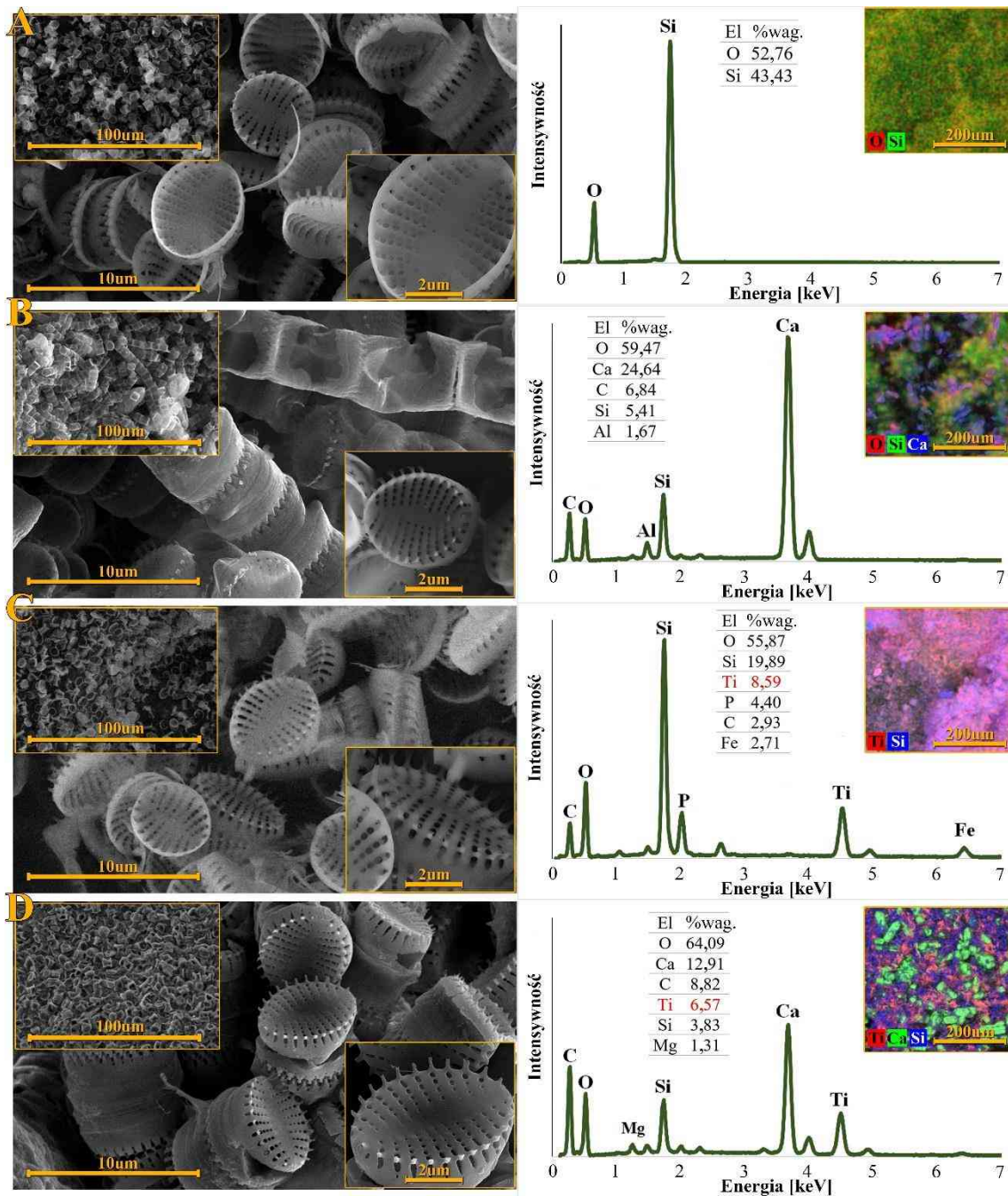
Podczas prowadzenia badań kinetyki pochłaniania składników medium hodowlanego stężenie PO_4^{3-} zmniejszyło się do $<0,008 \text{ mg/L}$ (Rys. 18A). Dodatkowo, stężenie SiO_2

znacznie się zmniejszyło, osiągając $<0,011$ mg/L (Rys. 18C), natomiast NO_3^- zmniejszało się praktycznie liniowo, nie stając się pierwiastkiem ograniczającym (Rys. 18B). Fakt, że NO_3^- nie stał się czynnikiem ograniczającym może wskazywać, że nie jest on głównym źródłem N w pożywce. Źródłem produkcji azotu w podłożu hodowlanym może być azot organiczny, pochodzący z wydaliny mikroalg występujących podczas śmierci lub lizy, a także w fazie wzrostu produktywnego [268]. Ze względu na dużą koncentrację uzyskanej biomasy oraz szybkie tempo wzrostu i podziałów, można by spodziewać się wysokiego stężenia azotu organicznego w medium [269,270], jednak takie badania nie były przedmiotem niniejszych badań. Analizując krzywą absorpcji jonów tytanu przez okrzemki (Rys. 18D) można zauważyć, że jej kształt jest podobny do kształtu krzywej absorpcji krzemu. Podobnie jak w przypadku rozpuszczalnego krzemu największa absorpcja tytanu do komórek okrzemek następowała w pierwszych dniach hodowli. Zaobserwowano, że w ósmym dniu ilość rozpuszczalnego tytanu w medium hodowlanym spadła do $<0,1$ mg/L. W związku z tym spadkiem jony tytanu stały się pierwiastkiem limitującym, co spowodowało zahamowanie poboru tytanu do komórek okrzemek. Biorąc pod uwagę, że absorpcja tytanu z medium hodowlanego przez biomasę była podobna do absorpcji krzemu (Rys. 18C, D), można stwierdzić, że schemat pobierania tytanu i krzemu przez okrzemki do komórek jest taki sam [212], a absorpcja tych pierwiastków odbywa się równolegle.

4.5.4. Analiza zsyntezowanych kompozytów za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej

Na Rys. 19 przedstawiono przegląd zdjęć SEM otrzymanych materiałów. Na Rys. 19A przedstawiono oczyszczoną i wysuszoną biokrzemionkę okrzemkową pochodzącą z okrzemki *Pseudostaurosira trainorii* bez domieszek. Widać, że zachowana została

misternie zdobiona, trójwymiarowa struktura frustul okrzemek wraz z całą, okresowo rozmieszczoną siecią porów. Poszczególne pancerzyki okrzemek mają kształt eliptycznych lub spłaszczonych sferoid, a ich średnica waha się od 4 do 5 μm [48].



Rys. 19. Przegląd obrazów SEM i widm SEM-EDX, składu pierwiastkowego i rozmieszczenia tytanu: (A) oczyszczona biokrzemionka okrzemkowa, (B) wysuszona biomasa, (C) biokrzemionka okrzemkowa domieszkowana jonami tytanu, (D) biomasa okrzemkowa zawierająca tytan.

Przez środek zastawek przebiega silnie skrzemionkowany mostek, który dzieli je na dwie połowy z ośmioma do dwunastu transapikalnych rozstępów. Rozstępy składają się z około 3-5 porów, których wielkość maleje od brzegu zastawki do jej środka [4]. Analiza SEM-EDX potwierdziła, że frustule okrzemek składają się z tlenu i krzemu, co świadczy o tym, że w wyniku procesu oczyszczania doszło do całkowitego usunięcia organiki komórki okrzemki, tj. protoplazmy i chloroplastów [271]. Na Rys. 19B przedstawiono przefiltrowaną i wysuszoną biomasę bez domieszki. Można zauważyć, że komórki *P. trainorii* z perspektywy opasania mają prostokątny kształt i tworzą wstęgowe kolonie połączone kolcami [60]. Skład pierwiastkowy biomasy okrzemek uzyskano za pomocą SEM-EDX. Dodatkowo, w celu uzupełnienia analizy pierwiastkowej uzyskanego materiału, można wykonać badania XPS, o czym świadczą prace Uthappa i wsp. [272] oraz Aw i wsp. [273].

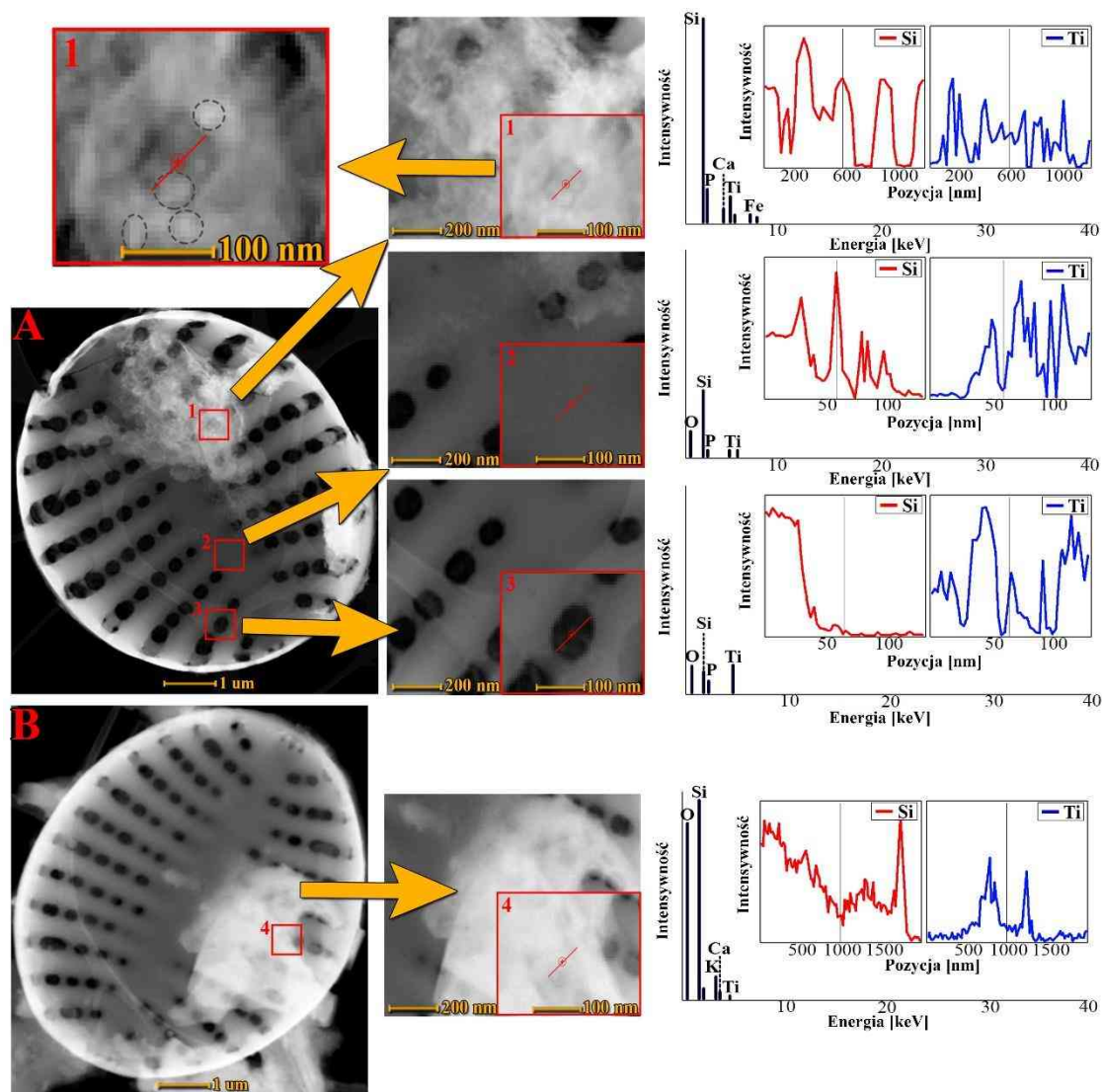
Z danych dotyczących analizy pierwiastkowej wynika, że głównymi składnikami biomasy okrzemek były: tlen, węgiel, krzem i wapń. Obecność wapnia może świadczyć o tworzeniu się węglanów wapnia, które są widoczne na mapowaniu EDX jako zielone formy zielone (Rys. 19D). Uzyskane formy są zbliżone do postaci węglanów wapnia uzyskanych w pracy El-Naas i wsp. [274]. Dodatkowo, w pracy Nowaka i wsp. obecność węglanów wapnia w biomacie okrzemek *P. trainorii* została potwierdzona analizą XRD, TG i FTIR [275]. Znaczna zawartość węgla w próbce wskazuje na obecność organicznej części komórki okrzemek. Na Rys. 19C przedstawiono oczyszczoną i wysuszoną biokrzemionkę okrzemkową domieszkowaną jonami tytanu, natomiast na Rys. 19D przefiltrowaną i wysuszoną biomasę domieszkowaną tytanem. Pod wpływem jonów tytanu owalny kształt komórek okrzemek pozostał nienaruszony. Regularne układy porów tworzą periodyczne wzory, które składają się na ornamentację szkielecików [238]. Otrzymane materiały wykazują morfologię zbliżoną do pancerzyków okrzemek

niedomieszkowanych. Na Rys. 19D widać, że powierzchnie komórek okrzemek są częściowo chropowate. Może to wynikać z nałożonych na nie substancji organicznych, które tworzą organiczne struktury komórkowe [239]. Po procesie oczyszczania usunięto substancje organiczne i odsłonięto krzemionkowe pancerzyki okrzemek, co przedstawiono na Rys. 19C. Powierzchnia oczyszczonych frustul okrzemek jest gładsza, co świadczy o tym, że proces usuwania substancji organicznych z komórek okrzemek zakończył się sukcesem. Analiza SEM-EDX wykazała również obecność tytanu w obu próbkach. Mapowanie wskazuje na równomierne rozmieszczenie domieszkowanego pierwiastka w materiałach. Procent masowy tytanu w oczyszczonej biokrzemionce był wyższy (8,59%) niż w biomacie (6,57%). Obecność Fe i P w oczyszczonej biokrzemionce może być wynikiem tego, że proces oczyszczania nie usunął całkowicie pozostałości z podłoża hodowlanego.

4.5.5. Analiza zsyntezowanych kompozytów za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej

Rys. 20 przedstawia porównanie obrazów transmisyjnej mikroskopii elektronowej oczyszczonej biokrzemionki z metabolicznie wprowadzonym tytanem (Rys. 20A), z biomasą domieszkowaną jonami tytanu (Rys. 20B). Obrazy TEM pokazują szczegółowo skomplikowaną strukturę okrzemkowych pancerzyków. Widoczna jest zarówno architektura całej skorupy okrzemek, jak i szczegóły struktury poszczególnych porów. Można zauważyć, że wpływ tytanu na morfologię komórek okrzemek jest nieznaczny. Podobnie jak w pracy Bashariny [201] zaobserwowano łączenie się niektórych pojedynczych porów w większe pory, jednak ogólna struktura poszczególnych porów nie uległa zmianie. Jeffryes i wsp. [212] uzyskali podobny wynik w badaniach nad metaboliczną inkorporacją germanu do biokrzemionki okrzemkowej. Jednak zjawisko to było bardziej intensywne niż w tym przypadku. Nie obserwowano takich zmian podczas

domieszkowania komórek okrzemek z gatunku *Pinnularia* sp. jonami tytanu [205]. Van Eynde w swojej pracy [206] zauważył, że zwiększona ilość tytanu w hierarchicznej strukturze pancerzyka okrzemek powoduje efekty deformacji i wypaczenia, powodując nieregularności w strukturze [201,206,276].



Rys. 20. Obrazy TEM biokrzemionki okrzemkowej (A) i biomasy (B) domieszkowanej jonami tytanu (A), widma STEM-EDX oraz skany linii elementarnych Ti i Si w czterech reprezentatywnych miejscach komórek okrzemek: na powierzchni płátka oczyszczonej biokrzemionki (A1), na żebrach (A2) w przekroju porów (A3) oraz na powierzchni płátka inkorporowanego na komórce nieoczyszczonej biomasy (B4). W powiększeniu rysunku A1 przerywana czarna linia pokazuje tytanową formę quasi-ooidową.

Na powierzchni pancrzyków znajdują się fragmenty cienkiego płaszcza w postaci falistych płatków o różnej wielkości. Struktura tych płatków jest amorficzna i nieregularna, przypominająca puch. Zawiera również osadzone, kuliste formy nanocząstek (ooidy) o wymiarach 10-20 nm. Miejsca występowania i rozmiary tych płatków są różne dla poszczególnych frustul. Ich obecność jest jednak charakterystyczna dla wszystkich frustul oczyszczonej biokrzemionki oraz komórek surowej biomasy domieszkowanej jonami tytanu. Grubość wspomnianych powłok prawdopodobnie nie przekracza 20 nm. Wielkość płatków waha się od 200 nm do 2 μm . Skany liniowe (Rys. 20A1 i 20B1) wskazują, że cienki płatek obserwowany na powierzchni pancrzyków zawiera takie pierwiastki jak wapń i tytan, a obecność Si i O potwierdza, że płatek ten jest bezpośrednio związany z powierzchnią krzemionkowej powłoki okrzemek, pomimo wytrawiania go roztworem H_2O_2 i HCl .

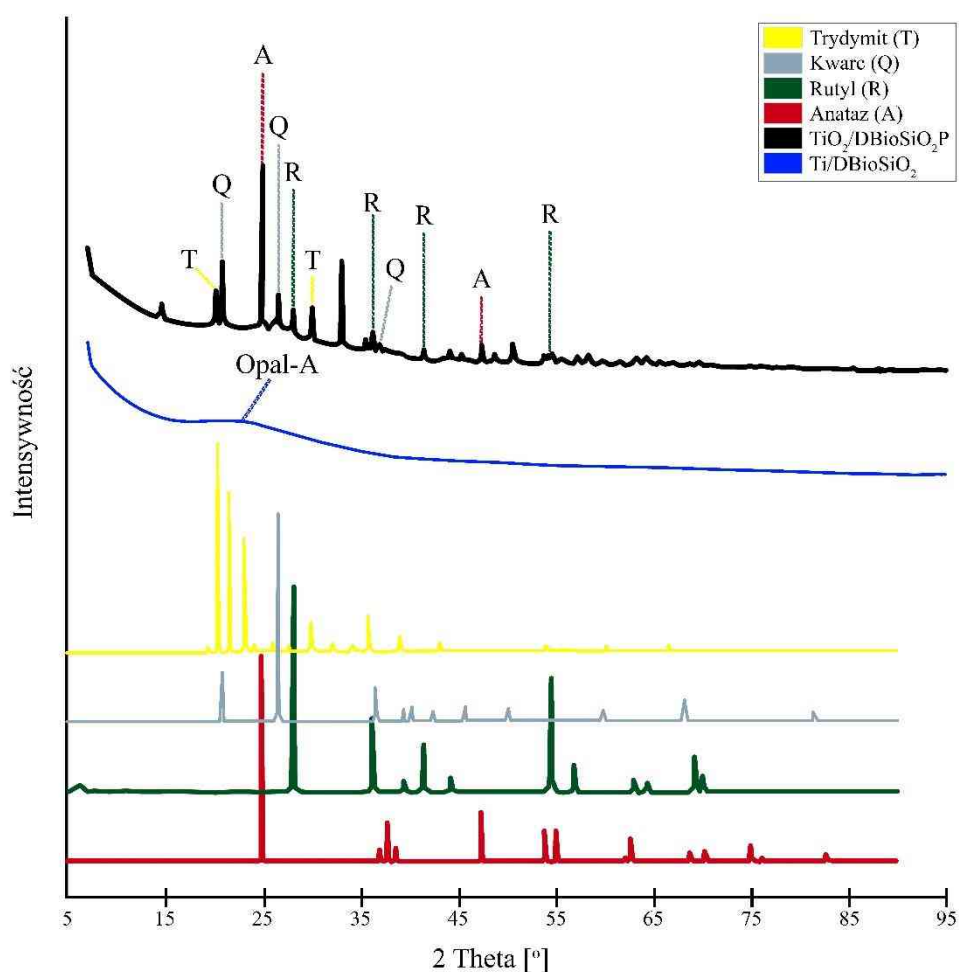
Dotychczas w literaturze naukowej nie odnotowano doniesień o powstawaniu podobnych powłok. Niewyjaśniony pozostaje charakter zjawiska wiązania pomiędzy powstałym płatkami a krzemionkową powierzchnią pancrzyków okrzemek. Wiązanie to jest prawdopodobnie wynikiem przyłączania się grup silanolowych znajdujących się na powierzchni kompozytu do tytanowych płatków. Przeprowadzono analizy STEM-EDX oraz skany liniowe STEM-EDX w trzech reprezentatywnych miejscach frustuli okrzemek: na powierzchni (Rys. 20A1), na zębrze (Rys. 20A2), wewnątrz porów (Rys. 20A3) oraz w jednym miejscu komórki okrzemek - na powierzchni "płatka" (Rys. 20 B4). Liniowe skany (Rys. 20A2, A3) pokazują, że Si, Ti i O były głównymi pierwiastkami obecnymi w szkielecikach. Liniowe skany STEM-EDX dla tytanu i krzemu wskazały, że sygnały Ti były również wykrywalne w miejscach wolnych od płatków. Może to sugerować, że w biokrzemionce krzem został prawdopodobnie częściowo zastąpiony metabolicznie przez tytan. Może to być możliwe ze względu na fakt, że tytan i krzem

mają podobne promienie kowalencyjne [206,276]. Dodatkowo, skany liniowe wskazały, że największe ilości Ti koncentrowały się na powierzchni płatków, następnie wewnątrz porów, a najmniejsze w strukturze skorupy (w żebrze). Należy jednak podkreślić, że liczba zliczeń sygnału jest przybliżona, ponieważ pomiar EDS zależy od penetracji i rozpraszania wiązki promieniowania X w próbce [277] oraz chropowatości powierzchni [278].

4.5.6. Widma rentgenowskiej dyfrakcji proszkowej

Widma rentgenowskiej dyfrakcji proszkowej biokrzemionki krzemkowej domieszkowanej jonami tytanu, suszonej w temperaturze 50°C oraz biokrzemionki krzemkowej Ti, pirolizowanej w temperaturze 1000°C, przedstawiono na Rys. 21. Widmo XRD otrzymane z wysuszonej biokrzemionki krzemkowej zawierającej tytan wykazało szeroki pik przy 15-30° 2 θ , który można przypisać krzemionce amorficznej, takiej jak opal A [279,280]. W powyższym zakresie kątów występuje również 25° 2 θ , który jest charakterystyczny dla fazy krystalicznej TiO₂ w postaci anatazu. Brak widoczności wyżej wymienionej fazy krystalicznej może wynikać z niskiej zawartości tytanu w biokrzemionce w porównaniu z dużą matrycą krzemionki amorficznej, co utrudnia dokładną detekcję fazy krystalicznej i sprawia, że próbka Ti/DBioSiO₂ bez pirolizy jest amorficzna [206]. Wzrost temperatury do 1000°C spowodował przejście z fazy amorficznej biokrzemionki domieszkowanej tytanem do jej faz krystalicznych. Zaobserwowano dwie formy krystaliczne TiO₂ (takie jak anataz i rutył) oraz SiO₂ (takie jak kwarc i trydymit). Widmo XRD otrzymane dla zawierającej tytan biokrzemionki krzemkowej, wyżarzanej w temperaturze 1000°C, wykazało piki dyfrakcyjne przy 25,22° i 47,85°, które są zgodne z pikami formy krystalicznej anatazu. Piki dyfrakcyjne przy 27,39°; 35,97°; 41,11° i 54,12° odpowiadają pikom charakterystycznym dla rutyłu TiO₂. Pojawienie się krystalicznej fazy rutyłowej jest uwarunkowane nieodwracalnym

przejściem fazowym z formy anatazowej, które zachodzi w temperaturze powyżej 600°C [281]. Wcześniejsze badania wskazują, że strącanie TiO_2 lub TiP_2O_7 z rozpuszczalnych prekursorów za pomocą peptydów lub białek powoduje powstanie amorficznych form wyżej wymienionych związków. Natomiast wyżarzanie termiczne może spowodować przejście fazowe z formy amorficznej do krystalicznej [282–284].



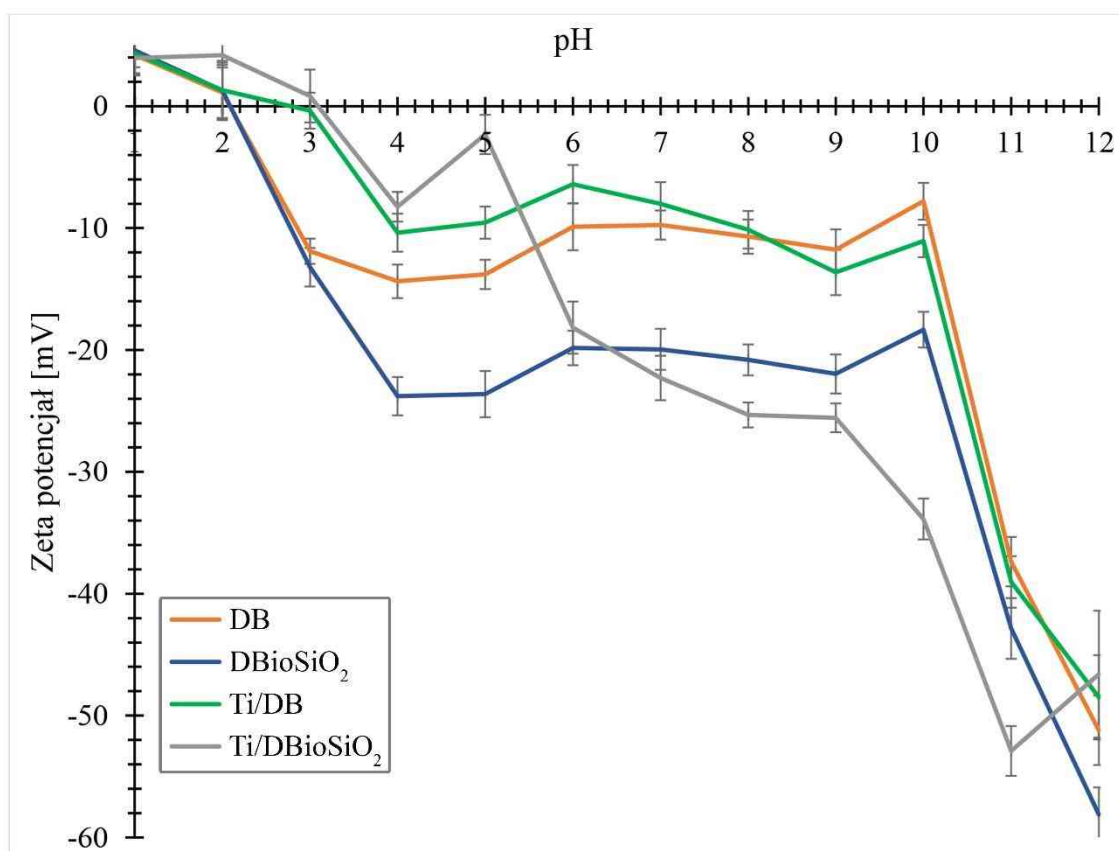
Rys. 21. Rentgenowskie dyfraktogramy proszkowe wysuszonej biokrzemionki krzemkowej domieszkowanej jonami tytanu i biokrzemionki krzemkowej Ti poddanej pirolizie w temperaturze 1000°C. Wzory XRD dla wzorców zostały pobrane z bazy danych ICDD i charakteryzują się następującymi liczbami: anataz: JCPDS 21–1272, rutyl: JCPDS 21–1276, trydymit: JCPDS 18–1170 i kware: JCPDS 46–1045.; $\text{TiO}_2/\text{DBioSiO}_2\text{P}$ – biokrzemionka domieszkowana jonami tytanu o stężeniu początkowym 15 mg Ti/L poddana pirolizie w temperaturze 1000°C.

W kilku badaniach wykorzystujących podejście biomimetyczne otrzymano krystaliczne formy TiO_2 bez wygrzewania termicznego. Kröger i wsp. [285] zaobserwowali, że wytrącanie dwutlenku tytanu z prekursora TiBALDH przez rekombinowane białko silafinowe rSilC spowodowało powstanie rutyłowego TiO_2 . Dicerson i wsp. [286] zaobserwowali, że 12-merowe peptydy fazowe wytwarzają mieszaninę amorficznych, anatazowych i monoklinicznych (β) form TiO_2 . Bansal i wsp. [287] wykorzystali prekursor tytanu K_2TiF_6 do wytrącenia, w temperaturze pokojowej, brukitowej formy TiO_2 z pomocą białek wydzielanych z grzyba *Fusarium oxysporum*. Jeffryes i wsp. [205] poprzez termiczne wyżarzanie materiału otrzymanego podczas metabolicznego wprowadzania jonów tytanu do biokrzemionki okrzemkowej z gatunku *Pinnularia*, uzyskali mieszaninę dwóch rodzajów form krystalicznych TiO_2 : anatazu i rutyłu. W widmie XRD $\text{TiO}_2/\text{DBioSiO}_2\text{P}$ zaobserwowano również piki dyfrakcyjne przy $20,87^\circ$; $26,64^\circ$ i $36,54^\circ$, które były zgodne z pikami charakterystycznymi dla kwarcu. Zauważono również piki dyfrakcyjne przy $20,47^\circ$ i $29,96^\circ$, które odpowiadają pikom charakterystycznym dla formy krystalicznej SiO_2 , jaką jest trydymit. Obecnie wiadomo, że α -kwarc jest stabilny w temperaturze około 570°C . Powyżej tej temperatury przekształca się w β -kwarc poprzez co najmniej jedną nieproporcjonalną fazę pośrednią w zakresie temperatur od 573 do $574,1^\circ\text{C}$ [288]. W temperaturze ok. 870°C następuje przejście fazowe z β -kwarcu do β 2-trydymitu, który jest wysoce stabilny do 1470°C .

4.5.7. Pomiary potencjału zeta

Stabilność otrzymanych biomateriałów oceniano poprzez pomiar potencjału zeta. Potencjał zeta (ZP) definiuje się jako potencjał elektrokinetyczny występujący na granicy między cieczą związaną i wolną, między jonami związanymi nieruchomo w warstwie adsorpcyjnej i wolnymi jonami przeciwnymi w warstwie dyfuzyjnej, nazwanej płaszczyzną ścinania. W konsekwencji potencjał zeta jest proporcjonalny do gęstości

ładunku na powierzchni koloidu, która zależy od pH [289]. Zależność potencjału zeta od pH dla otrzymanych materiałów przedstawiono na Rys. 22.



Rys. 22. Potencjał zeta wykonany w zakresie pH o wartościach 1-12, dla analizowanych materiałów

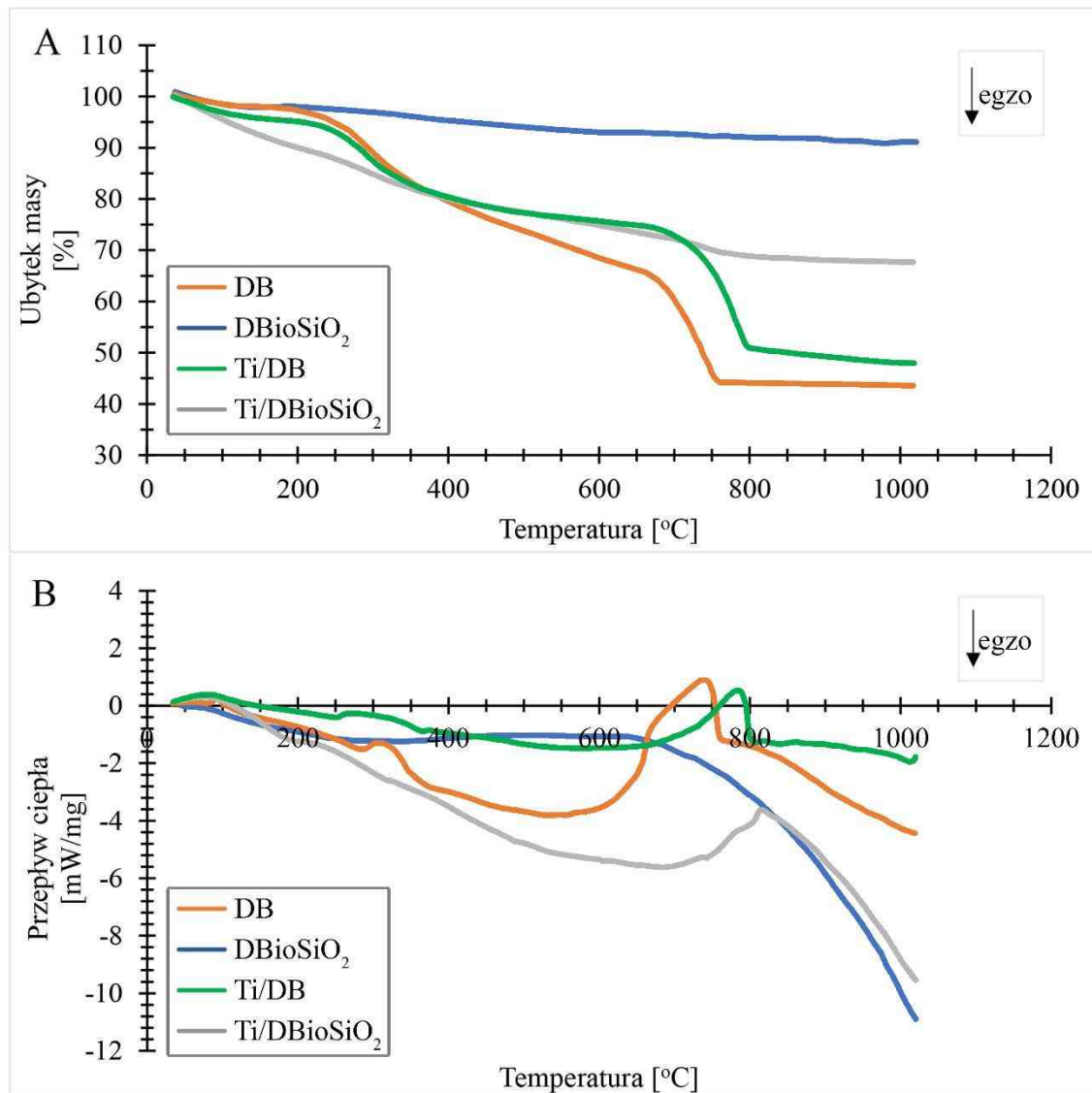
Można zauważyć, że dla biomateriałów niedomieszkowanych tytanem potencjał zeta wykazuje wartości dodatnie w zakresie pH od 1-2 (potencjał ζ od +1,1 mV do +4,6 mV) oraz wartości ujemne od 2 do 12 (potencjał ζ od -9,8 mV do -58,1 mV). Potencjał zeta materiałów domieszkowanych tytanem przyjmuje wartości dodatnie w zakresie pH od 1 do 3 (potencjał ζ od +0,8 mV do +4,3 mV) i ujemne od 3 do 12 (potencjał ζ od -0,4 mV do -52,9 mV). Gwałtowny spadek potencjału zeta w zakresie pH od 1 do 4 można przypisać jonizacji grup karboksylowych [290], szczególnie w przypadku materiałów otrzymanych z biomasy krzemek. Występowanie ujemnej wartości potencjału zeta w tak szerokim zakresie pH można przypisać obfitości grup silanolowych na powierzchni

frustuli [291], a także adsorpcji kationów obecnych w wodzie morskiej (np. Ca^{2+} , Mg^{2+}) na powierzchniach frustul, które powodują, że na powierzchniach pancerzyków okrzemek adsorbuje się więcej cząstek nano- TiO_2 [292]. Według danych literaturowych większość mikroorganizmów wykazuje ujemny potencjał zeta. Na przykład zielona alga *Chlorella* sp. miała stosunkowo niski ZP pomiędzy -17,4 a 19,8 mV niezależnie od pH (4-10) [290], a ZP okrzemki *Nitzschia* sp. wynosił -28 mV w fazie stacjonarnej [293]. Pozorny punkt izoelektryczny (IEP) w okolicach pH = 2 dla materiałów niedomieszkowanych tytanem, co pokrywa się z punktem izoelektrycznym amorficznej krzemionki SiO_2 [294]. Przesunięcie punktu izoelektrycznego z pH = 2 do pH = 3 w materiałach domieszkowanych wynika z obecności tytanu w analizowanych próbkach.

Według literatury punkt izoelektryczny nanocząstek TiO_2 zawieszonych w wodzie destylowanej znajduje się w okolicach pH = 7 [295]. Liao i wsp. badali wpływ różnych prekursorów TiO_2 na wartość potencjału zeta w funkcji pH. Stosując tertbutanolan tytanu(IV), zaobserwowali przesunięcie punktu izoelektrycznego w rejon pH = 3 [296]. Niższy punkt izoelektryczny sugeruje lepszą stabilność dyspersji cząstek w okolicach neutralnego pH ze względu na silniejsze odpychające oddziaływanie elektrostatyczne. Ponadto, niższy IEP nanocząstek TiO_2 może być przypisany obecności węglanów na powierzchni nanocząstek TiO_2 , o czym może świadczyć sygnał węglowy w wynikach EDX (Rys. 19). Kosmulski i wsp. [297] stwierdzili, że obecność węglanów przesuwa IEP tlenków metali w kierunku niższego pH. Otrzymane kompozyty wykazują najwyższą stabilność przy pH 11 i 12, gdyż dla tych wartości pH każdy biomateriał ma potencjał zeta niższy niż -30 mV, który jest potencjałem granicznym dla stabilności zawiesin [298].

4.5.8. Analiza termograwimetryczna

Analizę termograwimetryczną (TG) przeprowadzono w atmosferze azotu w celu zbadania stabilności termicznej otrzymanych materiałów (Rys. 23A). Dodatkowo podczas analizy TG zmierzono zależność przepływu ciepła od temperatury metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) (Rys. 23B).



Rys. 23. Wykresy uzyskane z analizy termograwimetrycznej (A) i skaningowej kalorymetrii różnicowej (B) otrzymanych materiałów.

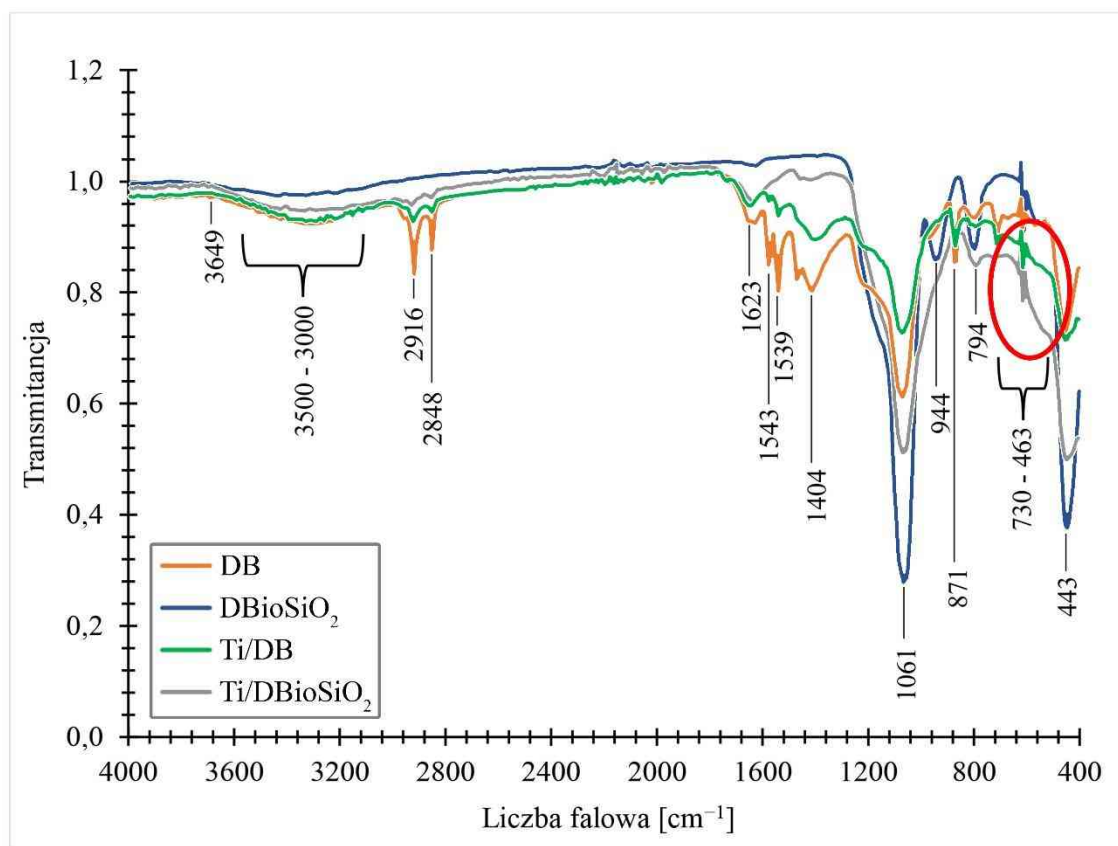
W procesie kontrolowanego ogrzewania [299] analizowanych próbek możemy wyróżnić pięć etapów utraty masy. Pierwszy etap objawia się na krzywej TG w zakresie

temperatur od 40 do około 125°C. Utrata masy w tej fazie jest różna w zależności od analizowanej próbki. Dla próbki zawierającej niedomieszkowaną biokrzemionkę ubytek masy wynosił około 3%. Próbki biomasy z domieszką i bez domieszki wykazały ubytek masy na poziomie około 5%, natomiast próbka zawierająca biokrzemionkę krzemkową domieszkowaną jonami tytanu charakteryzowała się ubytkiem masy w okolicach 11%. Ubytek masy w tej fazie może odpowiadać procesom dehydratacji (uwolnienia fizycznie związanej wody) otrzymanych materiałów [4]. Proces dehydratacji potwierdza również niewielki pik endotermiczny na krzywych DSC. Druga faza pojawiła się w zakresie temperatur od ok. 265°C do ok. 360°C, ze zmniejszeniem masy o ok. 2% dla próbki DBioSiO₂ oraz wartością w zakresie ok. 7%-13% dla pozostałych próbek. Towarzyszy temu efekt endotermiczny na krzywych DSC. Faza ta może być związana z pierwszym etapem procesu dehydroksylacji. Może ona korelować z desorpcją wicynalnych grup hydroksylowych związanych wiązaniami wodorowymi z powierzchnią frustul okrzemek [300]. Wszystkie próbki prezentowały znaczny ubytek masy (od 3% dla DBio do 22% dla DB) w zakresie od około 400°C do około 700°C, odpowiadający silnym pikom egzotermicznym na krzywych DSC. W rzeczywistości, utrata ta może być spowodowana rozkładem materii organicznej biomasy okrzemek [275] zawierającej cząsteczki takie jak lipidy i białka [301,302]. Dodatkowo, dla materiałów domieszkowanych tytanem, zakres ten pokrywa się z zakresem temperatur (400°C-480°C), odpowiadającym amorficznej przemianie TiO₂ w formę anatazu [303]. Czwarta faza została wyróżniona w zakresie temperatur od około 690°C do 800°C, z efektem endotermicznym i utratą masy odpowiadającą 16% dla DB, 20% Ti/DB, 2% Ti/DBioSiO₂ i 2% dla DBioSiO₂. Faza ta charakteryzowała się silnymi asymetrycznymi pikami DSC i mogła być spowodowana rozkładem węglanu wapnia i towarzyszącą temu emisją dwutlenku węgla [304]. Jednocześnie dla próbek domieszkowanych tytanem zakres ten obejmuje również

przemianę anatazowej formy TiO_2 w rutil ($690\text{-}750^\circ\text{C}$) [303], na co wskazują również wyniki XRD (Rys. 21). Niewielki ubytek masy analizowanych próbek z efektem endotermicznym na krzywych DSC zaobserwowano w zakresie temperatur od około 800°C do 1000°C . Etap ten może być związany z usuwaniem wewnętrznie wyodrębnionych grup hydroksylowych [305]. Można zauważyć, że końcowa pozostałość była najwyższa dla próbek oczyszczonej biokrzemionki i biokrzemionki z domieszką tytanu (ok. 90% dla DBioSiO_2 i ok. 68% dla Ti/DBioSiO_2), w porównaniu z próbkami biomasy (ok. 44% dla DB i 50% Ti/DB).

4.5.9. Widma FT-IR

Na Rys. 24 przedstawiono widma FTIR-ATR otrzymanych materiałów. W niektórych rejonach widma próbek zawierających tytan różnią się od tych, które go nie zawierają.



Rys. 24. Widma FTIR-ATR biomasy niedomieszkowanej, biomasy domieszkowanej tytanem, czystej biokrzemionki krzemkowej i biokrzemionki krzemkowej domieszkowanej tytanem

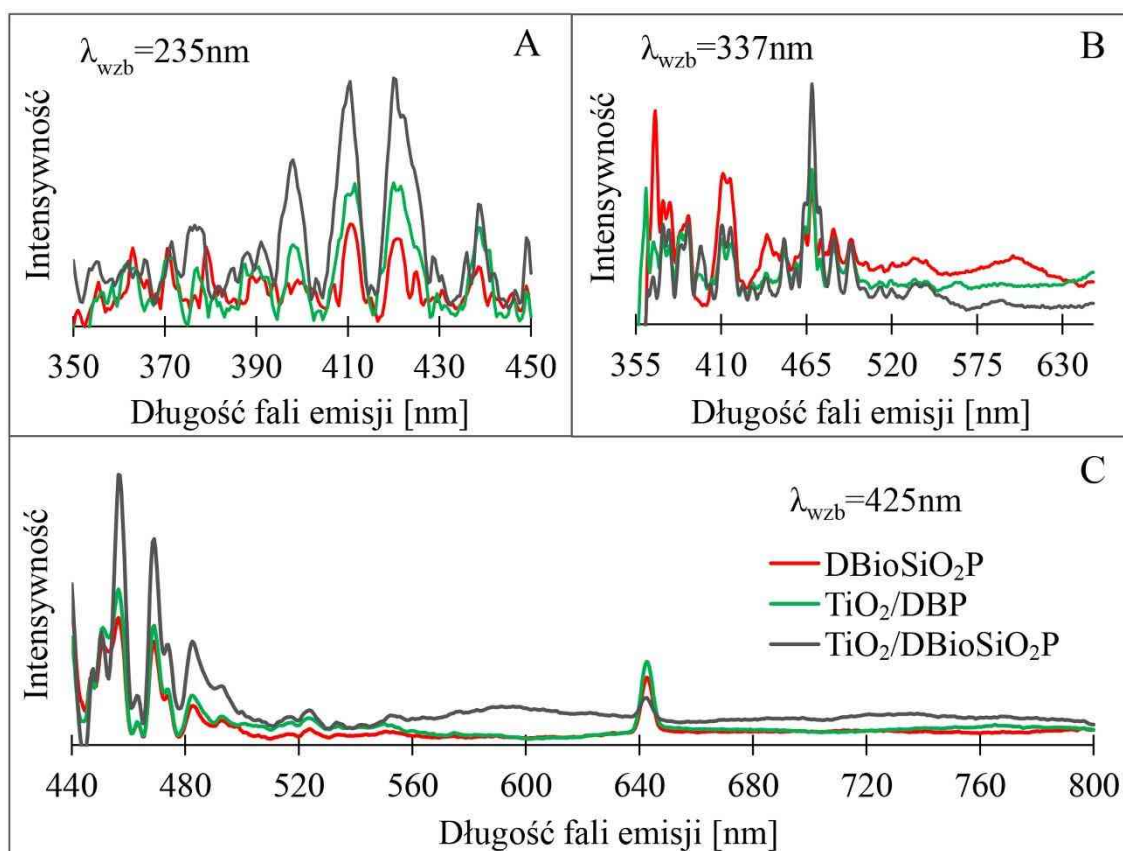
Taka sama sytuacja występuje przy porównywaniu próbek biomasy z próbkami biokrzemionki. Różnice te mogą wynikać z zawartości pierwiastka domieszkowanego (przy porównywaniu materiałów domieszkowanych i niedomieszkowanych), jak również z obecności w materiale części organicznej (przy porównywaniu biomasy i biokrzemionki). Analizując otrzymane widma FTIR można zaobserwować obecność 12 charakterystycznych sygnałów w postaci pików oraz dwóch reprezentatywnych zakresów długości fal. Pasma przy 3649 cm^{-1} prawdopodobnie odpowiada wyodrębnionym grupom hydroksylowym [306]. Szerokie pasmo od $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ związane jest z drganiami rozciągającymi O-H wody molekularnej z wiązaniami wodorowymi. Może również wynikać z obecności wiązania N-H związanego z resztami białek wytrącających biokrzemionkę, do których należą długołańcuchowe poliaminy i sylafliny, które brały udział w tworzeniu pancerzyków okrzemek [307,308]. Pojawienie się dwóch ostrych pików przy 2916 cm^{-1} i 2848 cm^{-1} prawdopodobnie odpowiada drganiom rozciągającym grup metylowych i metylenowych ($\text{CH}_3\text{-}$ i $\text{CH}_2\text{-}$), które są związane z lipidami i dlatego są najbardziej widoczne w próbkach biomasy. Trzy pasma przy 1623 cm^{-1} , 1543 cm^{-1} i 1404 cm^{-1} odpowiadają aromatycznym drganiom rozciągającym $=\text{C-C}$ [309]. Ostry pik przy 1539 cm^{-1} może być spowodowany obecnością drugorzędowych grup amidowych [310]. Pasma przy 1439 cm^{-1} odpowiada drganiom rozciągającym C-O, a pasmo przy 711 cm^{-1} związane jest z wiązaniami Ca-O w strukturze CaCO_3 [311]. Asymetryczne drgania rozciągające wiązań Si-O-Si odzwierciedla najintensywniejsze pasmo zlokalizowane przy 1061 cm^{-1} . Pasma wykryte przy 944 cm^{-1} przypisywane jest drganiom rozciągającym grup Si. Dodatkowo jest ono charakterystyczne dla okrzemek morskich [312] i wiąże się z ich amorficzną powłoką krzemionkową [313,314]. Ostry pik przy 871 cm^{-1} , wykryty w próbkach zawierających część organiczną, może być związany z występowaniem drgań zginających C-H [310]. Pasma pojawiające się przy 794 cm^{-1}

przypisywane jest symetrycznym drganiom rozciągającym wiązań Si. Według Adamo [315] pasmo to jest charakterystyczne dla krzemionki amorficznej, takiej jak opal A. Szerokie pasmo w zakresie $730\text{-}463\text{ cm}^{-1}$, obecne w widmach próbek domieszkowanych tytanem, przypisywane jest drganiom rozciągającym Ti-O oraz mostkowi Ti-O-Ti [316]. Dla czystego TiO_2 piki przy 463 i 728 cm^{-1} są charakterystyczne dla TiO_2 w postaci anatazu. Dodatkowo sygnał przy 463 cm^{-1} jest przypisany drganiom wiązania Ti-O w sieci TiO_2 , a sygnał przy 730 cm^{-1} jest przypisany drganiom rozciągającym Ti-O-Ti [317]. Ostatnie pasmo, występujące przy 443 cm^{-1} , związane jest z drganiami zginającymi Si-OH w grupach siloksanowych [307,313,315,318].

4.5.10. Właściwości fotoluminescencyjne

Analizując otrzymane widma fotoluminescencji (Rys. 25) należy zauważyć, że we wszystkich materiałach można wyróżnić cztery główne typy aktywności (PL). Pierwszy typ związany jest z intensywną emisją w rejonie ultrafioletowym ($380\text{-}450\text{ nm}$). W tym regionie najbardziej silna fotoluminescencja pojawia się w pikach przy długości fali 399 nm , 410 nm i 421 nm , przy fali wzbudzenia 305 nm . Drugi typ związany jest z ostrą emisją w regionie niebieskim widma światła widzialnego (wzbudzenie przy 337 nm i emisja przy 469 nm oraz wzbudzenie przy 425 nm i emisja przy długościach fali 457 nm i 469 nm). Trzeci typ aktywności fotoluminescencyjnej charakteryzuje się emisją w regionie zielonym. W tym rejonie widma światła widzialnego występuje emisja przy długości fali 526 nm przy dwóch falach wzbudzenia: 337 nm i 425 nm . Czwarty typ fotoluminescencji występuje w czerwonym regionie światła widzialnego. W tym regionie emisja fotoluminescencji występuje przy długości fali 644 nm przy fali wzbudzenia 425 nm . Piąty typ aktywności fotoluminescencyjnej pojawia się na widmach PL uzyskanych dla biokrzemionki domieszkowanej jonami tytanu. Typ ten związany jest z szerokim

pikiem emisji przechodzącym przez region żółty i pomarańczowy (od 565 nm do 635 nm przy fali wzbudzenia 425 nm).



Rys. 25. Widma emisyjne fotoluminescencji pochodzącej od pirolizowanej biokrzemionki krzemkowej oraz pirolizowanych kompozytów na bazie biomasy i biokrzemionki krzemkowej, domieszkowanych jonami tytanu: widmo w zakresie od 350 nm do 450 nm, przy długości fali wzbudzającej 235 nm (A), widmo w zakresie od 355 nm do 635 nm, przy długości fali wzbudzającej 337 nm (B) oraz widmo w zakresie od 440 nm do 800 nm, przy długości fali wzbudzającej 425 nm (C).

Aktywność fotoluminescencyjna biokrzemionki krzemkowej w regionie ultrafioletowym może być przypisana fluorescencji resztek organicznych wbudowanych w strukturę biokrzemionki [319,320]. Dodatkowo, w materiałach domieszkowanych jonami tytanu, aktywność fotoluminescencji w obszarze ultrafioletowym może być związana ze wzbudzeniami samouwięzionymi zlokalizowanymi na oktaedrze TiO_6 , wynikającymi z obecności anatazowej formy TiO_2 w próbce [321,322]. Źródłem emisji w regionach niebieskiego i zielonego światła widzialnego mogą być defekty

powierzchniowe -Si-O- , związane z nanoporowatą krzemionką [203], a także niemostrujące centra dziur tlenowych ($\bullet\text{O-Si}\equiv$), samouwięzione ekscytyony (-O-O-) oraz neutralne wakancje tlenowe ($\equiv\text{Si Si}\equiv$) [106,323–325]. Niewielka aktywność fotoluminescencyjna w rejonie światła czerwonego może wynikać z pozostałości części organicznych. Za emisję w rejonie żółtym i pomarańczowym w biokrzemionce domieszkowanej jonami tytanu mogą być odpowiedzialne defekty powierzchniowe związane z wakancjami tlenowymi lub defekty związane z obecnością jonów Ti^{4+} sąsiadującymi z wakancjami tlenowymi [326]. Wu i wsp. [327] wspomnieli, że emisja fotoluminescencji obserwowana w zakresie widzialnym może być spowodowana rekombinacją koncentracji nośników pomiędzy pasmem walencyjnym a wakancjami tlenowymi pełniącymi rolę poziomów donorowych. Interpretując otrzymane widma fotoluminescencji materiałów domieszkowanych jonami tytanu można zauważyć wzrost intensywności sygnału w rejonach światła ultrafioletowego, niebieskiego i zielonego w porównaniu z czystą biokrzemionką. Wynika to z faktu, że przy 421 nm, 469 nm i 526 nm występują wakancje tlenowe w anatazowej formie TiO_2 , które wzmacniają wakancje tlenowe pochodzące z krzemionki [322,328]. Nanocząstki TiO_2 prezentują silną absorpcję w UV, co znajduje odzwierciedlenie we wzmacnieniu fotoluminescencji biokrzemionki w niebieskim i zielonym regionie światła widzianego. Charakter takiego wzmacnienia emisji może być spowodowany aktywnością fotoluminescencyjną nanocząstek TiO_2 w wąskim zakresie pasm UV i aktywacją wakancji tlenowych biokrzemionki, a także tym, że TiO_2 w formie anatazowej również wykazuje szeroką emisję w regionie światła niebieskiego i zielonego przy wzbudzeniu UV [329,330] co mogłoby wzmacniać niebieską i zieloną fluorescencję z biokrzemionki.

4.6. Kompozyty piroizowanej biomasy okrzemek domieszkowanej heteroepitaksjalnie rosnącymi nanocząstkami Ag/TiO₂: synteza, charakterystyka i zastosowanie antybakteryjne

4.6.1. Zarys problematyki badawczej

Wiele analiz epidemiologicznych wykazało, że skażenie mikrobiologiczne zawsze wiązało się z podwyższonym ryzykiem przenoszenia chorób zakaźnych. Liczne patogeny takie jak bakterie, grzyby, wirusy i pierwotniaki, mogą być przyczyną różnych chorób. Wykazano, że antybiotyki są skuteczne w zwalczaniu drobnoustrojów chorobotwórczych i uratowały wiele istnień ludzkich w ostatnim stuleciu [331–333]. Niestety częste i nadmierne stosowanie konwencjonalnych antybiotyków spowodowało rozległą wielolekową oporność w zakażeniach bakteryjnych [334–336]. Dlatego konieczne jest opracowanie skutecznych i bezpiecznych środków przeciwbakteryjnych [337–339]. Z tego też powodu wielu badaczy skierowało swoje zainteresowanie w stronę nanokompozytów, gdyż są one wydajnym i niedrogim materiałem do leczenia różnych chorób [340–342]. Szczególną uwagę poświęcono nanocząstkom srebra, ponieważ wiadomo, iż wykazują one silne działanie przeciwdrobnoustrojowe i są szeroko stosowane w medycynie ze względu na ich wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową i stosunkowo dobrą biokompatybilność [343–345]. Jednakże efekty cytotoksyczne i działanie bakteriobójcze AgNP pozostają dwiema głównymi sprzecznościami, ponieważ mechanizmy zaangażowane w toksyczność nanocząsteczek dla mikroorganizmów mogą być również aktywne przeciwko komórkom ssaków. Stosunkowo silne działanie toksyczne na komórki ludzkie i niska wydajność penetracji AgNPs przez biofilmy bakteryjne są dwiema głównymi przeszkodami w ich zastosowaniach biomedycznych [346]. Poszukiwanie nowych nanokompozytów zawierających nanometryczne srebro jest istotnym wyzwaniem dla współczesnej nauki,

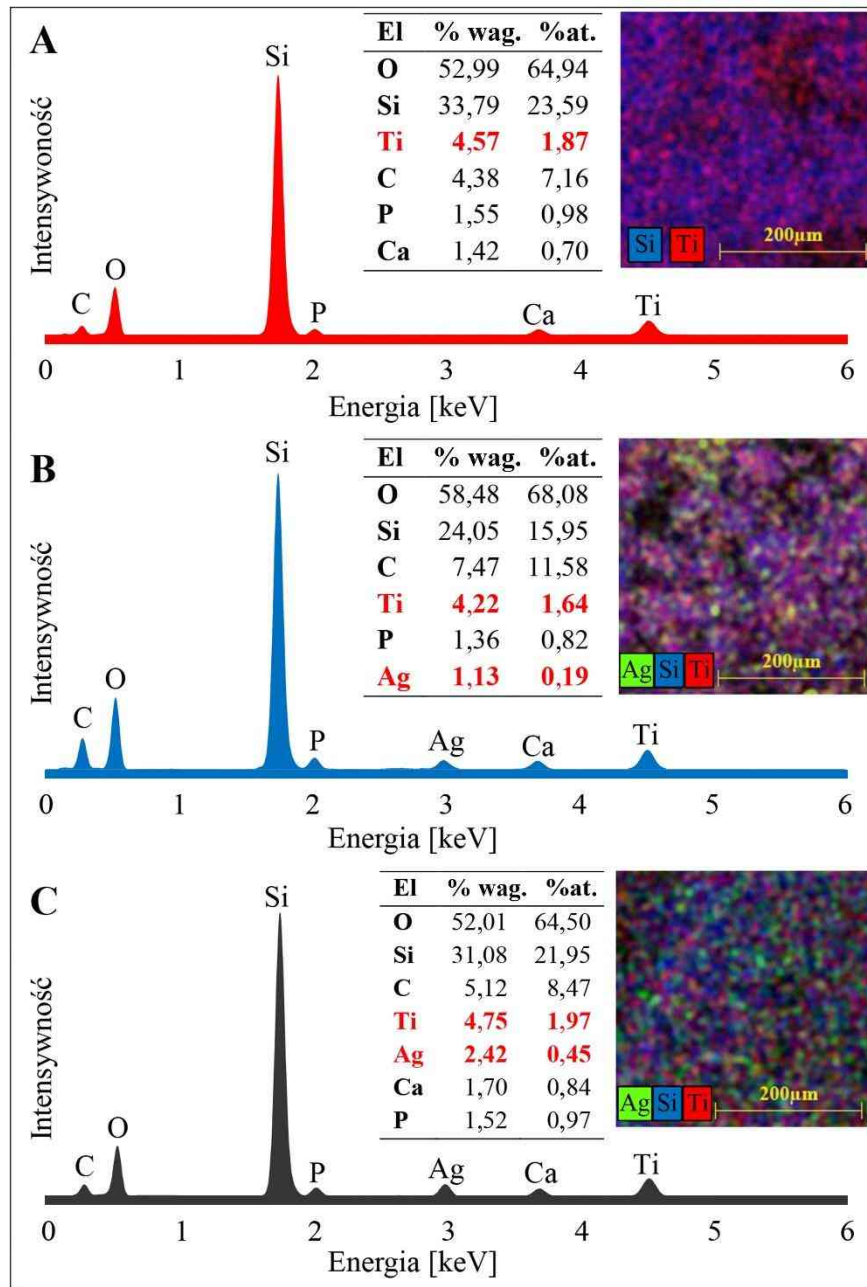
ponieważ musi ono zakładać minimalizację toksycznego działania AgNPs, co jest nadrzędnym warunkiem jego zastosowania medycznego. Idealnym rozwiązaniem tego problemu wydają się być hybrydowe kompozyty stworzone z nanocząstek półprzewodnika i zredukowanego srebra [347–349]. W produkcji tego typu materiałów jako substancję półprzewodnikową dla nanocząstek Ag zastosowano szerokie spektrum surowców, w tym tlenki metali, np. tlenek miedzi (CuO) [350], tlenek cynku (ZnO) [351] i tlenek tytanu (TiO₂) [352]. Połączenie nanokompozytu Ag/TiO₂ okazało się obiecującym materiałem antybakteryjnym, wykazującym niską biotoksyczność. Jako środek przeciwbakteryjny, materiały nanokompozytowe z dwutlenkiem srebra i tytanu są powszechnie znane ze swoich właściwości przeciwpatogennych; badania wykazały skuteczność przeciwko różnym szczepom bakterii Gram-dodatnich (*B. subtilis*, *S. aureus*, *MRSA*), Gram-ujemnym (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) i grzybom (*C. albicans*) [353–356]. Nanocząstki TiO₂ są jednym z najczęściej stosowanych materiałów do fotokatalitycznych zastosowań antybakteryjnych ze względu na ich niski koszt, stabilność chemiczną i nietoksyczność dla człowieka [357]. Jednakże, TiO₂ jest półprzewodnikiem z szeroką przerwą energetyczną 3,26 eV dla anatazu [358], co powoduje, że może być on stosowany tylko w promieniowaniu UV, które stanowi ~5% energii słonecznej, podczas gdy światło widzialne zawiera około 45% energii słonecznej. Przeprowadzone badania wykazały jednak, że nanocząstki Ag zwiększają fotoaktywność TiO₂ poprzez obniżenie szybkości rekombinacji jego fotowzbudzonych nośników ładunku. W rezultacie domieszkowany srebrem TiO₂ znacznie poprawił fotokatalityczną inaktywację bakterii [359,360]. Z drugiej strony Ag/TiO₂ mają tendencję do agregacji, co powoduje uwalnianie nanocząstek do środowiska podczas procesu oczyszczania [361]. Aby tego uniknąć i móc bezpiecznie wykorzystać Ag/TiO₂ jako środek przeciwbakteryjny, należy je nałożyć na odpowiednie podłoże, charakteryzujące się wysoką biokompatybilnością

i nietoksycznością oraz doskonałą sorpcją, uniemożliwiającą uwalnianie się czynnika toksycznego do otoczenia. Idealnym podłożem dla tego rodzaju nanokompozytów wydają się być jednokomórkowe mikroalgi – okrzemki. Już od lat 60. XIX wieku, kiedy to Alfred Nobel użył ziemi okrzemkowej do stabilizacji nitrogliceryny przy wytwarzaniu dynamitu [362] wiadomym było, iż potencjał drzemiący w okrzemkach jako naturalnym adsorbencie, jest niezwykle wysoki. Ze względu na naturalną zdolność okrzemek do syntezy amorficznej krzemionki (krzemionkowych egzoszkieletów) o hierarchicznej, trójwymiarowej strukturze [4] ci „naturalni mikrotechnologowie” mogą być istotną inspiracją w projektowaniu i wytwarzaniu nowych, nanokompozytowych materiałów nieorganicznych. Wyjątkowe właściwości okrzemek budzą duże zainteresowanie ze względu na możliwość wykorzystania ich jako efektywnych adsorbentów czy szablonów. Opublikowano już wyniki badań zeolityzacji hierarchicznych nanostruktur okrzemek [363] oraz wykorzystania ich trójwymiarowych struktur egzoszkieletów jako wzorca (repliki) w syntezie nanomateriałów metodami chemicznymi [111,273,364].

W niniejszym rozdziale pracy po raz pierwszy opisana została synteza, charakterystyka i działanie przeciwbakteryjne nanokompozytów Ag/TiO₂/pirolizowana biomasa okrzemek z gatunku *Pseudostaurosira trainorii* (DBP). Nanokompozyty scharakteryzowano za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej (XRD), potencjału zeta (ζ -potencjał) oraz właściwości fotoluminescencyjnych (PL). Morfologia, rozkład wielkości i wielkość cząstek nanokompozytu zostały ocenione za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej i transmisyjnej mikroskopii elektronowej ze spektrometrem rentgenowskim z dyspersją energii (SEM-EDX i TEM - EDX). Zsyntetyzowane nanokompozyty Ag/TiO₂/DBP działały znakomicie jako środek przeciwbakteryjny przeciwko *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*.

4.6.2. Badania przy użyciu spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energii (EDX).

Skład elementarny pirolizowanej biomasy okrzemek (DBP) z metabolicznie domieszkowanym TiO_2 (TiO_2/DBP) oraz jej srebrowych kompozytów $\text{AgNPs}/\text{TiO}_2/\text{DBP}$ określono przy użyciu SEM-EDX (Rys. 26).

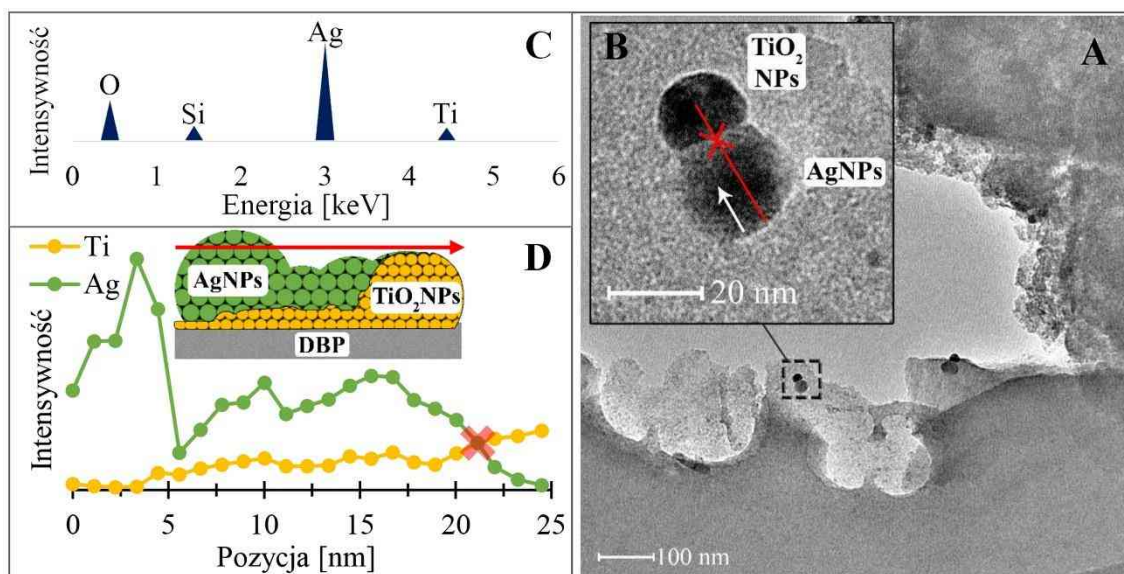


Rys. 26. Widma SEM-EDX, skład pierwiastkowy kompozytów i mapy dystrybucji domieszkowanych pierwiastków w kompozytach: (A) biomasa okrzemek (DBP) z metaboliczną domieszką TiO_2 (TiO_2/DBP), (B i C) TiO_2/DBP oraz z chemiczną domieszką AgNPs (odpowiednio 1,13% (B) i 2,42% (C)).

Analiza ta wykazała, że głównymi składnikami uzyskanych materiałów były tlen oraz krzem. Wyższa zawartość węgla w próbkach świadczy o obecności grafityzowanej po pirolizie części organicznej komórek okrzemek [275]. Obecność Ca i P może wynikać z faktu, że te pierwiastki były związane z materią organiczną i pozostały w jej grafityzowanej części po pirolizie. SEM-EDX uwidocznił także porównywalną zawartość tytanu we wszystkich badanych kompozytach (odpowiednio 4,57%, 4,22% i 4,75%), co wskazuje, że proces osadzania TiO_2 na komórkach okrzemek przebiegł z wysoką wydajnością. Zawartość srebra w kompozytach AgNPs/ TiO_2 /DBP była różna, co wynika z zastosowania w syntezie nanocząstek metalicznego srebra roztworów azotanu srebra o dwóch różnych stężeniach. Analizując uzyskane wartości procentów wagowych srebra w obu kompozytach (Rys. 26B i 26C) można stwierdzić, iż proces osadzania AgNPs na biomacie okrzemek przebiegł z wydajnością ok. 22,6% dla kompozytu o zawartości srebra 1,13% AgNPs/ TiO_2 /DBP oraz z wydajnością ok. 24,2% dla kompozytu o zawartości srebra 2,42% AgNPs/ TiO_2 /DBP. Stosunek srebra do tytanu w kompozytach wynosił 0,27 oraz 0,51. Stosunek Ag:Ti wynoszące 0,42 otrzymał Krishnan i wsp. w trakcie „zielonej syntezy” kompozytu glinki bentonitowej wspomaganą srebrem i dwutlenkiem tytanu [365]. Wykonany mapping dla uzyskanych kompozytów wskazuje na równomierny rozkład tytanu oraz srebra w tych materiałach.

4.6.3. Badania przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej

Wyniki transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) przedstawiono na Rys. 27. Mikrofotografie TEM (Rys. 27A i 27B) pokazują morfologię, kształt i wymiary nanocząstek srebra oraz tytanu w próbce TiO_2 /DBP po adsorpcji srebra z roztworu o początkowym stężeniu srebra 10 mg/L.



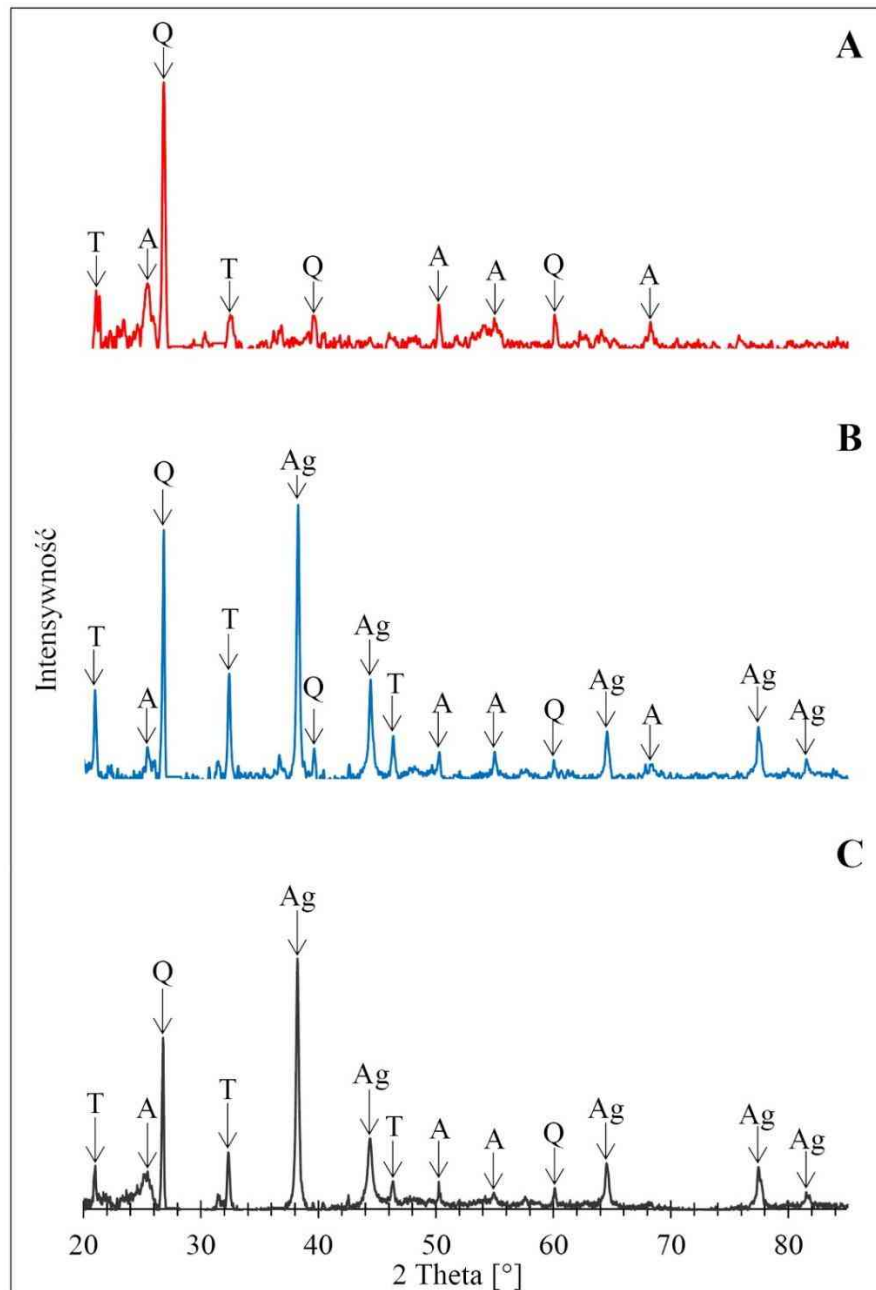
Rys. 27. Obrazy TEM nanokompozytu AgNPs/TiO₂/DBP: rozmieszczenie AgNPs i TiO₂ (A), pojedyncza polikrystaliczna forma AgNPs/TiO₂ (B), widmo TEM-EDX AgNPs/TiO₂ (C) oraz skan liniowy STEM-EDX AgNPs/TiO₂, wraz z modelem wzrostu epitaksjalnego Volmera – Webera (D).

Widocznym jest, że quasi-sferyczne formy nanocząstek AgNPs i TiO₂ są równomiernie rozproszone na powierzchni pirolizowanej biomasy. Co ciekawe, nanocząstki metalicznego srebra i dwutlenku tytanu często tworzą hybrydowe bliźniacze pary i znacznie rzadziej występują w formie pojedynczych nanocząstek. Analiza STEM-EDX (Rys. 27C) dwóch połączonych ze sobą nanocząstek (Rys. 27B) wykazała również, iż większe nanocząstki składają się głównie ze metalicznego srebra, a mniejsze - dwutlenku tytanu TiO₂. Niewielka zawartość krzemu może być efektem matrycy pirolizowanej biomasy [366]. Widoczna na zdjęciach TEM (Fig. 27B) wielkość nanocząstek srebra oscyluje w granicach 20 nm. Jest to zgodne z warunkami prowadzenia przez nas syntezy AgNPs, gdyż w badaniach Gontijo i wsp. [367] wykazali, że w pH ≈ 7 nanocząstki srebra charakteryzują się rozmiarem około 20 nm. Nanocząstki srebra w zakresie od 2 do 50 nm uzyskali także inni badacze przygotowujący nanokompozyty srebra korzystając z różnych reduktorów oraz montmorylonitu jako nośnika stałego [361,368]. Rozmiary nanocząstek TiO₂ mieszczą się w okolicach w zakresie 10 nm (Rys.

27D). Natomiast, profil pierwiastkowy liniowego skanowania STEM-EDX (Rys. 27D), przeprowadzonego wzdłuż pary hybrydowych, nanocząstek AgNPs i TiO₂ wykazał heterogeniczność ich składu i struktury. Według danych z tego profilu, substratem dla zarodkowania i formowania się AgNPs są wcześniej sformowane nanocząstki TiO₂. Zjawisko to jest znane jako heteroepitaksja (wzrost heteroepitaktyczny), kiedy nowy kryształ rośnie na krystalicznym podłożu z innego materiału [369,370]. Metoda wzrostu epitaksjalnego jest komercyjnie stosowana do wytwarzania zintegrowanych warstw krystalicznych z różnych materiałów w przemyśle półprzewodnikowym [370]. Z doniesień literaturowych wiadomo o możliwości heteroepitaksjalnego wzrostu nanocząstek SrZrO₃ na podłożu SrTiO₃ [371], nanocząstek Ag na nanorurkach Si [372], nanocząstek NiO na tlenku tytanianu strontu [373] czy też monokrystalicznego grafenu na heksagonalnym azotku boru [374]. Mechanizm powstawania tego typu polikrystalicznych form nanocząstek w rozpatrywanym przypadku (osadzanie AgNPs na TiO₂) można szczegółowo wyjaśnić w oparciu o klasyczną teorię nukleacji, a w szczególności o wzrost epitaksjalny Volmera-Webera jako jednego z trzech podstawowych modeli wzrostu epitaksjalnego (Volmer-Weber, Frank-van der Merwe i Stranski-Krastanov) [375,376]. Zgodnie z trybem osadzania Volmera-Webera, warstwa epitaksjalna wyrasta z trójwymiarowych jąder na powierzchni wzrostu podłoża, gdy adsorbat-adsorbat są silniej przyciągane do siebie niż do podłoża. W konsekwencji w wyniku lokalnej nukleacji powstają wyspy i tworzy się nieplanarna warstwa epitaksjalna. Ścieżka reakcji jest napędzana przez minimalizację (kompensację) swobodnej energii powierzchniowej [372,377].

4.6.4. Analiza techniką proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej

Rentgenowskie dyfraktogramy proszkowe pirolizowanej biomasy z unieruchomionym TiO_2 (TiO_2/DBP) oraz kompozytów $\text{AgNPs}/\text{TiO}_2/\text{DBP}$ przedstawiono na Rys. 28.



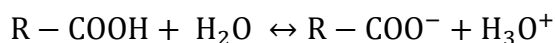
Rys. 28. Dyfraktogramy rentgenowskie badanych próbek pirolizowanej biomasy (DBP): (A) z metabolicznie domieszkowanym tlenkiem tytanu(IV) (TiO_2/DBP), TiO_2/DBP z domieszkowanym srebrem: 1,13% (B) i 2,42% (C). T – trydymit, Q – kwarc, A – anataz, Ag – srebro metaliczne.

Widma rentgenowskie potwierdzają zarówno obecność nanocząstek TiO_2 w formie anatazu (Rys. 28A-C) jak i zredukowanych nanocząstek metalicznego srebra (Rys. 28B, C). Widmo XRD otrzymane dla TiO_2/DBP (Rys. 28A) ukazało charakterystyczne piki dla anatazowej formy TiO_2 przy kątach 2θ równych $25,28^\circ$ i $48,01^\circ$ (RRUFF ID: R070582.9). Mimo, iż temperatura pirolizy równa 800°C mogłaby wskazywać na przejście z amorficznej formy tlenku tytanu(IV) do formy krystalicznej jaką jest rutyl to w przypadku nanocząstek bardziej stabilną formą TiO_2 okazuje się anataz [378]. Różnica ta wynika z wpływu zmian energii powierzchniowej na przemiany fazowe. W przypadku materiałów o strukturze mikrometrycznej prawdopodobieństwo zajścia przemiany fazowej określone jest zmianą wybranej funkcji termodynamicznej (entalpii swobodnej, całkowitej zmiany energii, entropii), która zdefiniowana jest przez odpowiednie parametry t. j. temperatura, ciśnienie, liczba moli, a udział zmian wielkości powierzchni jest zanedbywany. Natomiast w przypadku nanomateriałów bardzo istotny wpływ na przemiany fazowe ma zmiana energii powierzchniowej [379,380]. Dodatkowo, właściwości termodynamiczne nanomateriałów i związane z nimi przemiany fazowe ściśle zależą od rozmiarów i kształtów ziaren, a także powierzchni właściwej. Tlenek tytanu (IV) w postaci anatazu jest preferowaną formą dla ziaren mniejszych od 11 nm [380], czyli takich które otrzymano w niniejszej pracy (Rys. 27B). Widmo przedstawione na Rys. 28A przedstawia także sygnały odpowiadające krystalicznym formom krzemionki: kwarcowi – $26,66^\circ$; $39,51^\circ$ i $60,02^\circ$ (RRUFF ID: R040031) oraz trydymitowi – $19,28^\circ$; $21,64^\circ$ i $32,66^\circ$ (RRUFF ID: R090042). Obecnie dobrze wiadomo, że α -kwarc uzyskuje stabilność w temperaturze ok. 570°C . Powyżej tej temperatury przechodzi w β -kwarc przez co najmniej jedną pośrednią fazę niewspółmierną w przedziale temperatur od 573 do $574,1^\circ\text{C}$ [381]. W temperaturze prowadzenia pirolizy następuje

przejście fazowe z β -kwarcu do β 2-trydymitu, który do 1470°C charakteryzuje się wysoką stabilnością, stąd też wyraźne piki od obu tych form krystalicznych. Sygnały od anatazu, kwarcu i trydymitu zaobserwowano także na widmach przedstawionych na Rys. 28B i 28C. Dodatkowo, na powyższych widmach widoczne są piki dyfrakcyjne przy 38,17°; 44,35°; 64,48° oraz 77,43° (RRUFF ID: R070416) będące zgodnymi z pikami charakterystycznymi dla metalicznego srebra.

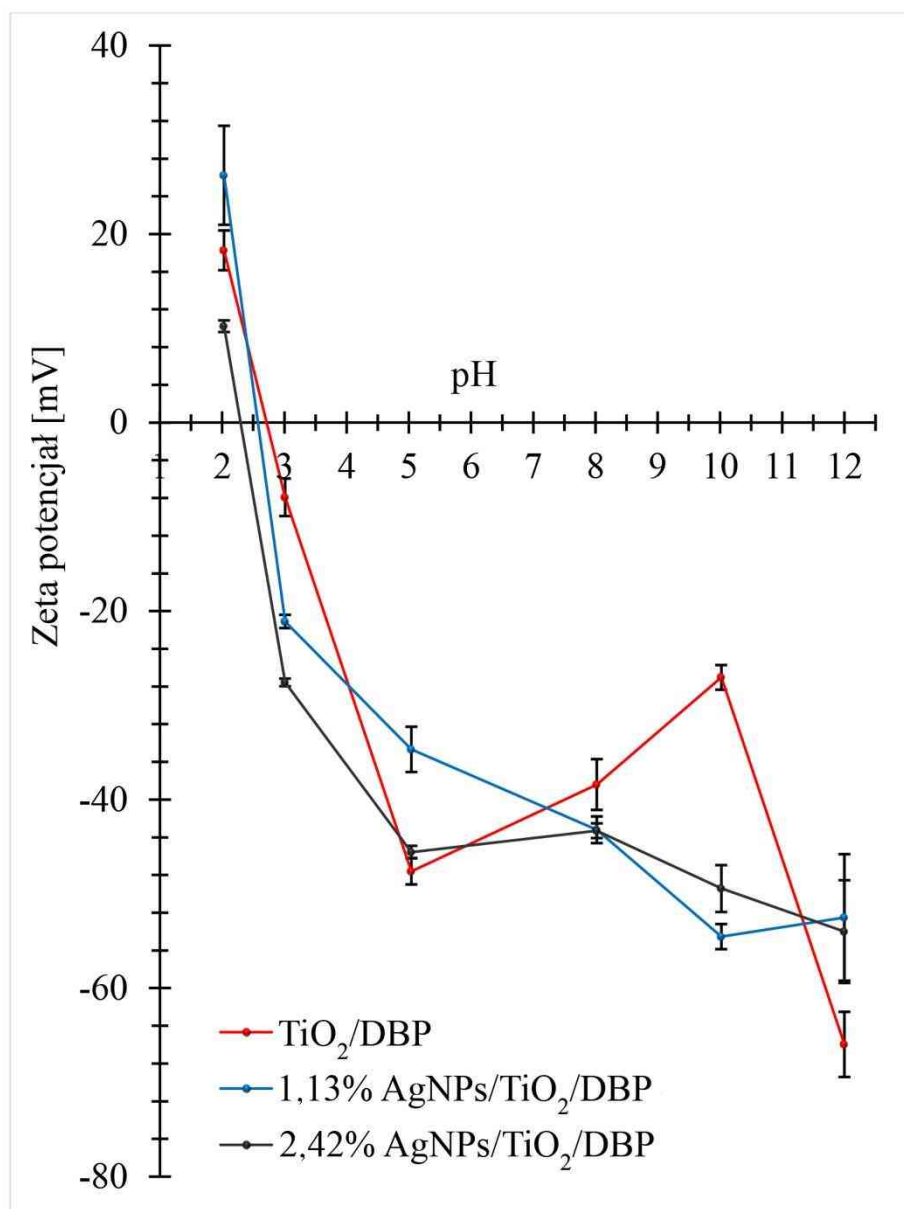
4.6.5. Badania potencjału zeta

Zależność potencjału zeta od pH otrzymanych materiałów przedstawiono na Rys. 29. Zauważalne jest, że we wszystkich badanych kompozytach potencjał zeta wykazuje wartości dodatnie w zakresie pH od ok. 2 – 2,5 (potencjał ζ od 0,00 mV do +26,23 mV), natomiast wartości ujemne od ok. 2,5 do 12 (ζ -potencjał od 0,00 mV do -65,97 mV). Gwałtowny spadek potencjału zeta w zakresie pH od ok. 2,5 do 5 można przypisać jonizacji grup karboksylowych [290]:



Występowanie ujemnej wartości potencjału zeta w tak szerokim zakresie pH można przypisać obfitości grup silanolowych na powierzchni pancerzyków [291]. Pozorny punkt izoelektryczny (IEP) przy pH = 2,5 dla materiału niezawierającego zredukowanych nanocząstek srebra wynika z obecności tytanu w analizowanym kompozycie. Poniżej pH = 3,5 nanocząstki TiO_2 są naładowane dodatnio [382], natomiast na powierzchni frustul występują silnie ujemne grupy silanolowe – stąd przesunięcie IEP od pH = 2, charakterystycznego dla czystej krzemionki [294] do pH = ok. 2,5 dla biomasy. Przesunięcie IEP w kierunku niższych wartości pH w przypadku kompozytów zawierających AgNPs jest spowodowane dodatnim ładunkiem powierzchniowym AgNPs w zakresie pH od 2 do 3 [383]. Niższy punkt izoelektryczny sugeruje lepszą stabilność

dyspersji cząstek wokół obojętnego pH ze względu na silniejsze odpychające oddziaływanie elektrostatyczne. Potwierdzają to przedstawione na Rys. 29 wyniki, gdyż widocznym jest, iż stabilnością w najszerszym zakresie pH (od 3 do 12) charakteryzował się kompozyt z największą zawartością srebra 2.42% AgNPs/TiO₂/DBP.



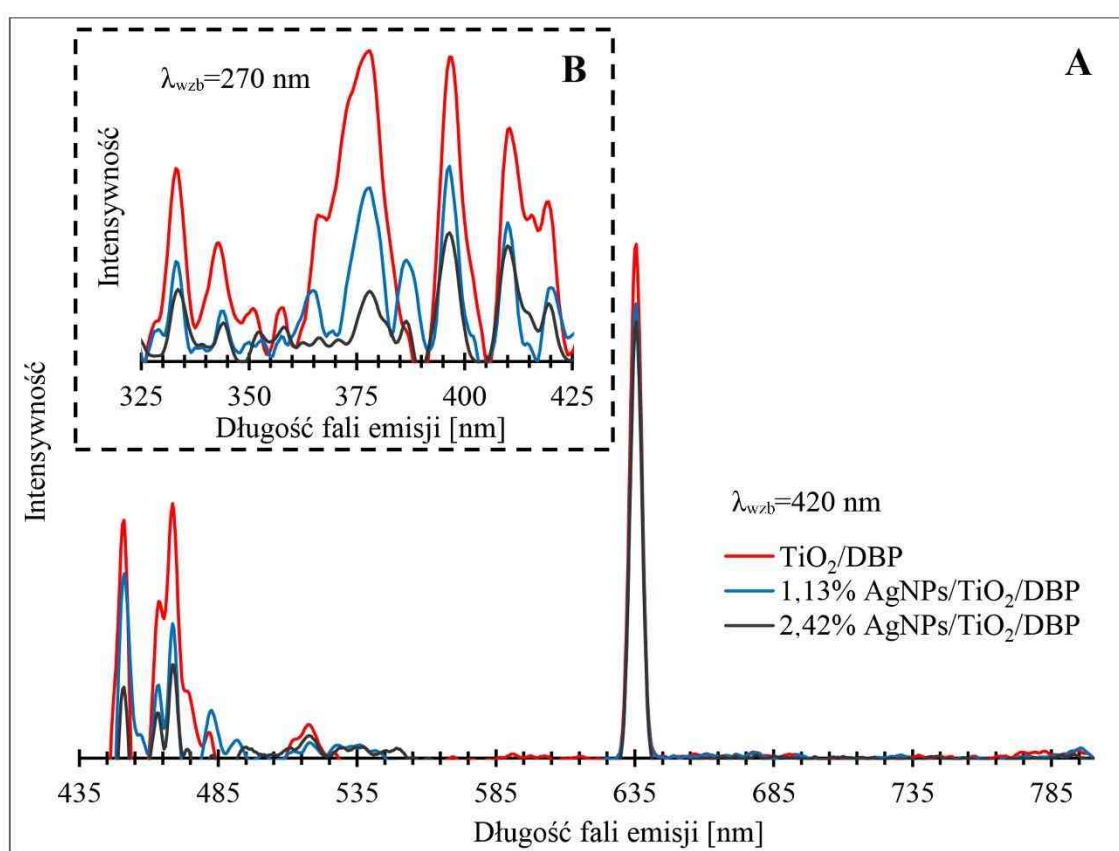
Rys. 29. Wpływ pH na wartość potencjału zeta dla TiO₂/DBP i jego kompozytów srebrowych.

Powyżej pH = 5 każdy otrzymany kompozyt charakteryzował się wysoką stabilnością, gdyż powyżej tego punktu każdy materiał posiada potencjał zeta niższy niż

-30 mV, co uważa się za potencjał ograniczający stabilność zawiesin [298]. Kompozyt 1.13% AgNPs/TiO₂/DBP ze względu na wysoką, dodatnią wartość potencjału zeta oraz bardzo dobrą stabilność dyspersji może być niezwykle pożądanym substratem do tworzenia nowych urządzeń optoelektronicznych [384].

4.6.6. Właściwości fotoluminescencyjne

Widma fotoluminescencji (ang. *photoluminescence*, PL) otrzymanych materiałów dla różnych długości fali wzbudzenia (270 nm i 420 nm) przedstawiono na Rys. 30.



Rys. 30. Widma emisyjne fotoluminescencji pirolizowanej biomasy z metabolicznie osadzonym TiO₂ (TiO₂/DBP) i jej kompozytów zawierających różne stężenia AgNPs: widmo w zakresie od 435 nm do 800 nm, przy długości fali wzbudzającej 420 nm (A), charakterystyczny zakres emisji TiO₂/DBP przy długości fali wzbudzającej 270 nm (B).

Analizując otrzymane widma PL należy zauważyć, że we wszystkich materiałach można wyróżnić cztery główne typy aktywności fotoluminescencji. Pierwszy typ PL

związany jest ze wzbudzeniem (270 nm) i emisją w rejonie ultrafioletu (325 nm - 425 nm). W tym rejonie najbardziej intensywna fotoluminescencja występuje przy 333 nm, 343 nm, 379, nm, 397 nm, 410 nm, 416 nm i 419 (Rys. 30B). Drugi typ związany jest z emisją w niebieskim rejonie widma widzialnego (451 - 483 nm). Piki emisyjne przy 451 nm i przy 483 nm przy wzbudzeniu 420 nm są widoczne dla wszystkich typów kompozytów (Rys. 30A). Trzeci rodzaj aktywności fotoluminescencyjnej charakteryzuje się emisją w rejonie zielonym (508 nm - 524 nm). W tym rejonie widma światła widzialnego najintensywniejsza fotoluminescencja pojawia się przy długości fali 518 nm przy wzbudzeniu 420 nm. Ostatni, czwarty rodzaj aktywności PL związany jest z emisją w rejonie światła czerwonego (630 nm - 640 nm). Najbardziej intensywny pik występuje przy 635 nm przy wzbudzeniu 420 nm. Aktywność fotoluminescencyjna otrzymanych kompozytów w rejonie ultrafioletu może być spowodowana fluorescencją resztek części organicznej w pirolizowanej biomacie [319,320]. Piki emisji w UV w zakresie od 340 nm do 416 nm mogą być związane z bezpośrednimi przejściami pasmowymi w TiO_2 , które wpływają na krawędź X strefy Brillouina (BZ), a mianowicie przejście $X_{1b} \rightarrow X_{1a}$ i $X_{1b} \rightarrow \Gamma_3$, przejście pośrednie $\Gamma_{1b} \rightarrow X_{2b}$ i $\Gamma_{1b} \rightarrow X_{1a}$ [328,385] lub może być spowodowane samouwięzionymi ekscytonami, lub wolnymi ekscytonami zlokalizowanymi na oktaedrze TiO_6 [386] wynikającymi z obecności w próbce anatazowej formy TiO_2 [321,322], potwierdzonej badaniami XRD (Rys. 28). Analizując aktywność fotoluminescencyjną kompozytów w rejonie światła niebieskiego, zaobserwowano dwa rodzaje piku emisji fluorescencji. Te dwa piki emisji fluorescencji odpowiadają obecności AgNPs w zsyntetyzowanych kompozytach i są związane z relaksacją ruchu elektronowego plazmonów powierzchniowych oraz rekombinacją elektronów sp z dziurami w paśmie d [387]. Dodatkowo, emisja przy 483 nm może być spowodowana przeniesieniem ładunku z Ti^{3+} na anion tlenowy w kompleksie TiO_6^{8-} związany

z wakancjami tlenowymi (V_o) [388,389]. Źródłem emisji w zielonych zakresach światła widzialnego otrzymanych kompozytów mogą być defekty powierzchniowe -Si-O- związane z nanoporowatą krzemionką [203], a także niemostrujące centra dziur tlenowych, uwięzione ekscytyony oraz neutralne wakancje tlenowe [323]. Garcia i wsp. [327] wspomnieli, że emisja fotoluminescencji obserwowana w widmie widzialnym może być spowodowana średnio skoncentrowaną rekombinacją pomiędzy pasmem walencyjnym a wakancjami tlenowymi pełniącymi rolę poziomów donorowych. Charakter takiej emisji w zakresie zielonym może wynikać z aktywności fotoluminescencyjnej nanocząstek TiO_2 w wąskim zakresie pasm UV i aktywacji biokrzemionkowych wakancji tlenowych, jak również z faktu, że TiO_2 w postaci anatazu również wykazuje szeroką emisję w zakresie światła zielonego pod wpływem wzbudzenia UV [328]. Emisja w zakresie czerwonym widzialnym przy długości fali 635 nm może być przypisana wakancjom tlenowym związanym z Ti^{3+} w anatazowej postaci tytanu [328,385,386,388,389]. Wakancje tlenowe w siatce TiO_2 są rodzajem defektu wewnętrznego, który tworzy pośrednie stany energetyczne w paśmie dwutlenku tytanu. Te wakancje tlenowe działają jako centra fotoindukowanej rekombinacji dla par elektronów (e^-) i dziur (h^+). Dlatego też emisja ta wystąpiła w wyniku rekombinacji par e^-/h^+ poprzez luki tlenowe. Ponadto, zaobserwowano zmniejszoną intensywność emisji dla kompozytów AgNPs/ TiO_2 /DBP w porównaniu z TiO_2 /DBP bez domieszkowania, co oznacza, że domieszkowanie jonów Ag skutecznie zminimalizowało niekorzystną rekombinację e^-/h^+ , powodując powstanie większej ilości wolnych nośników ładunku biorących udział w reakcjach fotokatalitycznych [390].

4.6.7. Właściwości antybakteryjne

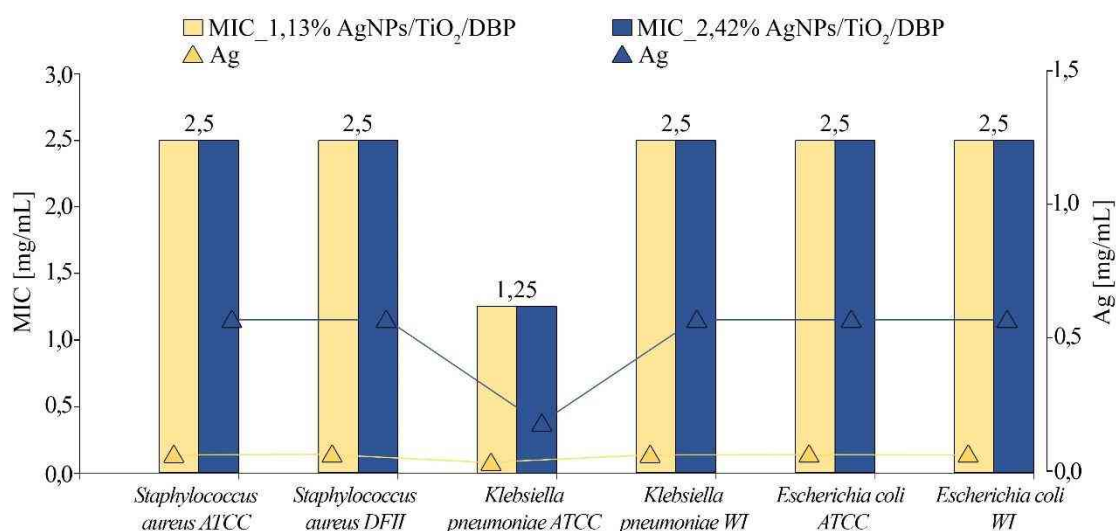
Tab. 10 i Rys. 31 przedstawiają wartości MIC dwóch preparatów nanokompozytowych zawierających różne stężenia srebra (1,13% AgNPs/TiO₂/DBP i 2,42% AgNPs/TiO₂/DBP), które były badane przeciwko wybranym szczepom bakterii.

Tab. 10. Minimalne stężenie hamujące (MIC) AgNPs/TiO₂/DBP. DFI - izolat zakażenia stopy cukrzycowej; ATCC – repozytorium szczepów bakteryjnych – American Type Culture Collection; WI - izolat rany.

Szczep bakteryjny		Minimalne stężenie hamujące AgNPs/TiO ₂ /DBP [mg/ml]		
		TiO ₂ /DBP	1,13% AgNPs/TiO ₂ /DBP	2,42% AgNPs/TiO ₂ /DBP
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	—	2,5 (0,0283 Ag mg/ml)	2,5 (0,0605 Ag mg/ml)
	DFI	—	2,5 (0,0283 Ag mg/ml)	2,5 (0,0605 Ag mg/ml)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC	—	1,25 (0,0142 Ag mg/ml)	1,25 (0,0303 Ag mg/ml)
	WI	—	2,5 (0,0283 Ag mg/ml)	2,5 (0,0605 Ag mg/ml)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC	—	2,5 (0,0283 Ag mg/ml)	2,5 (0,0605 Ag mg/ml)
	WI	—	2,5 (0,0283 Ag mg/ml)	2,5 (0,0605 Ag mg/ml)

Wyniki wskazują, że wszystkie otrzymane preparaty nanokompozytowe wykazują potencjał przeciwdrobnoustrojowy wobec szczepów ATCC, DFI, jak również izolatów WI, wykazując wartość MIC około 2,5 mg/mL wobec wszystkich badanych szczepów z wyjątkiem *Klebsiella pneumoniae* ATCC, gdzie wartość MIC była o połowę niższa (1,25 mg/mL). W porównaniu z nanokompozytem TiO₂/DBP bez zawartości srebra, preparaty zawierające 1,13% i 2,42% srebra wykazywały potencjał przeciwdrobnoustrojowy wobec wszystkich badanych gatunków. Warto zauważyć, że uzyskane wyniki nie wskazują na zależność od stężenia nanokompozytów, ale na

zależność zawartości srebra od potencjału przeciwdrobnoustrojowego. Sugeruje się zatem, że o efekcie inhibicyjnym decydowała zawartość srebra (0,0283 mg i 0,0605 mg) zawarta w 2,5 mg nanokompozytów. Ponadto, mimo że wartości MIC obu badanych nanokompozytów (1,13% AgNPs/TiO₂/DBP i 2,42% AgNPs/TiO₂/DBP) wynosiły 2,5 mg/mL, to zawartość srebra 0,0283 mg/mL była wystarczająca do zahamowania wzrostu badanych szczepów ATCC, DFI i WI. Jedynie *Klebsiella pneumoniae* ATCC była bardziej wrażliwa na niższą zawartość srebra (0,0142 mg/mL) w porównaniu do pozostałych badanych szczepów. Nie jest wykluczone, że wielkość nanocząstek wpływa na potencjał przeciwdrobnoustrojowy, gdy wzrost stężenia jonów srebra generuje większe rozmiary nanocząstek.



Rys. 31. Potencjał aktywności przeciwdrobnoustrojowej otrzymanych nanokompozytów AgNPs/TiO₂/DBP wobec wybranych szczepów bakteryjnych. ATCC – repozytorium szczepów bakteryjnych – American Type Culture Collection, DFI - izolat zakażenia stopy cukrzycowej, WI - izolat rany, NI - brak efektu hamującego.

Z drugiej strony - morfologia, kształt i wymiary nanocząstek srebra i tytanu w próbce TiO₂/DBP mogą również decydować o potencjale przeciwdrobnoustrojowym, gdy większe nanocząstki składają się głównie z metalicznego srebra, a mniejsze

z dwutlenku tytanu TiO₂. Ponadto, hybrydowe nanocząstki są równomiernie rozproszone na powierzchni pirolizowanej biomasy i tworzą hybrydowe wyspy epitaksjalne, co zostało zarejestrowane w badaniu mikroskopowym.

Szereg interakcji biochemicznych wyjaśnia potencjał przeciwdrobnoustrojowy preparatów srebra [391,392]. Jednakże dokładny mechanizm działania jest nadal przedmiotem dyskusji. Zdolność nanokompozytu srebra do uszkodzenia błony komórkowej bakterii jest szeroko opisywana i uważa się ją za mechanizm podstawowy. Z kolei wpływ wtórnych jonów srebra poprzez mechanizm "konia trojańskiego" również był opisywany [393]. W kontekście nanokompozytów o właściwościach fotokatalitycznych, wykazano, że gatunki ROS są dominującym mechanizmem zwiększającym aktywność przeciwdrobnoustrojową poprzez efekty fotoekscytacji [394]. W obecnych badaniach stwierdzono, że otrzymane preparaty AgNPs/TiO₂/DBP wykazują wysoką aktywność fotoluminescencyjną. Można zatem postawić hipotezę, że częściowo efekt przeciwdrobnoustrojowy jest skorelowany z aktywnością fotoluminescencyjną. Jednak, aby udowodnić taką teorię, należałoby zaprojektować i przeprowadzić dodatkowe badania.

Wiele badań wykazało potencjalne zastosowanie preparatów srebra w farmakologii i kosmetologii [395–397]. Włączenie kompozytów na bazie srebra do maści lub hydrożeli może zapobiec dostarczaniu wolnych jonów do środowiska [396,398,399]. Z drugiej strony, wykazano synergistyczne działanie nanocząstek srebra wobec izolatów klinicznych [400]. SAH Jalali i wsp. wykazują wzrost działania przeciwbakteryjnego po dodaniu TiO₂ do nanocząstek srebra, spadek wartości MIC z 12,5 i 25 ppm do 6,25 (*E. coli*) i 12,5 ppm (*S. aureus*) [401]. To samo zjawisko zaobserwowano w przypadku niniejszego badania, które wykazało zwiększenie efektu przeciwdrobnoustrojowego

TiO₂/DBP poprzez obecność zawartości srebra. Co więcej, otrzymane preparaty srebra, oparte na TiO₂/DBP, wykazują wyższy potencjał przeciwdrobnoustrojowy wobec tych samych szczepów bakterii, w porównaniu do nanokompozytu kaolinitowego, gdzie wartość MIC wynosiła 10 mg/mL, a zawartość srebra 0,06 mg/mL [402]. Co więcej, wyniki niniejszych badań wykazują prawie taką samą aktywność przeciwdrobnoustrojową, jak opisana przez S.A.H. Jalali i wsp., nawet dla szczepów klinicznych [401]. Zjawisko to można tłumaczyć efektem synergicznym generowanym przez zarówno srebro jak i tlenek tytanu w kontekście aktywności fotoluminescencyjnej. Ponadto, w przypadku nanokompozytów ze srebrem kaolinitowym potencjał przeciwdrobnoustrojowy wykazuje zależność od stężenia, natomiast w przypadku srebra TiO₂/DBP – nie.

4.7. Biosynteza nowych materiałów kompozytowych (NdVO₄NPs/pirolizowana biomasa okrzemkowa) o luminescencji up-konwersyjnej

4.7.1. Problematyka badawcza

Pierwiastki ziem rzadkich (REE) wzbudziły w ostatnich latach duże zainteresowanie. Większość z nich nie jest w rzeczywistości rzadka pod względem obfitości, a termin "rzadki" powinien dotyczyć raczej trudnego procesu ich wydobycia, ponieważ takie pierwiastki mają tendencję do występowania razem w przyrodzie i nie ulegają separacji w konwencjonalny sposób [403]. Chociaż REE są często charakteryzowane jako unikalna grupa, w praktyce każdy pojedynczy pierwiastek ma określony zestaw zastosowań końcowych. Ich ciekawe właściwości optyczne, takie jak luminescencja, konwersja w górę, szeroka transparentność optyczna czy wysoka dwójłomność, wynikają głównie z mnogości przejść w obrębie stanów elektronowych 4f n [404]. Wydajność wzbudzenia 4f n w jonie lantanowca może być zwiększona poprzez transfer ładunku z materiału gospodarza o wyższym współczynniku absorpcji. Grupa ortowanadanowa, VO₄³⁻, jest

dobrym kandydatem na gospodarza jonu trójwartościowego, ponieważ może wzbudzić większość jonów lantanowców poprzez transfer ładunku w grupie VO_4^{3-} , po którym następuje transfer energii do emisyjnego jonu lantanowca. Ortowanadany ziem rzadkich są zatem jedną z kluczowych klas nieorganicznych materiałów funkcjonalnych opartych na REE. Wśród wanadanów ziem rzadkich, NdVO_4 należy do struktury cyrkonowej z grupą przestrzenną D_{4h}^{19} [405]. W związku z tym jon lantanowca w tym kryształce ma niską symetrię, co sprzyja elektrycznym przemianom dipolowym, co skutkuje wyższymi stałymi szybkości promieniowania i zmniejszeniem procesów wygaszania. Wanadan neodymu jest jednym z najlepiej zbadanych ortowanadanów lantanowców typu ABO_4 . Krystalizują one w strukturze tetragonalnej utworzonej z lekko zniekształconego tetraedru jonu VO_4^{3-} i jonu pierwiastka ziem rzadkich Nd^{3+} pomiędzy sąsiednimi tetraedrami. Każdy jon Nd^{3+} otoczony jest dwuściennie przez osiem jonów tlenu [406].

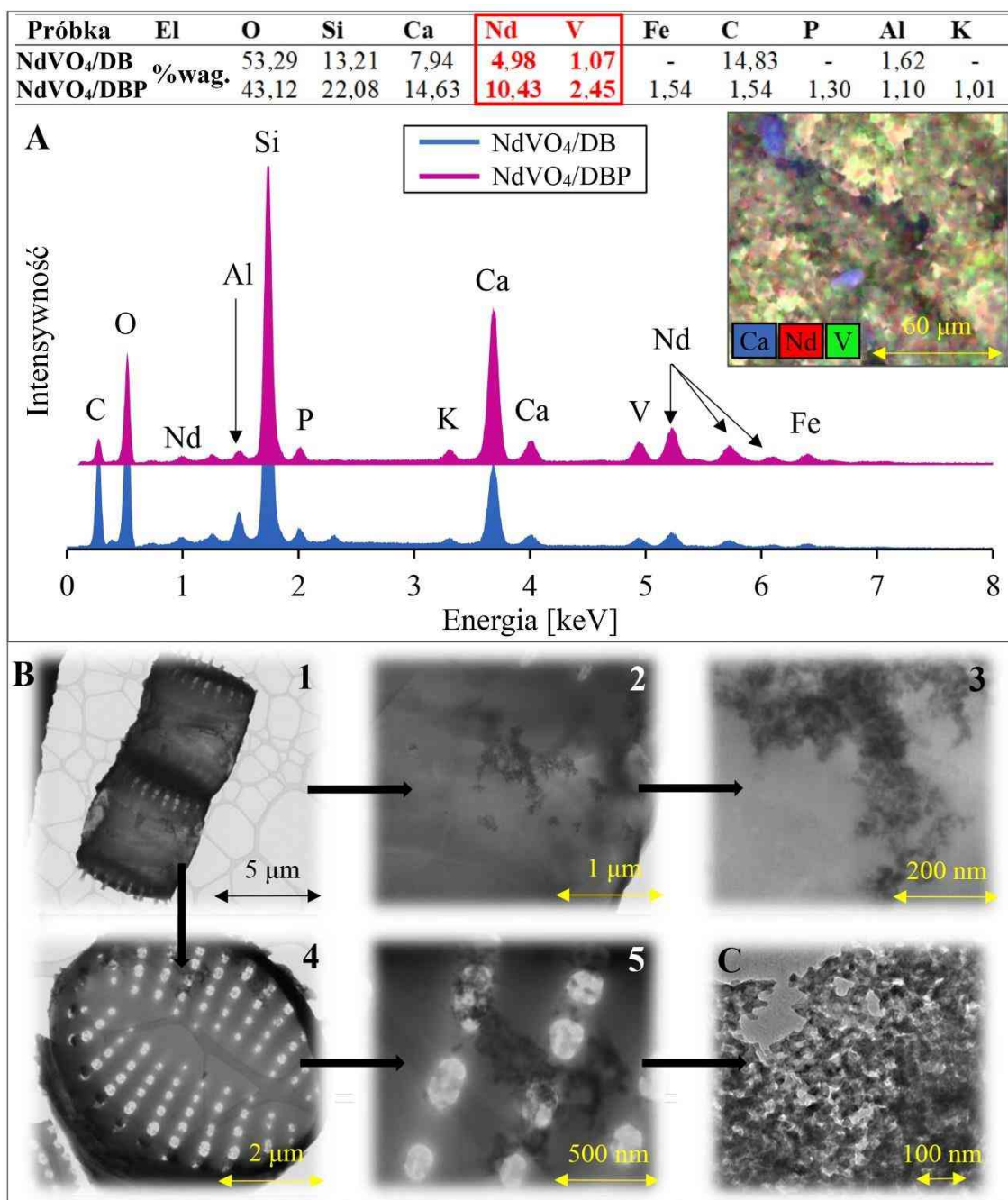
Przeprowadzono liczne badania materiałów optycznych na bazie NdVO_4 [407–409]. NdVO_4 domieszkowany Y jest znanym materiałem laserowym o współczynniku absorpcji na poziomie pięciokrotnie wyższym przy długości fali 808 nm niż dioda laserowa $\text{Nd:Y}_3\text{Al}_5\text{O}$ [408]. Ponadto wykazano, że NdVO_4 wykazuje aktywność fotokatalityczną w degradacji barwników i zanieczyszczeń organicznych, która jest porównywalna lub nawet wyższa od komercyjnego TiO_2 [407,410]. Dzięki dużej powierzchni właściwej i efektom rozmiaru kwantowego, materiały nanokrystaliczne oferują właściwości, które zwykle nie są obserwowane w dużych cząstkach. W konsekwencji, ortowanadany lantanowców w postaci nanokrystalicznej wykazują właściwości, które czynią je potencjalnymi materiałami do fluorescencji wielofotonowej, znacznikami biochemicznymi, ogniwami słonecznymi, diodami elektroluminescencyjnymi (LED), sensorami utleniającymi i środkami kontrastowymi w obrazowaniu rezonansu magnetycznego [411–415]. Dotychczas opracowano jednak

kilka metod syntezy nanostruktur NdVO_4 (synteza hydrotermalna, mikrofalowa lub sonochemiczna, współstrącanie, reakcje metatezy). Wszystkie te metody mają określone wady - konieczność obróbki cieplnej w wysokich temperaturach, długi czas reakcji (do kilku dni), kosztowne oprzyrządowanie czy stosowanie toksycznych rozpuszczalników [406].

W rozdziale przedstawiono wyniki badań biosyntezy nowych kompozytów NdVO_4NPs /biomasa okrzemkowa o anty-Stokesowskiej luminescencji z wykorzystaniem metabolicznego domieszkowania komórek okrzemek neodymem i wanadem w procesie hodowli okrzemek. Opisano zieloną metodę otrzymywania krystalicznych nanocząstek NdVO_4 pokrywających komórki okrzemek w postaci klastrów.

4.7.2. Badania mikroskopowe

Wyniki analizy spektralnej SEM-EDS suchej i pirolizowanej biomasy domieszkowanej NdVO_4 przedstawiono na rysunku 36A. Analiza ta wykazała, że głównymi składnikami otrzymanych materiałów były tlen, węgiel, krzem i wapń. Spadek zawartości węgla w próbce pirolizowanej w porównaniu z próbką bez obróbki termicznej wskazuje na obecność grafityzowanej części organicznej komórek okrzemek pozostałych po procesie pirolizy [275]. Wysoka zawartość wapnia w próbkach sugeruje obecność węglanów wapnia (w próbce bez pirolizy) lub ortokrzemianów wapnia (w próbce po pirolizie), co potwierdzają wyniki XRD (Rys. 33). Obie próbki charakteryzowały się również wysoką zawartością neodymu i wanadu, wynoszącą odpowiednio 4,98% Nd i 1,07% V dla NdVO_4/DB oraz 10,43% Nd i 2,45% V dla NdVO_4/DBP . Mapowanie przeprowadzone dla otrzymanych kompozytów wskazuje na równomierny rozkład neodymu i wanadu w tych materiałach.



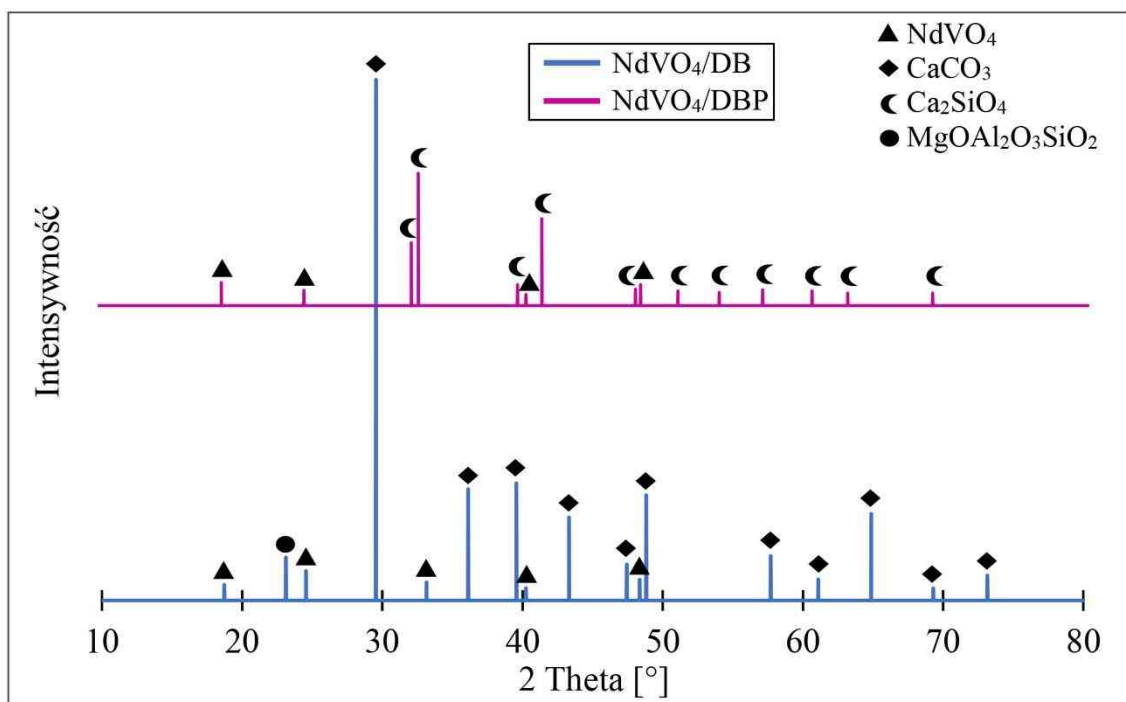
Rys. 32. Widma SEM-EDS, skład pierwiastkowy otrzymanych kompozytów oraz mapa rozkładu pierwiastków domieszkowanych w NdVO₄/DBP (A). Obrazy STEM przedstawiające morfologię i strukturę pirolizowanych komórek okrzemek ozdobionych formami klastrowymi NdVO₄NPs w różnych powiększeniach (B.1-5), B.1 - komórki okrzemek w postaci kolonialnych wstęg, B.4 - pojedyncza komórka okrzemek, obraz TEM jednowarstwowego płatkowego klastra nanokrystalitów NdVO₄ (C).

Próbki zostały również zbadane przy użyciu skaningowego transmisyjnego mikroskopu elektronowego w celu analizy morfologii, rozmieszczenia, kształtu i rozmiaru powstałych nanocząstek. Rys. 32B przedstawia porównanie obrazów STEM

okrzemkowych kompozytów zawierających NdVO₄NPs bez pirolizy (Rys. 32B1) i po pirolizie (Rys. 32B2). Obrazy te szczegółowo pokazują skomplikowaną strukturę okrzemek. Można dostrzec architekturę całego pancerzyka okrzemek, szczegóły struktury porów oraz rozkład, kształt i rozmiar powstałych nanocząstek NdVO₄. Rys. 32C przedstawia obraz TEM krystalitów (nanocząstek) NdVO₄ o wymiarach 30-40 nm tworzących skupiska krystalitów w cienkiej warstwie nieregularnych form płatkowych. Możliwe jest zaobserwowanie form trygonalnych pryzmatycznych lub kwadratowych płytek nanokrystalitów NdVO₄. Morfologia kwadratowych płytek jest charakterystyczna dla nanocząstek homologów pierwiastków ziem rzadkich, takich jak NdVO₄ [416]. Rozmiar i lokalizacja tych płytek na skorupach okrzemek są różne, jednak ich obecność jest charakterystyczna dla wszystkich kompozytów, niezależnie od obróbki termicznej. W rozdziale dotyczącym domieszkowania biomasy i biokrzemionki okrzemowej jonami tytanu (Rozdz. 4.3.) uzyskano podobne powłoki [112], ale nadal charakter wiązania powstałych płytek z krzemionkową powierzchnią pancerzyka okrzemek pozostaje niewyjaśniony. Wiązanie to może wynikać z połączenia grup silanolowych i resztek białek odpowiedzialnych za tworzenie krzemionkowej powłoki (sylafiny) z nanocząsteczkowym płatkem.

4.7.3. Badania techniką proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej

Proszkowe wzory dyfrakcyjne promieniowania X suszonej i pirolizowanej biomasy immobilizowanej NdVO₄ przedstawiono na Rys. 33. Dyfraktogramy rentgenowskie uzyskane dla NdVO₄/DB i NdVO₄/DBP wykazały te same wyraźne piki krystaliczne zlokalizowane w przybliżeniu przy $2\theta = 18,73^\circ, 24,56^\circ, 40,25^\circ, 48,36^\circ$. Wykryte piki krystaliczne zostały zidentyfikowane jako charakterystyczne piki dyfrakcyjne wanadanu neodymu (kod ref.: 00-015-0769, NdVO₄).



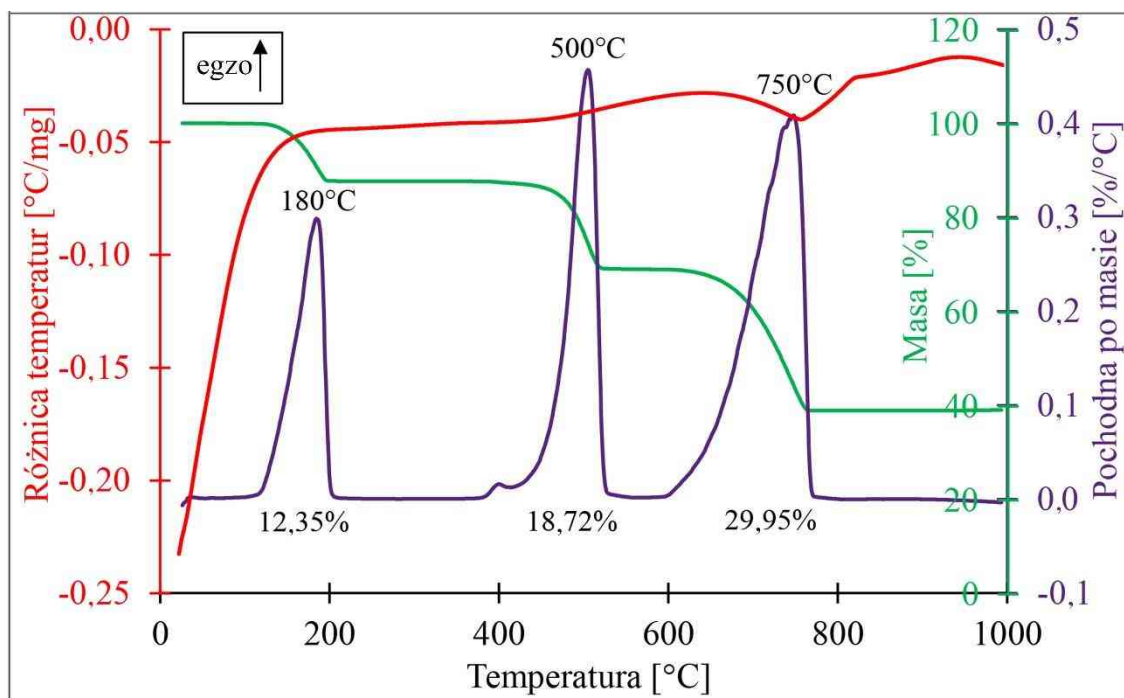
Rys. 33. Dyfraktogramy rentgenowskie otrzymanych kompozytów.

Widmo XRD wysuszonej biomasy okrzemkowej domieszkowanej metabolicznie NdVO_4 pokazuje intensywne piki zlokalizowane przy $2\theta = 29,54^\circ$, $36,12^\circ$ i $39,57^\circ$, które odzwierciedlają piki węgla wapnia (kod ref.: 00-001-0837, CaCO_3). Wskazuje to, że mineralizacja węgla wapnia w biomase okrzemek nastąpiła już na etapie jej suszenia. Zaobserwowano również charakterystyczny pik przy $2\theta = 23,12^\circ$, wskazujący na obecność $\text{MgOAl}_2\text{O}_3\text{SiO}_2$ w próbce (kod ref.: 00-024-0346, $\text{MgOAl}_2\text{O}_3\text{SiO}_2$). Dyfraktogram rentgenowski otrzymany dla NdVO_4/DBP wykazuje wyraźne piki (2θ : $32,17^\circ$, $32,65^\circ$, $39,67^\circ$ i $41,38^\circ$) charakterystyczne dla krzemianu wapnia wg standardów JCPDS (kod ref.: 00-003-0753, Ca_2SiO_4).

4.7.4. Analiza termogravimetryczna

Obróbka termiczna biomasy okrzemek w temperaturze 800°C spowodowała całkowity rozkład kalcytu CaCO_3 do tlenku wapnia CaO . Obecność krzemianu wapnia może być spowodowana reakcją typu ciało stałe-ciało stałe zachodzącą w procesie

pirolizy pomiędzy fazą stałą CaO a amorficzną biokrzemionką frustul okrzemek [275]. Dane dotyczące stabilności termicznej i przemian fazowych biomasy okrzemkowej z domieszką NdVO₄ uzyskane za pomocą analizy termogravimetrycznej (analiza termogravimetryczna TG, termogravimetryczna analiza pochodna DTG oraz różnicowa kalorymetria skaningowa DSC) przedstawiono na Rys. 34.



Rys. 34. Przebiegi termogravimetryczne i stabilność termiczna kompozytów zawierających klastry NdVO₄

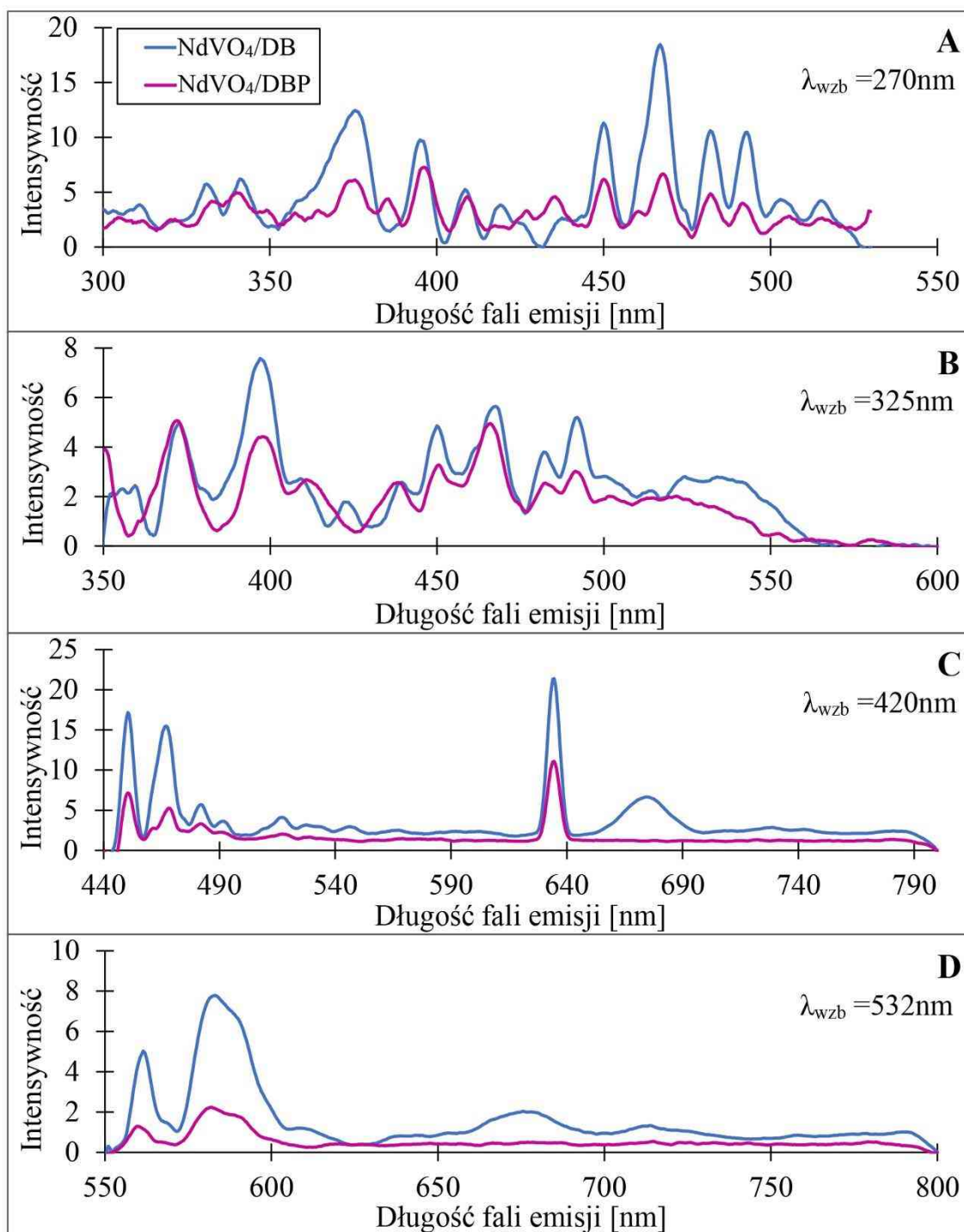
Krzywe termografometryczne pokazują trzy różne fazy utraty masy. Pierwsza faza z ubytkiem masy około 12,35% pojawiła się w zakresie temperatur 111-199°C. Ubytek masy związany był z procesami dehydratacji (uwalniania fizycznie związanej wody) biomasy, czemu towarzyszył efekt endotermiczny na krzywej DTA oraz wyraźny pik na krzywej DTG. Druga faza wystąpiła w zakresie temperatur 394-529°C z redukcją masy o około 18,72%. Charakteryzowała się ona efektem egzotermicznym widocznym na krzywej DTA oraz intensywnym pikiem DTG skupionym w temperaturze 500°C. Faza ta związana była z rozkładem organicznych składników biomasy okrzemek. Trzecia faza

wystąpiła w zakresie temperatur 602-764°C z efektem endotermicznym i ubytkiem masy około 29,95%. Faza ta charakteryzowała się asymetrycznym pikiem DTG i może być przypisana destrukcji węgla wapnia z emisją dwutlenku węgla [417]. Czwarta faza objawiająca się w temperaturze powyżej 900°C charakteryzowała się wyraźnym efektem egzotermicznym krzywej DTA przy braku widocznego ubytku masy na krzywej TG. Jej występowanie można przypisać tworzeniu się ortokrzemianu wapnia [418] w reakcji tlenku wapnia z tlenkiem krzemu, co potwierdziła analiza XRD (Rys. 33).

4.7.5. Właściwości fotoluminescencyjne

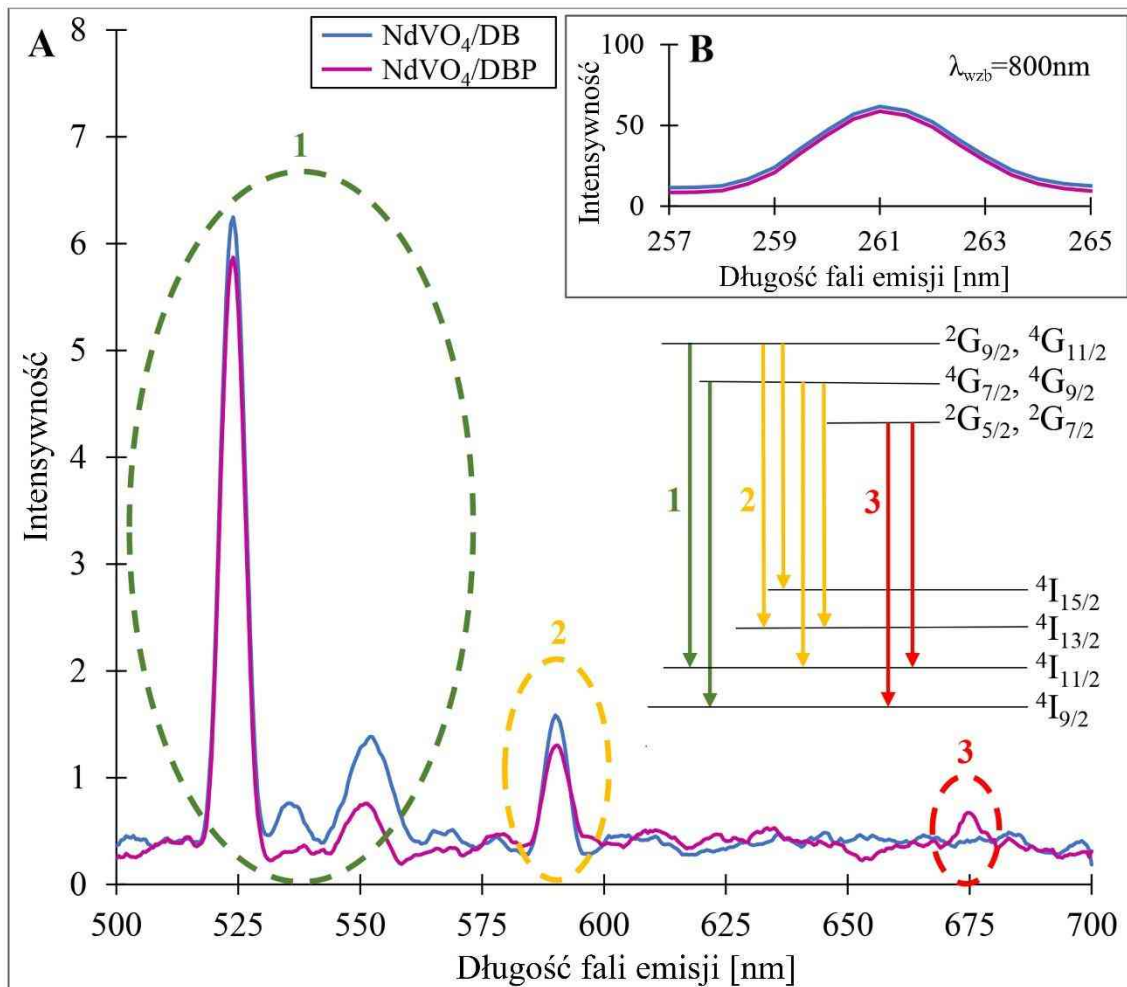
Badanie właściwości fotoluminescencyjnych otrzymanych kompozytów wykazało, że posiadają one wysokie intensywności emisji w świetle ultrafioletowym (376 nm), niebieskim (465 nm), zielonym (535 nm), pomarańczowym (635 nm) i czerwonym (677 nm), przy różnych długościach fal wzbudzenia (Rys. 35). Po wzbudzeniu w bliskiej podczerwieni ($\lambda_{wzb.} = 800$ nm) otrzymane kompozyty wykazują cztery anty-Stokesowskie pasma emisyjne w obszarze widzialnym, co pokazuje widmo emisyjne na Rys. 36.

Emisja w regionie ultrafioletowym (~261 nm) jest najprawdopodobniej wynikiem przejścia elektronowego w VO_4^{3-} , które odpowiada przejściu elektronów ze stanów wiążących 3d V i 2p O do stanów niewiązących [419,420]. Emisja światła zielonego, pomarańczowego i czerwonego wynika głównie z przejść elektronowych w Nd^{3+} [416]. Silne pasmo emisji zielonej (~523 nm) można przypisać przejściom (${}^2G_{9/2} - {}^4G_{11/2}$) \rightarrow ${}^4I_{11/2}$ oraz (${}^4G_{7/2} - {}^4G_{9/2}$) \rightarrow ${}^4I_{9/2}$, natomiast emisja pomarańczowa (~590 nm) może być przypisana przejściom (${}^2G_{9/2} - {}^4G_{11/2}$) \rightarrow ${}^4I_{13/2}$, ${}^4I_{15/2}$ oraz (${}^4G_{7/2} - {}^4G_{9/2}$) \rightarrow ${}^4I_{11/2}$, ${}^4I_{13/2}$. Emisja w zakresie światła czerwonego (~675 nm) może być spowodowana przejściami (${}^4G_{5/2} - {}^2G_{7/2}$) \rightarrow ${}^4I_{9/2}$, ${}^4I_{11/2}$.



Rys. 35. Widma emisyjne fotoluminescencji otrzymanych kompozytów: widmo w zakresie od 350 nm do 530 nm, przy długości fali wzbudzającej 270 nm (A), w zakresie od 350 nm do 600 nm, przy długości fali wzbudzającej 325 nm (B), w zakresie od 440 nm do 800 nm, przy długości fali wzbudzającej 420 nm (C), w zakresie od 550 nm do 800 nm, przy długości fali wzbudzającej 532 nm (D).

Można również zauważyć, że luminescencję up-konwersyjną uzyskano dla syntezowanego kompozytu tylko przy użyciu lampy ksenonowej, a nie laserów dających bardzo duże gęstości fotonów wzbudających.



Rys. 36. Widma up-konwersyjnej luminescencji otrzymanych kompozytów przy długości fali wzbudającej 800 nm dla: zakresu 500-700 nm (A) oraz zakresu 257-265 nm (B). Schemat poziomów energetycznych odpowiedzialnych za poszczególne piki (wstawka).

Wcześniej uzyskano kilka dobrze rozdzielonych wąskich pasm w zakresie widmowym 660-760 nm pod wzbudzeniem przy 785 nm dla nanoperowskitów ortoaluminianu itru domieszkowanego Nd³⁺ (Nd³⁺:YAlO₃) [421]. Blisko podczerwoną anti-Stokesowską luminescencję przy 740 nm i 800 nm wykazywaną pod wpływem

wzbudzenia przy 980 nm zaobserwowano dla perowskitowych cząsteczek tytanianu wapnia CaTiO_3 współdomieszkowanych jonami Yb^{3+} i Nd^{3+} [422]. Ostatnio Singh i wsp. [423] donieśli o luminescencji z emisją anty-Stokesa w obszarze widzialnym przy 489 nm, 540 nm, 605 nm i 671 nm pod wzbudzeniem 806 nm dla szkieł borofosforanowych domieszkowanych Nd_2O_3 .

Należy również zauważyć, że otrzymany kompozyt pirolizowanej biomasy krzemkowej domieszkowany nanocząstkami ortowanadanu neodymu, oprócz wykrytych właściwości luminescencyjnych (luminescencja up-konwersyjna, wąskie pasmo i duże przesunięcia emisji anty-Stokesa), charakteryzuje się jako materiał biokompatybilny, nietoksyczny, stabilny termicznie i chemicznie. Materiały o takich właściwościach są poszukiwane do zastosowań w fototerapii, bioobrazowaniu i biosensingu [406] czy w konwersji widma słonecznego [424].

5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W ramach przedłożonej rozprawy doktorskiej z powodzeniem zsyntetyzowano nowe materiały krzemionkowe o trójwymiarowej, ażurowej strukturze na bazie biokrzemionki okrzemkowej funkcjonalizowanej nanocząstkami wybranych metali (Ti, V, Nd, Ag) z wykorzystaniem oryginalnych metodyk metabolicznego domieszkowania komórek okrzemek hodowanych w warunkach laboratoryjnych (Ti, V, Nd) oraz impregnacji pirolizowanej biomasy okrzemek roztworem soli metali (Ag). Uzyskane 3D mikro-nanostrukturyzowane kompozyty krzemionkowe łączą w sobie hierarchiczną, uporządkowaną, trójwymiarową strukturę biokrzemionkowych frustul okrzemek z ich unikalnymi właściwościami optycznymi, periodycznym systemem porów, dobrymi właściwościami mechanicznymi i termicznymi, chemiczną obojętnością i kompatybilnością biologiczną oraz specyficzne funkcjonalne właściwości (katalityczne, optyczne, antybakteryjne) domieszkowanych metali.

W ramach pracy uzyskano trzy rodzaje nowych kompozytów krzemionkowych: mikro-nanokompozyty biomasy okrzemek i biokrzemionki domieszkowanych nanocząstkami tytanu (Ti/DB i Ti/DBioSiO₂); kompozyty pirolizowanej biomasy okrzemek domieszkowanej nanocząstkami dwutlenku tytanu i nanocząstkami metalicznego srebra (AgNPs/TiO₂/DBP); kompozyty pirolizowanej biomasy okrzemek domieszkowanej nanocząstkami wanadanu neodymu (NdVO₄/DBP). Właściwości fizykochemiczne zsyntezowanych kompozytów (cechy morfologiczne i strukturalne, skład pierwiastkowy, skład mineralny i strukturę krystaliczną, potencjał zeta, właściwości fotoluminescencyjne, charakter i stabilność termiczną wiązań strukturalnych otrzymanych materiałów oraz specyfikę immobilizacji i dystrybucji pierwiastków domieszkowanych) scharakteryzowano na podstawie przeprowadzonych badań z wykorzystaniem szeregu metod instrumentalnych (LM, SEM, SEM-EDS, TEM, TEM-

EDS, XRD, FTIR, TGA, ELS, ICP/MS, spektrofluorometria). Ponadto, w pracy uzyskano wyniki badań aktywności przeciwbakteryjnej kompozytu AgNPs/TiO₂/DBP wobec szczepów Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* oraz Gram-ujemnych *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* namnażanych laboratoryjnie jak również z izolatów klinicznych.

Na podstawie wyników badań uzyskanych w ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej sformułowane zostały wnioski w odniesieniu do syntezy poszczególnych kompozytów.

1. Metaboliczne domieszkowanie 3D biokrzemionki okrzemkowej tytanem

- I. synteza nowych mikro-nanokompozytów 3D ustrukturyzowanej biokrzemionki okrzemkowej oraz biomasy okrzemek domieszkowanych nanocząstkami tytanu (Ti/DBioSiO₂ i Ti/DB) z wykorzystaniem oryginalnej metody metabolicznej insercji tytanem podczas kontrolowanej hodowli okrzemek w warunkach laboratoryjnych. W syntezie po raz pierwszy wykorzystano organiczny prekursor jonów tytanu - tertbutanolan tytanu.
- II. początkowe stężenie tytanu 15 mg/L, wartość pH 8,9 oraz początkowe stężenie krzemu 1,2 mg/L (Ti:Si = 1:17,5) w medium hodowlanym zostały określone jako optymalne warunki metabolicznego wprowadzania tytanu do komórek okrzemek.
- III. zsyntezowane kompozyty Ti/DBioSiO₂ i Ti/DB zawierają tytan w ilościach 8,6% i 6,6% odpowiednio, w postaci jednowarstwowych klastrów nanokrystalitów (10-20 nm) dwutlenku tytanu w formie ooidów. Badania TEM wykazały także możliwość częściowego wbudowania tytanu w strukturę pancerzyka okrzemki poprzez izomorficzne podstawienie atomów krzemu. Morfologia i struktura frustul okrzemek domieszkowanych tytanem pozostaje niezmienna w odniesieniu do frustul okrzemek niedomieszkowanych.

- IV. badania kinetyki absorpcji azotanów, fosforanów, krzemu i tytanu przez komórki okrzemek z medium hodowlanego wykazały, że absorpcja tytanu przebiega podobnie do absorpcji krzemu (podobne kształty krzywych kinetycznych), co może sugerować podobny mechanizm ich pobierania.
- V. analiza XRD biokrzemionki okrzemkowej domieszkowanej tytanem i poddanej pirolizie w temperaturze 1000°C wykazała przejście fazowe tlenków krzemu i tytanu z fazy amorficznej do ich form krystalicznych (kwarcu i trydymitu oraz anatazu i rutyłu).
- VI. otrzymana biokrzemionka domieszkowana tytanem charakteryzuje się czterema rodzajami aktywności fotoluminescencyjnej w obszarze ultrafioletowym, niebieskim, zielonym i czerwonym widma widzialnego

2. Kompozyty pirolizowanej biomasy okrzemek domieszkowanej heteroepitaksjalnie rosnącymi nanocząstkami Ag/TiO₂: synteza, charakterystyka i zastosowanie antybakteryjne

- I. synteza nowych hybrydowych kompozytów AgNPs/TiO₂/pirolizowana biomasa okrzemkowa (AgNPs/TiO₂/DBP) zawierających nanocząstki ditlenku tytanu (Ti = 4,2 - 4,7%) pokrytych epitaksjalną warstwą nanocząstek metalicznego srebra (1,1 - 2,4%) z wykorzystaniem konsekwentnie połączonych metod metabolicznego domieszkowania komórek okrzemek tytanem w trakcie hodowli okrzemek oraz impregnacji domieszkowanej tytanem i pirolizowanej biomasy okrzemek roztworem azotanu srebra.
- II. kompozyty AgNPs/TiO₂/DBP wykazują intensywną fotoluminescencję w regionie światła niebieskiego.

- III. wykrycie wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej (minimalne stężenie hamujące MIC w zakresie 0,01 – 0,06 mg/l) uzyskanych kompozytów AgNPs/TiO₂/DBP wobec szczepów Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* oraz Gram-ujemnych *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* namnażanych laboratoryjnie jak również z izolatów klinicznych. Hipotetyczna przyczyna wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej kompozytów - synergistyczny efekt fotokatalityczny zawartych w nich nanocząstek dwutlenku tytanu i metalicznego srebra.
- IV. zastosowanie w syntezie kompozytów AgNPs/TiO₂/DBP metody metabolicznej insercji tytanem komórek hodowanych okrzemek oraz chemiczną redukcję srebra przy użyciu nadtlenu wodoru jako ekologicznego środka redukującego jest odpowiednie do zasad „zielonej chemii”.

3. Biosynteza nowych materiałów kompozytowych (NdVO₄NPs/pirolizowana biomasa okrzemkowa) o luminescencji up-konwersyjnej

- I. opracowana oryginalna metoda syntezy nowych 3D mikro-nanoustrukturyzowanych kompozytów krzemionkowych o właściwościach anty-Stokesowskiej luminescencji na bazie pirolizowanej biomasy okrzemek domieszkowanej metabolicznie nanocząstkami wanadanu neodymu (NdVO₄/DBP) o zawartości neodymu 4,9 – 10,5% i wanadu 1,1 – 2,5%.
- II. biosynteza krystalicznych nanocząstek NdVO₄ w postaci jednowarstwowych nieregularnych klastrów nanokrystalitów (30-40 nm) na powierzchni komórek okrzemek odbywa się przy bezpośrednim udziale jednokomórkowych mikroalg w medium hodowlanym, w warunkach przyjaznych dla środowiska, w temperaturze pokojowej i w atmosferze otoczenia.

- III. zsyntetyzowane kompozyty NdVO₄NPs/DB i NdVO₄NPs/DBP wykazują intensywną emisję fluorescencyjną anti-Stokesowską w obszarach ultrafioletowym (261 nm), zielonym (523 nm), pomarańczowym (590 nm) i czerwonym (675 nm) oraz zwykłą, intensywną emisję fluorescencyjną w świetle ultrafioletowym (376 nm), niebieskim (465 nm), zielonym (535 nm), pomarańczowym (635 nm) i czerwonym (677 nm).

Uzyskane w ramach pracy doktorskiej nowe mikro-nanostrukturyzowane kompozyty krzemionkowe funkcjonalizowane nanocząstkami wybranych metali (Ti, V, Nd, Ag) odpowiednio do swoich charakterystycznych właściwości (strukturalnych, porowatych, optycznych, fotokatalitycznych, termicznych, mechanicznych) mogą znaleźć zastosowanie w nowoczesnych technologiach do produkcji biosensorów, urządzeń optycznych, fotokatalizatorów, półprzewodników, ogniw fotowoltaicznych, wydajnych adsorbentów, materiałów bakteriobójczych, nośników leków czy matryc do nanolitografii.

Zaprezentowane i omówione w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wyniki pozwalają stwierdzić, iż założone cele pracy zostały w pełni osiągnięte.

6. STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

6.1. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim

Uniwersytet Szczeciński
Instytut Nauk o Morzu i Środowisku

mgr Weronika Brzozowska

Tytuł rozprawy doktorskiej:

„Outsourcing” okrzemek w syntezie 3D ustrukturyzowanej biokrzemionki funkcjonalizowanej nanocząstkami metali (Ti, V, Nd, Ag)

promotor: dr hab. inż. **Myroslav Sprynskyy**, prof. UMK

promotor pomocniczy: dr **Przemysław Dąbek**

Streszczenie rozprawy doktorskiej

W poszukiwaniu innowacyjnych rozwiązań dla nowoczesnych technologii, a zwłaszcza w projektowaniu i wytwarzaniu nowych nanokompozytowych materiałów nieorganicznych, mikroorganizmy funkcjonujące jako "naturalni mikrotechnologowie" mogą stanowić znaczącą inspirację. Okrzemki stanowią, pod względem liczby gatunków, jedną z największych grup mikroalg posiadających zdolność syntezy kompozytów mineralnych charakteryzujących się złożonymi strukturami hierarchicznymi. Ich pancerzyki, zwane frustulami, tworzą misternie zdobione struktury, przypominające najbardziej wyrafinowane, naturalne mozaiki. Uporządkowane systemy porów perforują krzemionkowe ściany frustul o średnicach od nano- do mikrometrów, tworząc ażurowe, trójwymiarowe struktury krzemionkowe. Wykorzystanie tych cech jest jednym z głównych wyzwań w opracowywaniu nowych rozwiązań technologicznych.

W ramach przedłożonej rozprawy doktorskiej z powodzeniem zsyntetyzowano nowe materiały krzemionkowe o trójwymiarowej, ażurowej strukturze na bazie biokrzemionki okrzemkowej funkcjonalizowanej nanocząstkami wybranych metali (Ti, V, Nd, Ag) z wykorzystaniem oryginalnych metodyk metabolicznego domieszkowania komórek okrzemek hodowanych w warunkach laboratoryjnych (Ti, V, Nd) oraz impregnacji pirolizowanej biomasy okrzemek roztworem soli metali (Ag). Podczas prowadzonych badań określono zdolność wybranego gatunku okrzemki (*Pseudostaurosira trainorii*) do metabolicznego wprowadzania rozpuszczalnego tytanu z medium hodowlanego w strukturę ścian komórkowych poprzez jej hodowlę w warunkach laboratoryjnych. Ponadto zsyntezowano kompozyty AgNPs/TiO₂/pirolizowana biomasa okrzemkowa (DBP) metodą bezpośredniej impregnacji wodnymi roztworami azotanu srebra. Analiza TEM wykazała epitaksję AgNPs na powierzchni nanocząstek TiO₂. Potencjał przeciwdrobnoustrojowy zsyntezowanych kompozytów badano metodą MIC wobec najczęściej występujących w medycynie mikroorganizmów lekoopornych: gram-dodatniego *Staphylococcus aureus* i gram-ujemnego *Klebsiella pneumoniae*. Wykazano, że otrzymane kompozyty hybrydowe AgNPs/TiO₂/DBP posiadają wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową. Dodatkowo, uzyskano nowe kompozyty NdVO₄NPs/DBP stosując metodę metabolicznego domieszkowania komórek okrzemkowych neodymem i wanadem oraz pirolizy domieszkowanej biomasy okrzemkowej w temperaturze 800°C. Badania wykazały, że powierzchnia pancerzyków okrzemek pokryta jest nanokrystalitami (nanocząstkami) NdVO₄ o wymiarach 30-40 nm tworzącymi skupiska krystalitów w postaci jednowarstwowych nieregularnych płatków. Zsyntetyzowane kompozyty wytwarzały intensywną anti-Stokesowską emisję fluorescencyjną w obszarach

zielonym, pomarańczowym i czerwonym pod wpływem wzbudzenia lampą ksenonową w bliskiej podczerwieni w temperaturze pokojowej i w atmosferze otoczenia.

Data, podpis

słowa kluczowe w języku polskim: okrzemki, biokrzemionka okrzemkowa, metaboliczne domieszkowanie, biokrzemionka domieszkowana tytanem, nanocząstki TiO_2 , nanocząstki srebra, wanadan neodymu, heteroepitaksjalny wzrost nanocząstek Ag/TiO_2 , aktywność antybakteryjna, właściwości fotoluminescencyjne, emisja anty-Stokes'a, luminescencja up-konwersyjna;

6.2. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim

University of Szczecin
Institute of Marine and Environmental Sciences

Weronika Brzozowska, MSc

Doctoral dissertation title:

"Outsourcing" of diatoms in the synthesis of 3D structured biosilica functionalized with metal nanoparticles (Ti, V, Nd, Ag)

Supervisor: **Myroslav Sprynskyy**, PhD, Associate Professor

Associate Supervisor: **Przemysław Dąbek**, PhD

Summary of the doctoral dissertation

In the search for innovative solutions for modern technologies, and especially in the design and manufacture of new nanocomposite inorganic materials, micro-organisms functioning as 'natural microtechnologists' can provide significant inspiration. Diatoms represent, in terms of number of species, one of the largest groups of microalgae with the ability to synthesise mineral composites characterised by complex hierarchical structures. Their shells, called frustules, form intricately decorated structures reminiscent of the most sophisticated natural mosaics. Structured pore systems perforate the silica walls of frustules with diameters ranging from nano- to micrometres, creating openworked, three-dimensional silica structures. Exploiting these features is one of the main challenges in developing new technological solutions.

Within the framework of the submitted dissertation, new silica materials with a three-dimensional openwork structure based on diatom biosilica functionalized with

nanoparticles of selected metals (Ti, V, Nd, Ag) were successfully synthesized using original methodologies of metabolic doping of diatom cells grown under laboratory conditions (Ti, V, Nd) and impregnation of pyrolysed diatom biomass with a solution of metal salts (Ag). During the present study, the ability of a selected diatom species (*Pseudostaurosira trainorii*) to metabolically incorporate soluble titanium from the culture medium into the cell wall structure by culturing it under laboratory conditions was determined. Furthermore, AgNPs/TiO₂/pyrolysed diatom biomass (DBP) composites were synthesised by direct impregnation with aqueous silver nitrate solutions. TEM analysis showed epitaxy of AgNPs on the surface of TiO₂ nanoparticles. The antimicrobial potential of the synthesised composites was tested by MIC against the most common drug-resistant microorganisms in medicine: gram-positive *Staphylococcus aureus* and gram-negative *Klebsiella pneumoniae*. The obtained AgNPs/TiO₂/DBP hybrid composites were shown to have high antimicrobial activity. In addition, new NdVO₄/DBP composites were obtained using the method of metabolic doping of diatom cells with neodymium and vanadium and pyrolysis of doped diatom biomass at 800°C. The study showed that the surface of the diatom frustule is covered with nanocrystallites (nanoparticles) of NdVO₄ with dimensions of 30-40 nm forming clusters of crystallites in the form of monolayer irregular flakes. The synthesised composites produced intense anti-Stokes fluorescence emission in the green, orange and red areas under near-infrared xenon lamp excitation at room temperature and ambient atmosphere.

Date, signature

Keywords in English: diatoms, diatomaceous biosilica, metabolic doping, titanium-doped biosilica, TiO₂ nanoparticles, silver nanoparticles, neodymium vanadate, heteroepitaxial growth of Ag/TiO₂ nanoparticles, antibacterial activity, photoluminescence properties, anti-Stokes emission, up-conversion luminescence;

7. DOROBEK NAUKOWY

7.1. Lista publikacji

Publikacje z listy A czasopism punktowanych przez MEiN

1. Bekissanova, Z.; Railean, V.; **Brzozowska, W.**; Wojtczak, I.; Ospanova, A.; Buszewski, B.; Sprynskyy, M. *Synthesis, characterization of silver/kaolinite nanocomposite and studying its antibacterial activity*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2022, 220, 112908; IF = 5.999; Punkty MEiN = 100;
2. **Brzozowska, W.**; Sprynskyy, M.; Wojtczak, I.; Dąbek, P.; Markuszewski, M.J.; Witkowski, A.; Buszewski, B. *Metabolically doping of 3D diatomaceous biosilica with titanium*. Materials 2022, 15, 5210; IF = 3.748; Punkty MEiN = 140;
3. **Brzozowska, W.**; Sprynskyy, M.; Wojtczak, I.; Dąbek, P.; Witkowski, A.; Buszewski, B. *“Outsourcing” diatoms in fabrication of metal-doped 3D biosilica*. Materials 2020, 13, 2576; IF = 3.748; Punkty MEiN = 140;
4. Olewnik-Kruszkowska, E.; **Brzozowska, W.**; Adamczyk, A.; Gierszewska, M.; Wojtczak, I.; Sprynskyy, M. *Effect of diatomaceous biosilica and talc on the properties of dielectric elastomer based composites*. Energies 2020, 13, 5828; IF = 3.252; Punkty MEiN = 140;
5. **Brzozowska, W.**; Wojtczak, I.; Sprynskyy, M.; Buszewski, B. *3D-Ornamented, defined silica structures obtained by unicellular diatoms*. Przemysł Chemiczny 2021, 100/3, 263-267; IF = 0.490; Punkty MEiN = 70;
6. Nowak, A.P.; Sprynskyy, M.; **Brzozowska W.**; Lisowska-Oleksiak, A. *Electrochemical behavior of a composite material containing 3D-structured diatom biosilica*, Algal Research 2019, 41, 101538; IF = 5.276; Punkty MEiN = 100;

7. Sprynskyy, M.; Sokol, H.; Rafińska, K.; **Brzozowska, W.**; Railean-Plugaru, V.; Pomastowski, P.; Buszewski, B. *Preparation of AgNPs/saponite nanocomposites without reduction agents and study of its antibacterial activity*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2019, 180, 457-465; IF = 5.999; Punkty MEiN = 100;

Materiały pokonferencyjne

1. Olewnik – Kruszkowska, E.; **Brzozowska, W.**, Wojtczak, I.; Sprynskyy, M.; Buszewski, B. *Influence of Diatomaceous Biosilica on the Properties of Composites Based On Dielectric Elastomers*, The 7th World Congress on Recent Advances in Nanotechnology (RAN'22);

Teksty popularno-naukowe

1. **Brzozowska, W.** „Piękno i użyteczność zamknięte w nanopancerzyku”, Przegląd Uniwersytecki 2020, #1-3, 37-38;

7.2. Konferencje naukowe

Konferencje międzynarodowe – komunikaty ustne

1. Goroneskul, M.M.; Borisenko, V.G.; Andryushchenko, L.A.; Kudin, A. M., Wojtczak, I.; **Brzozowska, W.**; Olewnik – Kruszkowska, E.; Sprynskyy, M. Ukrainian Conference with International Participation „Chemistry, Physics and Technology of Surface”, Tytuł: *Possible Mechanism for Increasing the Fire Resistance of a Polymer Coating Filled with Diatomaceous Biosilica*, Kijów, Ukraina, 19-20.10.2022; język wystąpienia: angielski;
2. Kudin, A. M., Andryushchenko, L.A.; Borisenko, V.G.; Goroneskul, M.M.; Wojtczak, I.; **Brzozowska, W.**; Olewnik – Kruszkowska, E.; Sprynskyy, M. Ukrainian Conference with International Participation „Chemistry, Physics and

- Technology of Surface”, Tytuł: *Thermal and Fire Resistance of Luminescent Coating on a Base of Silicon Elastomer with Diatomaceous Biosilica Filler*, Kijów, Ukraina, 19-20.10.2022; język wystąpienia: angielski;
3. Kudin, A. M., Borisenko, V.G.; Andryushchenko, L.A.; Goroneskul, M.M.; **Brzozowska, W.**; Wojtczak, I.; Olewnik – Kruszkowska, E.; Sprynskyy, M. International Conference "Fire Safety Issues.", Tytuł: *Mechanism of Diatomaceous Biosilica influence on the Fire Resistance of Silicon Protective Coating*, Charków, Ukraina, 12-13.10.2022; język wystąpienia: angielski;
 4. **Brzozowska, W.**; Sprynskyy, M.; Wojtczak, I.; Dąbek, P.; Witkowski, A.; Buszewski, B. 5th Edition of Nanotechnology, Nanomedicine & Material Science Hybrid Conference, Tytuł: *Metabolic Insertion of Titanium Into the 3D Structure of Diatomaceous Biosilica*, Paryż, Francja, 06-07.10.2022; język wystąpienia: angielski;
 5. **Brzozowska, W.**; Sprynskyy, M.; Wojtczak, I.; Dąbek, P.; Witkowski, A.; Buszewski, B. 2nd Global Conference on Advanced Nanotechnology and Nanomaterials (konferencja on-line), Tytuł: *„Obtaining 3D structured diatomaceous biosilica doped with transition metal ions (Ti, V) and semimetal ions (Ge, Te) by in vivo method”*, Vancouver BC, Kanada, 22-23.06.2022; język wystąpienia: angielski;
 6. **Brzozowska, W.**; Wojtczak, I.; Sprynskyy, M.; Olewnik - Kruszkowska, E.; Buszewski, B. 7th World Congress on Recent Advances in Nanotechnology (RAN'22) (konferencja on-line), Tytuł: *„Influence of Diatomaceous Biosilica on the Properties of Composites Based On Dielectric Elastomers”*, 04-06.04.2022; język wystąpienia: angielski;

7. **Brzozowska, W.**; Wojtczak, I.; Sprynskyy, M.; Olewnik – Kruszkowska, E.; Buszewski, B. MKDUS 2.0 - II Międzynarodowa Multidyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Szczecińskiego (konferencja on-line), Tytuł: „*Wpływ biokrzemionki okrzemkowej na właściwości kompozytów na bazie elastomerów dielektrycznych*”, Szczecin, Polska, 22-24.06.2022; język wystąpienia: polski;
8. **Wojtczak, I.**; **Brzozowska, W.**; Sprynskyy, M.; Buszewski, B. MKDUS 2.0 - II Międzynarodowa Multidyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Szczecińskiego (konferencja on-line), Tytuł: „*Synteza kompozytów na bazie biokrzemionki okrzemkowej z dodatkiem srebra i ceru*”, Szczecin, Polska, 22-24.06.2022; język wystąpienia: polski;
9. **Brzozowska, W.**; Sprynskyy, M.; Dąbek, P.; Witkowski, A.; Buszewski, B. QUO VADIS Life Sciences, Tytuł: *Doping of diatomaceous biosilica with titanium ions by in vivo method*, Opole, Polska, 23-27 czerwca 2021; język wystąpienia: angielski;
10. **Brzozowska, W.**; Sprynskyy, M.; Dąbek, P.; Witkowski, A.; Buszewski, B. MKDUS 2.0 – I Międzynarodowa Multidyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Szczecińskiego, Tytuł: *Biosynteza trójwymiarowej biokrzemionki domieszkowanej jonami tytanu*, Szczecin, Polska, 23-25 czerwca 2021; język wystąpienia: polski;
11. **Brzozowska, W.** TICASS Young Researchers International Online Conference Human & Technologies, PERSPECTIVES: „Educational Aspects of Technologies of Imaging in the Perspective of Visual Literacy”, Tytuł: *Technology as a way to satisfy human curiosity*, Czech Republic, Poland, United Kingdom, 07th June 2020; język wystąpienia: polski;

Konferencje międzynarodowe – prezentacje posterowe

1. **Brzozowska, W.**; Sprynskyy, M.; Wojtczak, I.; Dąbek, P.; Witkowski, A.; Buszewski, B. The 8th Conference of Polish Metabolomic Society, Metabolomics Circle 2021 (konferencja on-line), Tytuł: “ *Diatom biosilica structure with a metabolically inserted titanium*”, Katowice, Poland, 17-19.11.2021; język wystąpienia: angielski;
2. **Wojtczak, I.**; **Brzozowska, W.**; Sprynskyy, M.; Buszewski, B. The 8th Conference of Polish Metabolomic Society, Metabolomics Circle 2021 (konferencja on-line), Tytuł: “*Diatomaceous Biosilica Inserted Metabolically With A Selected Rare Earth Element*”, Katowice, Poland, 17-19.11.2021; język wystąpienia: angielski;
3. **Brzozowska, W.**; Sprynskyy, M.; Dąbek, P.; Witkowski, A.; Buszewski, B. VII Konferencja naukowa „Metabolomics Circle”, Tytuł: *Biosynthesis of three-dimensional diatomaceous biosilica doped with titanium ions*, Białystok, Polska, 04-06 listopada 2020 ; język wystąpienia: angielski;
4. **Adamczyk, A.**; **Olewnik – Kruszkowska, E.**; **Brzozowska, W.**; Gierszewska, M.; Wojtczak, I. IX Konferencja Naukowo-Techniczną „Diagnostyka Materiałów Polimerowych”, Tytuł: *Właściwości fizykochemiczne kompozytów na bazie elastomeru dielektrycznego z dodatkiem materiałów krzemianowych*, Temù, Włochy, 18-25.01.2020; język wystąpienia: polski;

Konferencje ogólnopolskie

1. **Brzozowska, W.**; Wojtczak, I.; Sprynskyy, M.; Olewnik – Kruszkowska, E.; Dąbek, P.; Witkowski, A.; Buszewski, B. IV Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Biopolimery – źródło nowych materiałów” (konferencja on-line),

Tytuł: „*Wpływ biokrzemionki okrzemkowej na właściwości kompozytów na bazie elastomerów dielektrycznych*”, Polska, 14.10.2021; język wystąpienia: polski;

2. **Brzozowska, W.**; Sprynskyy, M.; Dąbek, P.; Witkowski, A.; Buszewski, B. Kopernikańskie e-Seminarium Doktoranckie, Tytuł: *Biosynteza trójwymiarowej biokrzemionki okrzemkowej domieszkowanej jonami tytanu*, Toruń, Polska, 07 września 2020; język wystąpienia: polski;

Organizacja konferencji

1. współorganizacja I Międzynarodowej Multidyscyplinarnej Konferencji Doktorantów Uniwersytetu Szczecińskiego MKDUS 2.0; zakres obowiązków:
 - a. współtworzenie oraz praca nad szkieletem i planem konferencji;
 - b. praca nad strukturą i realizacją Panelu Zielonego:
 - i. zaproszenie gościa specjalnego;
 - ii. sprawdzanie i katalogowanie nadesłanych abstraktów;
 - iii. tworzenie programu wystąpień podczas Panelu Zielonego;
 - iv. moderacja sesji popołudniowej Panelu Zielonego;
2. współorganizacja II Międzynarodowej Multidyscyplinarnej Konferencji Doktorantów Uniwersytetu Szczecińskiego MKDUS 2.0; zakres obowiązków:
 - a. współtworzenie oraz praca nad szkieletem i planem konferencji;
 - b. praca nad strukturą i realizacją Panelu Zielonego:
 - i. sprawdzanie i katalogowanie nadesłanych abstraktów;
 - ii. tworzenie programu wystąpień podczas Panelu Zielonego;
 - iii. moderacja sesji popołudniowej Panelu Zielonego;
 - c. członkostwo w zespole ds. monografii;

7.3. Projekty badawcze

1. Udział w projekcie „*Zaawansowane biokompozyty dla Gospodarki jutra BIO-GNET*”, finansowanym przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 (PO IR), Oś IV: Zwiększenie potencjału naukowo-badawczego, Działanie 4.4: Zwiększenie potencjału kadrowego sektora B+R, konkurs TEAM – NET, na stanowisku Doktorant;

7.4. Granty badawcze

1. Otrzymanie grantu na finansowanie projektu naukowego w ramach dofinansowania rozwoju naukowego w roku 2021 – nr grantu: 38/GSDUS/1/2021
2. Otrzymanie grantu na finansowanie projektu naukowego w ramach dofinansowania rozwoju naukowego w roku 2021 – nr grantu: 4/GSDUS/2/2021
3. Otrzymanie grantu na finansowanie projektu naukowego w ramach dofinansowania rozwoju naukowego w roku 2022 – nr grantu: 53/GSDUS/2022

7.5. Nagrody

1. Nagroda Santander dla społeczności akademickiej Uniwersytetu Szczecińskiego 2022, Szczecin, Polska, 03.12.2022;
2. Nagroda za wyróżniające działania wśród doktorantów Uniwersytetu Szczecińskiego w dziedzinie „Naukowiec Roku”, przyznawana przez Dyрекcję Szkoły Doktorskiej Uniwersytetu Szczecińskiego oraz Uczelnianą Radę Samorządu Doktorantów Uniwersytetu Szczecińskiego; Szczecin, Polska, 28.05.2022 r;
3. Nagroda za 2 miejsce w konkursie na najlepszy poster na VII Konferencji naukowej „Metabolomics Circle”, Tytuł: *Biosynthesis of three-dimensional*

diatomaceous biosilica doped with titanium ions, Białystok, Polska, 04-06.11.2020;

7.6. Wyjazdy zagraniczne

1. International Summer School of Blue Biotechnology (ISSBB), 1^o Edition, Neapol 21-23.09.2022, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Neapol, Włochy;

7.7. Inne aktywności naukowe

1. Uczestnictwo w debatach naukowych z cyklu Colloquia Erasmiana;
2. Uczestnictwo w spotkaniach wykładowo-szkoleniowym „Spotkania z Praktykiem”;
3. Uczestnictwo w wykładach naukowych z cyklu Join Us-Stay with US;
4. Uczestnictwo w seminariach wydziałowych organizowanych przez Wydział Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu;
5. Uczestnictwo w cyklu spotkań pt. *Rzecznicy Nauki – szybkie randki z naukowcami*;

8. BIBLIOGRAFIA

- [1] V.J. Chapman, D.J. Chapman, *The Algae*, Macmillan Education UK, 1973. <https://doi.org/10.1007/978-1-349-27910-4>.
- [2] M. Mishra, A.P. Arukha, T. Bashir, D. Yadav, G.B.K.S. Prasad, All new faces of diatoms: Potential source of nanomaterials and beyond, *Front Microbiol.* 8 (2017) 1239. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01239>.
- [3] F. Noll, M. Sumper, N. Hampp, Nanostructure of Diatom Silica Surfaces and of Biomimetic Analogues, *Nano Lett.* 2 (2002) 91–95. <https://doi.org/10.1021/nl015581k>.
- [4] M. Sprynskyy, P. Pomastowski, M. Hornowska, A. Król, K. Rafińska, B. Buszewski, Naturally organic functionalized 3D biosilica from diatom microalgae, *Mater Des.* 132 (2017) 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.06.044>.
- [5] X.W. Sun, Y.X. Zhang, D. Losic, Diatom silica, an emerging biomaterial for energy conversion and storage, *J Mater Chem A Mater.* 5 (2017) 8847–8859. <https://doi.org/10.1039/c7ta02045g>.
- [6] J.E.N. Dolatabadi, M. de la Guardia, Applications of diatoms and silica nanotechnology in biosensing, drug and gene delivery, and formation of complex metal nanostructures, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry.* 30 (2011) 1538–1548. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.04.015>.
- [7] M. Hildebrand, M.J. Doktycz, D.P. Allison, Application of AFM in understanding biomineral formation in diatoms, *Pflugers Arch.* 456 (2008) 127–137. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0388-y>.
- [8] C.H. Gharekhan, V.N. Upasani, Diatoms from saline ecosystems and biotechnological applications: an overview., *Int J Pharm Biol Sci.* 9 (2019) 869–877. <https://doi.org/10.21276/ijpbs.2019.9.3.109>.
- [9] L.K. Medlin, Opinion: Can coalescent models explain deep divergences in the diatoms and argue for the acceptance of paraphyletic taxa at all taxonomic hierarchies?, *Nova Hedwigia.* 102 (2016) 107–128. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2015/0295.
- [10] L.K. Medlin, D.M. Williams, P.A. Sims, The evolution of the diatoms origin of the group and assessment of the monophyly of its major divisions, *Eur J Phycol.* 28 (1993) 261–275. <https://doi.org/10.1080/09670269300650381>.

- [11] L.K. Medlin, I. Kaczmarek, Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision, *Phycologia*. 43 (2004) 245–270. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-3-245.1>.
- [12] F.E. Round, R.M. Crawford, D.G. Mann, *Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*, 2007.
- [13] M. Lutyński, P. Sakiewicz, S. Lutyńska, Characterization of diatomaceous earth and halloysite resources of Poland, *Minerals*. 9 (2019) 670. <https://doi.org/10.3390/min9110670>.
- [14] M. Hildebrand, Diatoms, biomineralization processes, and genomics, *Chem Rev.* 108 (2008) 4855–4874. <https://doi.org/10.1021/cr078253z>.
- [15] J. Zhang, X. Deng, S. Yang, G. He, B. Zhu, Diatom ooze found in 7000m submarine area of Challenger Depth in Mariana Trench, *Geological Bulletin of China*. 34 (2015) 2352–2354.
- [16] W. Fu, Y. Shu, Z. Yi, Y. Su, Y. Pan, F. Zhang, S. Brynjolfsson, Diatom morphology and adaptation: Current progress and potentials for sustainable development, *Sustainable Horizons*. 2 (2022) 100015. <https://doi.org/10.1016/j.horiz.2022.100015>.
- [17] K. Algologii Mikologii, Okrzemki - organizmy, które odniosły sukces, *Kosmos*. 52 (2003) 307–314. <https://kosmos.ptpk.org/index.php/Kosmos/article/view/1398> (accessed March 6, 2023).
- [18] J. Taylor, W. Harding, C. Archibald, *A methods manual for the collection, preparation and analysis of diatom samples*. Version 1.0. Water Research Commission Report No TT281/07., 2007.
- [19] J.D. Pickett-Heaps, A.M.M. Schmid, D.H. Tippit, Cell division in diatoms - A translation of part of Robert Lauterborn's treatise of 1896 with some modern confirmatory observations, *Protoplasma*. 120 (1984) 132–154. <https://doi.org/10.1007/BF01287625>.
- [20] A. de Martino, A. Amato, C. Bowler, Mitosis in diatoms: rediscovering an old model for cell division, *BioEssays*. 31 (2009) 874–884. <https://doi.org/10.1002/BIES.200900007>.
- [21] V.A. Chepurnov, D.G. Mann, W. Vyverman, K. Sabbe, D.B. Danielidis, Sexual reproduction, mating system, and protoplast dynamics of *Seminavis (Bacillariophyceae)*, *J Phycol.* 38 (2002) 1004–1019. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.t01-1-01233.x>.

- [22] J. Gillard, V. Devos, M.J.J. Huysman, L. de Veylder, S. D'Hondt, C. Martens, P. Vanormelingen, K. Vannerum, K. Sabbe, V.A. Chepurinov, D. Inzé, M. Vuylsteke, W. Vyverman, Physiological and transcriptomic evidence for a close coupling between chloroplast ontogeny and cell cycle progression in the pennate diatom *Seminavis robusta*, *Plant Physiol.* 148 (2008) 1394–1411. <https://doi.org/10.1104/pp.108.122176>.
- [23] M.J. Huysman, C. Martens, K. Vandepoele, J. Gillard, E. Rayko, M. Heijde, C. Bowler, D. Inzé, Y. v.d. Peer, L. de Veylder, W. Vyverman, Genome-wide analysis of the diatom cell cycle unveils a novel type of cyclins involved in environmental signaling, *Genome Biol.* 11 (2010) 17. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-2-r17>.
- [24] A.D. de Francisco, L.E. Roth, Marine diatom, *Striatella unipunctata*. I. Cytoplasmic fine structure with emphasis on Golgi apparatus, *Cytobiologie.* 14 (1977) 191–206.
- [25] K. Nishida, F. Yagisawa, H. Kuroiwa, T. Nagata, T. Kuroiwa, Cell cycle-regulated, microtubule-independent organelle division in *Cyanidioschyzon merolae*, *Mol Biol Cell.* 16 (2005) 2493–2502. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-01-0068>.
- [26] W. Krzeszowiec, B. Rajwa, J. Dobrucki, H. Gabryś, Actin cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* under blue and red light, *Biol Cell.* 99 (2007) 251–260. <https://doi.org/10.1042/bc20060077>.
- [27] C. Lloyd, J. Chan, Not so divided: The common basis of plant and animal cell division, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7 (2006) 147–152. <https://doi.org/10.1038/nrm1831>.
- [28] J.D. Pickett-Heaps, D.H. Tippit, The diatom spindle in perspective, *Cell.* 14 (1978) 455–467. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90232-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90232-5).
- [29] J. Azimzadeh, M. Bornens, Structure and duplication of the centrosome, *J Cell Sci.* 120 (2007) 2139–2142. <https://doi.org/10.1242/jcs.005231>.
- [30] D.H. Tippit, J.D. Pickett-Heaps, R. Leslie, Cell division in two large pennate diatoms *Hantzschia* and *Nitzschia*: III. a new proposal for kinetochore function during prometaphase, *Journal of Cell Biology.* 86 (1980) 402–416. <https://doi.org/10.1083/jcb.86.2.402>.
- [31] L. Wordeman, K.L. McDonald, W.Z. Cande, The distribution of cytoplasmic microtubules throughout the cell cycle of the centric diatom *Stephanopyxis turris*: their role in nuclear migration and

- positioning the mitotic spindle during cytokinesis., *J Cell Biol.* 102 (1986) 1688–1698. <https://doi.org/10.1083/jcb.102.5.1688>.
- [32] J.A. Boyle, J.D. Pickett-Heaps, D.B. Czarnecki, Valve morphogenesis in the pennate diatom *Achnanthes coarctata*, *J Phycol.* 20 (1984) 563–573. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1984.00563.x>.
- [33] L.A. Edgar, J.D. Pickett-Heaps, Valve morphogenesis in the pennate diatom *Navicula cuspidata*, *J Phycol.* 20 (1984) 47–61. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1984.00047.x>.
- [34] W. Brzozowska, 3D Ornamentowane zdefiniowane struktury krzemionki otrzymane przez okrzemki, *Przemysł chemiczny.* 1 (2021) 77–81. <https://doi.org/10.15199/62.2021.3.8>.
- [35] J. Parkinson, R. Gordon, Beyond micromachining: The potential of diatoms, *Trends Biotechnol.* 17 (1999) 190–196. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01321-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01321-9).
- [36] R. Margalef, Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment ABSTRACT RÉSUMÉ, *Oceanologica Acta.* 1 (1978) 493–509.
- [37] A. Falciatore, M.R. D’Alcalà, P. Croot, C. Bowler, Perception of environmental signals by a marine diatom, *Science* (1979). 288 (2000) 2363–2366. <https://doi.org/10.1126/science.288.5475.2363>.
- [38] A.K. Noren, Characterization of Structure and Optical Properties of Diatoms for improved Solar Cell Efficiency, 2011. <https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/handle/11250/248947> (accessed March 6, 2023).
- [39] N.J. Taylor, Silica incorporation in the diatom *coscinodiscus granii* as affected by light intensity, *British Phycological Journal.* 20 (1985) 365–374. <https://doi.org/10.1080/00071618500650371>.
- [40] J. Pickett-Heaps, A. Schmid, L. Edgar, The cell biology of diatom valve formation, *Progress in Phycological Research.* 7 (1990) 1–168.
- [41] M. Hildebrand, L.G. Frigeri, A.K. Davis, Synchronized growth of *Thalassiosira pseudonana* (*Bacillariophyceae*) provides novel insights into cell-wall synthesis processes in relation to the cell cycle, *J Phycol.* 43 (2007) 730–740. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00361.x>.
- [42] C.W. Li, B.E. Volcani, Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms - IX. Sequential valve formation

- in a centric diatom, *Chaetoceros rostratum*, *Protoplasma*. 124 (1985) 30–41. <https://doi.org/10.1007/BF01279721>.
- [43] M. Hildebrand, E. York, J.I. Kelz, A.K. Davis, L.G. Frigeri, D.P. Allison, M.J. Doktycz, Nanoscale control of silica morphology and three-dimensional structure during diatom cell wall formation, *J Mater Res.* 21 (2006) 2689–2698. <https://doi.org/10.1557/jmr.2006.0333>.
- [44] B.E.F. Reimann, J.C. Leivin, B.E. Volcani, Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. Ii. The structure of the cell wall of *Navicula pelliculosa* (bréb.) Hilse, *J Phycol.* 2 (1966) 74–84. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1966.tb04597.x>.
- [45] E.F. Stoermer, H.S. Pankratz, C.C. Bowen, Fine Structure of the Diatom *Amphipleura pellucida*. Ii. Cytoplasmic Fine Structure and Frustule Formation, *Am J Bot.* 52 (1965) 1067–1078. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1965.tb07286.x>.
- [46] B. Tesson, M. Hildebrand, Dynamics of silica cell wall morphogenesis in the diatom *Cyclotella cryptica*: Substructure formation and the role of microfilaments, *J Struct Biol.* 169 (2010) 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.08.013>.
- [47] K. Kowalczyk, The isotopic composition of valves and organic tissue of diatoms grown in steady state cultures under varying conditions of temperature, light and nutrients - Implications for the interpretation of oxygen isotopes from sedimentary biogenic opal as proxies, 2006.
- [48] E.A. Morales, Morphological studies in selected fragilarioid diatoms (*Bacillariophyceae*) from Connecticut waters (U.S.A.), *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 151 (2001) 105–120. [https://doi.org/10.1635/0097-3157\(2001\)151\[0105:MSISFD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1635/0097-3157(2001)151[0105:MSISFD]2.0.CO;2).
- [49] E.A. Morales, M.B. Edlund, S.A. Spaulding, Description and ultrastructure of araphid diatom species (*Bacillariophyceae*) morphologically similar to *Pseudostaurosira elliptica* (Schumann) Edlund et al., *Phycological Res.* 58 (2010) 97–107. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2010.00567.x>.
- [50] S.A. Spaulding, M.G. Potapova, I.W. Bishop, S.S. Lee, T.S. Gasperak, E. Jovanoska, P.C. Furey, M.B. Edlund, Diatoms.org: supporting taxonomists, connecting communities, *Diatom Research*. 36 (2021) 291–304. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2021.2006790>.

- [51] T. Lebeau, J.M. Robert, Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products, *Appl Microbiol Biotechnol.* 60 (2003) 624–632. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1177-3>.
- [52] I. Laing, Cultivation of marine unicellular algae, MAFF Laboratory Leaflet. (1991) 32.
- [53] P. Chelf, Environmental control of lipid and biomass production in two diatom species, *J Appl Phycol.* 2 (1990) 121–129. <https://doi.org/10.1007/BF00023373>.
- [54] B.H. Ketchum, The Absorption of Phosphate and Nitrate by Illuminated Cultures of *Nitzschia closterium*, *Am J Bot.* 26 (1939) 399. <https://doi.org/10.2307/2436840>.
- [55] S.P. Chu, The Influence of the Mineral Composition of the Medium on the Growth of Planktonic Algae: Part I. Methods and Culture Media, *J Ecol.* 30 (1942) 284. <https://doi.org/10.2307/2256574>.
- [56] R.A. Vollenweider, Ökologische Untersuchungen von planktischen Algen auf experimenteller grundlage - Mitteilung aus dem Hydrobiologischen Laboratorium in Kastanienbaum (Luzern), *Schweizerische Zeitschrift Für Hydrologie.* 12 (1950) 193–262. <https://doi.org/10.1007/BF02489880>.
- [57] C.P. Spencer, On the Use of Antibiotics for Isolating Bacteria-Free Cultures of Marine Phytoplankton Organisms, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom.* 31 (1952) 97–106. <https://doi.org/10.1017/S0025315400003714>.
- [58] J.M. Kain, G.E. Fogg, Studies on the growth of marine phytoplankton: I. *Asterionella japonica* gran, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom.* 37 (1958) 397–413. <https://doi.org/10.1017/S0025315400023778>.
- [59] J. Huisman, J. Sharples, J.M. Stroom, P.M. Visser, W.E.A. Kardinaal, J.M.H. Verspagen, B. Sommeijer, Changes in turbulent mixing shift competition for light between phytoplankton species, *Ecology.* 85 (2004) 2960–2970. <https://doi.org/10.1890/03-0763>.
- [60] J. Lavaud, B. Rousseau, A.L. Etienne, General features of photoprotection by energy dissipation in planktonic diatoms (*Bacillariophyceae*), *J Phycol.* 40 (2004) 130–137. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2004.03026.x>.
- [61] B. Schellenberger Costa, A. Jungandreas, T. Jakob, W. Weisheit, M. Mittag, C. Wilhelm, Blue light is essential for high light acclimation

- and photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, J Exp Bot. 64 (2013) 483–493. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers340>.
- [62] D. Vaultot, R.J. Olson, S.W. Chisholm, Light and dark control of the cell cycle in two marine phytoplankton species, Exp Cell Res. 167 (1986) 38–52. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(86\)90202-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(86)90202-8).
- [63] J. Ashworth, S. Coesel, A. Lee, E.V. Armbrust, M. v. Orellana, N.S. Baliga, Genome-wide diel growth state transitions in the diatom *Thalassiosira pseudonana*, Proc Natl Acad Sci U S A. 110 (2013) 7518–7523. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300962110>.
- [64] R.J. Olson, D. Vaultot, S.W. Chisholm, Effects of Environmental Stresses on the Cell Cycle of Two Marine Phytoplankton Species, Plant Physiol. 80 (1986) 918–925. <https://doi.org/10.1104/pp.80.4.918>.
- [65] M. Brzezinski, R. Olson, S. Chisholm, Silicon availability and cell-cycle progression in marine diatoms, Mar Ecol Prog Ser. 67 (1990) 83–96. <https://doi.org/10.3354/meps067083>.
- [66] J. Gillard, V. Devos, M.J.J. Huysman, L. de Veylder, S. D’Hondt, C. Martens, P. Vanormelingen, K. Vannerum, K. Sabbe, V.A. Chepurnov, D. Inzé, M. Vuylsteke, W. Vyverman, Physiological and Transcriptomic Evidence for a Close Coupling between Chloroplast Ontogeny and Cell Cycle Progression in the Pennate Diatom *Seminavis robusta*, Plant Physiol. 148 (2008) 1394–1411. <https://doi.org/10.1104/PP.108.122176>.
- [67] M.J. Huysman, C. Martens, K. Vandepoele, J. Gillard, E. Rayko, M. Heijde, C. Bowler, D. Inzé, Y. van de Peer, L. de Veylder, W. Vyverman, Open Access RESEARCH Genome-wide analysis of the diatom cell cycle unveils a novel type of cyclins involved in environmental signaling, Genome Biol. 11 (2010) 17.
- [68] R.J. Olson, S.W. Chisholm, Effects of photocycles and periodic ammonium supply on three marine phytoplankton species. i. cell division patterns, J Phycol. 19 (1983) 522–528. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1983.00522.x>.
- [69] E. Rayko, F. Maumus, U. Maheswari, K. Jabbari, C. Bowler, Transcription factor families inferred from genome sequences of photosynthetic stramenopiles, New Phytologist. 188 (2010) 52–66. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03371.x>.
- [70] Z.Y. Wang, D. Kenigsbuch, L. Sun, E. Harel, M.S. Ong, E.M. Tobin, A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome

- regulation of an arabidopsis Lhcb gene, *Plant Cell*. 9 (1997) 491–507. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.4.491>.
- [71] F. Takahashi, D. Yamagata, M. Ishikawa, Y. Fukamatsu, Y. Ogura, M. Kasahara, T. Kiyosue, M. Kikuyama, M. Wada, H. Kataoka, AUREOCHROME, a photoreceptor required for photomorphogenesis in stramenopiles, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104 (2007) 19625–19630. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707692104>.
- [72] M. Ishikawa, F. Takahashi, H. Nozaki, C. Nagasato, T. Motomura, H. Kataoka, Distribution and phylogeny of the blue light receptors aureochromes in eukaryotes, *Planta*. 230 (2009) 543–552. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0967-6>.
- [73] E. Herman, M. Sachse, P.G. Kroth, T. Kottke, Blue-light-induced unfolding of the α helix allows for the dimerization of aureochrome-LOV from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Biochemistry*. 52 (2013) 3094–3101. <https://doi.org/10.1021/bi400197u>.
- [74] M.J.J. Huysman, A.E. Fortunato, M. Matthijs, B.S. Costa, R. Vanderhaeghen, H. van den Daele, M. Sachse, D. Inzé, C. Bowler, P.G. Kroth, C. Wilhelm, A. Falciatore, W. Vyverman, L. de Veylder, AUREOCHROME1a-mediated induction of the diatom-specific cyclin dsCYC2 controls the onset of cell division in diatoms (*Phaeodactylum tricornutum*), *Plant Cell*. 25 (2013) 215–228. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.106377>.
- [75] H.L. Macintyre, T.M. Kana, R.J. Geider, The effect of water motion on short-term rates of photosynthesis by marine phytoplankton, *Trends Plant Sci*. 5 (2000) 12–17. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01504-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01504-6).
- [76] S. Coesel, M. Mangogna, T. Ishikawa, M. Heijde, A. Rogato, G. Finazzi, T. Todo, C. Bowler, A. Falciatore, Diatom PtCPF1 is a new cryptochrome/photolyase family member with DNA repair and transcription regulation activity, *EMBO Rep*. 10 (2009) 655–661. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.59>.
- [77] T.W. Wojciech Kozieł, Algae – biomass production, *Acta Agrophysica*. 17 (2011) 105–116.
- [78] S. Aiba, Growth kinetics of photosynthetic microorganisms, in: Springer, Berlin, Heidelberg, 1982: pp. 85–156. https://doi.org/10.1007/3540116982_3.
- [79] F.G. Ación Fernández, J.M. Fernández Sevilla, J.A. Sánchez Pérez, E. Molina Grima, Y. Chisti, Airlift-driven external-loop tubular

- photobioreactors for outdoor production of microalgae: Assessment of design and performance, *Chem Eng Sci.* 56 (2001) 2721–2732. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(00\)00521-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(00)00521-2).
- [80] B. Albijanić, V. Havran, D.L. Petrović, M. Durić, M.N. Tekić, Hydrodynamics and mass transfer in a draft tube airlift reactor with dilute alcohol solutions, *AIChE Journal.* 53 (2007) 2897–2904. <https://doi.org/10.1002/aic.11306>.
- [81] F.G. Camacho, E.M. Grima, A.S. Mirón, V.G. Pascual, Y. Chisti, Carboxymethyl cellulose protects algal cells against hydrodynamic stress, *Enzyme Microb Technol.* 29 (2001) 602–610. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00442-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00442-2).
- [82] J.A. RAVEN, R.J. GEIDER, Temperature and algal growth, *New Phytologist.* 110 (1988) 441–461. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb00282.x>.
- [83] I.R. Davison, Environmental effects on algal photosynthesis: temperature, *J Phycol.* 27 (1991) 2–8. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00002.x>.
- [84] N.J. Antia, Effects of temperature on the darkness survival of marine microplanktonic algae, *Microb Ecol.* 3 (1976) 41–54. <https://doi.org/10.1007/BF02011452>.
- [85] P.G. Verity, Effects of temperature, irradiance, and daylength on the marine diatom *Leptocylindrus danicus* Cleve. III. Dark respiration, *J Exp Mar Biol Ecol.* 60 (1982) 197–207. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(82\)90159-9](https://doi.org/10.1016/0022-0981(82)90159-9).
- [86] F. Lombard, J. Erez, E. Michel, L. Labeyrie, Temperature effect on respiration and photosynthesis of the symbiont-bearing planktonic foraminifera *Globigerinoides ruber*, *Orbulina universa*, and *Globigerinella siphonifera*, *Limnol Oceanogr.* 54 (2009) 210–218. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.1.0210>.
- [87] A. Contreras Gomez, Caracterizacion de una columna de burbujeo con recirculacion interna. Aplicacion al cultivo de *Phaeodactylum tricornutum*, (1996).
- [88] N.S. Adenan, F.M. Yusoff, M. Shariff, Effect of salinity and temperature on the growth of diatoms and green algae, *J Fish Aquat Sci.* 8 (2013) 397–404. <https://doi.org/10.3923/jfas.2013.397.404>.
- [89] E.G. Vrieling, Q. Sun, M. Tian, P.J. Kooyman, W.W.C. Gieskes, R.A. van Santen, N.A.J.M. Sommerdijk, Salinity-dependent diatom biosilicification implies an important role of external ionic strength,

- Proc Natl Acad Sci U S A. 104 (2007) 10441–10446. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608980104>.
- [90] Margot. McKerrell, Learning and Teaching Scotland., Biotechnology. Unit 2, Microbiological techniques. Student materials. [Higher], (2004) 45.
- [91] R. Davis, J. Markham, C. Kinchin, N. Grundl, E. Tan, D. Humbird, Process design and economics for the production of algal biomass: algal biomass production in open pond systems and processing through dewatering for downstream conversion, National Renewable Energy Laboratory. (2016) 128. <https://doi.org/10.2172/1239893>.
- [92] A.S. Mirón, A.C. Gómez, F.G. Camacho, E.M. Grima, Y. Chisti, Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae, Prog Ind Microbiol. 35 (1999) 249–270. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80119-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80119-2).
- [93] E. Molina Grima, F.G.A. Fernández, F. García Camacho, Y. Chisti, Photobioreactors: Light regime, mass transfer, and scaleup, in: J Biotechnol, Elsevier, 1999: pp. 231–247. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00078-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00078-4).
- [94] P.M. Schenk, S.R. Thomas-Hall, E. Stephens, U.C. Marx, J.H. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse, B. Hankamer, Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production, Bioenergy Res. 1 (2008) 20–43. <https://doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8>.
- [95] O. Pulz, Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms, Appl Microbiol Biotechnol. 57 (2001) 287–293. <https://doi.org/10.1007/s002530100702>.
- [96] A.P. Carvalho, L.A. Meireles, F.X. Malcata, Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances, Biotechnol Prog. 22 (2006) 1490–1506. <https://doi.org/10.1021/bp060065r>.
- [97] E. Dumont, Y. Andrès, P. Le Cloirec, Effect of organic solvents on oxygen mass transfer in multiphase systems: Application to bioreactors in environmental protection, Biochem Eng J. 30 (2006) 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.05.003>.
- [98] A. Barofsky, P. Simonelli, C. Vidoudez, C. Troedsson, J.C. Nejstgaard, H.H. Jakobsen, G. Pohnert, Growth phase of the diatom *Skeletonema marinoi* influences the metabolic profile of the cells and the selective feeding of the copepod *Calanus* sp., J Plankton Res. 32 (2010) 263–272. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp121>.

- [99] A. Singh, P.S. Nigam, J.D. Murphy, Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels, *Bioresour Technol.* 102 (2011) 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.032>.
- [100] R. Harun, M.K. Danquah, G.M. Forde, Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 85 (2010) 199–203. <https://doi.org/10.1002/jctb.2287>.
- [101] G. Crini, Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review, *Bioresour Technol.* 97 (2006) 1061–1085. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.001>.
- [102] Y. Wang, D. Zhang, J. Cai, J. Pan, M. Chen, A. Li, Y. Jiang, Biosilica structures obtained from *Nitzschia*, *Ditylum*, *Skeletonema*, and *Coscinodiscus* diatom by a filtration-aided acid cleaning method, *Appl Microbiol Biotechnol.* 95 (2012) 1165–1178. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4080-6>.
- [103] M.A. Al-Ghouthi, M.A.M. Khraisheh, S.J. Allen, M.N. Ahmad, The removal of dyes from textile wastewater: A study of the physical characteristics and adsorption mechanisms of diatomaceous earth, *J Environ Manage.* 69 (2003) 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2003.09.005>.
- [104] Z. Korunic, P.G. Fields, M.I.P. Kovacs, J.S. Noll, O.M. Lukow, C.J. Demianyk, K.J. Shibley, The effect of diatomaceous earth on grain quality, *Postharvest Biol Technol.* 9 (1996) 373–387. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(96\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(96)00038-5).
- [105] D. Zhang, Y. Wang, W. Zhang, J. Pan, J. Cai, Enlargement of diatom frustules pores by hydrofluoric acid etching at room temperature, *J Mater Sci.* 46 (2011) 5665–5671. <https://doi.org/10.1007/s10853-011-5517-5>.
- [106] T. Qin, T. Gutu, J. Jiao, C.H. Chang, G.L. Rorrer, Photoluminescence of silica nanostructures from bioreactor culture of marine diatom *Nitzschia frustulum*, *J Nanosci Nanotechnol.* 8 (2008) 2392–2398. <https://doi.org/10.1166/jnn.2008.241>.
- [107] S. Lettieri, A. Setaro, L. De Stefano, M. De Stefano, P. Maddalena, The gas-detection properties of light-emitting diatoms, *Adv Funct Mater.* 18 (2008) 1257–1264. <https://doi.org/10.1002/adfm.200701124>.

- [108] L. De Stefano, I. Rendina, M. De Stefano, A. Bismuto, P. Maddalena, Marine diatoms as optical chemical sensors, *Appl Phys Lett.* 87 (2005) 1–3. <https://doi.org/10.1063/1.2140087>.
- [109] K.C. Lin, V. Kunduru, M. Bothara, K. Rege, S. Prasad, B.L. Ramakrishna, Biogenic nanoporous silica-based sensor for enhanced electrochemical detection of cardiovascular biomarkers proteins, *Biosens Bioelectron.* 25 (2010) 2336–2342. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.03.032>.
- [110] C. Jeffryes, R. Solanki, Y. Rangineni, W. Wang, C.H. Chang, G.L. Rorrer, Electroluminescence and photoluminescence from nanostructured diatom frustules containing metabolically inserted germanium, *Advanced Materials.* 20 (2008) 2633–2637. <https://doi.org/10.1002/adma.200800292>.
- [111] H.E. Townley, A.R. Parker, H. White-Cooper, Exploitation of diatom frustules for nanotechnology: Tethering active biomolecules, *Adv Funct Mater.* 18 (2008) 369–374. <https://doi.org/10.1002/adfm.200700609>.
- [112] W. Brzozowska, M. Sprzynskyy, I. Wojtczak, P. Dąbek, M.J. Markuszewski, A. Witkowski, B. Buszewski, Metabolically Doping of 3D Diatomaceous Biosilica with Titanium, *Materials.* 15 (2022) 5210. <https://doi.org/10.3390/ma15155210>.
- [113] D. Losic, K. Short, J.G. Mitchell, R. Lal, N.H. Voelcker, AFM nanoindentations of diatom biosilica surfaces, *Langmuir.* 23 (2007) 5014–5021. <https://doi.org/10.1021/la062666y>.
- [114] K. Umemura, Y. Noguchi, T. Ichinose, Y. Hirose, R. Kuroda, S. Mayama, Diatom cells grown and baked on a functionalized mica surface, *J Biol Phys.* 34 (2008) 189–196. <https://doi.org/10.1007/s10867-008-9086-z>.
- [115] C. Jeffryes, J. Campbell, H. Li, J. Jiao, G. Rorrer, The potential of diatom nanobiotechnology for applications in solar cells, batteries, and electroluminescent devices, *Energy Environ Sci.* 4 (2011) 3930–3941. <https://doi.org/10.1039/c0ee00306a>.
- [116] R. Gordon, R.W. Drum, The Chemical Basis of Diatom Morphogenesis, *Int Rev Cytol.* 150 (1994) 243–372. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61544-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61544-2).
- [117] A. Athanasakoglou, S.C. Kampranis, Diatom isoprenoids: Advances and biotechnological potential, *Biotechnol Adv.* 37 (2019) 107417. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107417>.

- [118] N. Nassif, J. Livage, From diatoms to silica-based biohybrids, *Chem Soc Rev.* 40 (2011) 849–859. <https://doi.org/10.1039/c0cs00122h>.
- [119] A. Bozarth, U.G. Maier, S. Zauner, Diatoms in biotechnology: Modern tools and applications, *Appl Microbiol Biotechnol.* 82 (2009) 195–201. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1804-8>.
- [120] *Diatoms: Fundamentals and Applications*, Wiley, 2019. <https://doi.org/10.1002/9781119370741>.
- [121] G.M. Evans, J.C. Furlong, *Environmental Biotechnology: Theory and Application*, Journal of the Air & Waste Management Association. 53 (2003) 1418–1419.
- [122] *Environmental microbiology*, *Experientia.* 39 (1983) 1418–1419. <https://doi.org/10.1007/BF01990136>.
- [123] T. Yamazaki, H. Sasanuma, S. Mayama, K. Umemura, Cultivation of *Melosira nummuloides* cells in the presence of platinum: Preparation of metal-containing frustules, *Physica Status Solidi (C) Current Topics in Solid State Physics.* 7 (2010) 2759–2762. <https://doi.org/10.1002/pssc.200983808>.
- [124] W.O. Wan Maznah, M. Mansor, Aquatic pollution assessment based on attached diatom communities in the Pinang River Basin, Malaysia, *Hydrobiologia.* 487 (2002) 229–241. <https://doi.org/10.1023/A:1022942200740>.
- [125] Y.S. Keum, J.S. Seo, Y. Hu, Q.X. Li, Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C4, *Appl Microbiol Biotechnol.* 71 (2006) 935–941. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0219-z>.
- [126] H. Li, Y.H. Liu, N. Luo, X.Y. Zhang, T.G. Luan, J.M. Hu, Z.Y. Wang, P.C. Wu, M.J. Chen, J.Q. Lu, Biodegradation of benzene and its derivatives by a psychrotolerant and moderately haloalkaliphilic *Planococcus* sp. strain ZD22, *Res Microbiol.* 157 (2006) 629–636. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.01.002>.
- [127] T.G. Luan, K.S.H. Yu, Y. Zhong, H.W. Zhou, C.Y. Lan, N.F.Y. Tam, Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments, *Chemosphere.* 65 (2006) 2289–2296. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.013>.
- [128] J.S. Seo, Y.S. Keum, Y. Hu, S.E. Lee, Q.X. Li, Phenanthrene degradation in *Arthrobacter* sp. P1-1: Initial 1,2-, 3,4- and 9,10-dioxygenation, and meta- and ortho-cleavages of naphthalene-1,2-diol after its formation from naphthalene-1,2-dicarboxylic acid and

- hydroxyl naphthoic acids, *Chemosphere*. 65 (2006) 2388–2394. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.04.067>.
- [129] J.S. Seo, Y.S. Keum, Y. Hu, S.E. Lee, Q.X. Li, Degradation of phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: Initial 1,2- and 3,4-dioxygenation and meta- and ortho-cleavage of naphthalene-1,2-diol, *Biodegradation*. 18 (2007) 123–131. <https://doi.org/10.1007/s10532-006-9048-8>.
- [130] X.C. Wang, H.M. Zhao, Uptake and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine seaweed, *J Coast Res.* (2007) 1056–1061.
- [131] M.R. Brown, S.I. Blackburn, Biofuels from microalgae, in: *Sustainable Energy Solutions in Agriculture*, IntechOpen, 2014: pp. 277–321. <https://doi.org/10.1201/b16643>.
- [132] S.F. Ali, F.M. Hassan, R.A. Abdul-Jabar, Evaluation of water quality by trophic diatom index (TDI) in tigris river within wasit province, *Indian Journal of Ecology*. 44 (2017) 711–716.
- [133] A. Tiwari, T. Kiran, A. Pandey, Algal photobiohydrogen production, in: *Bioenergy and Biofuels*, CRC Press, 2019: pp. 313–330. <https://doi.org/10.1201/9781351228138-11>.
- [134] T.K. Marella, N.R. Parine, A. Tiwari, Potential of diatom consortium developed by nutrient enrichment for biodiesel production and simultaneous nutrient removal from waste water, *Saudi J Biol Sci.* 25 (2018) 704–709. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.05.011>.
- [135] M. Dudek, M. Dębowski, M. Zieliński, A. Nowicka, The possibility of using wastewater for the production of *platymonas subcordiformis* algae biomass, *Inżynieria Ekologiczna*. 2016 (2016) 45–51. <https://doi.org/10.12912/23920629/63279>.
- [136] A.A. Jamali, F. Akbari, M.M. Ghorakhlu, M. de la Guardia, A.Y. Khosroushahi, Applications of diatoms as potential microalgae in nanobiotechnology, *BioImpacts*. 2 (2012) 83–89. <https://doi.org/10.5681/bi.2012.012>.
- [137] M. Diab, T. Mokari, Bioinspired Hierarchical Porous Structures for Engineering Advanced Functional Inorganic Materials, *Advanced Materials*. 30 (2018) 1706349. <https://doi.org/10.1002/adma.201706349>.
- [138] P. Vukusic, J.R. Sambles, Photonic structures in biology, *Nature*. 424 (2003) 852–855. <https://doi.org/10.1038/nature01941>.

- [139] Z. Dai, J. Tong, L. Ren, Researches and developments of biomimetics in tribology, *Chinese Science Bulletin*. 51 (2006) 2681–2689. <https://doi.org/10.1007/s11434-006-2184-z>.
- [140] D.Y. Zhang, Y. Wang, J. Cai, J.F. Pan, X.G. Jiang, Y.G. Jiang, Bio-manufacturing technology based on diatom micro- and nanostructure, *Chinese Science Bulletin*. 57 (2012) 3836–3849. <https://doi.org/10.1007/s11434-012-5410-x>.
- [141] R. Gordon, B.D. Aguda, Diatom morphogenesis: Natural fractal fabrication of a complex microstructure, in: *IEEE/Engineering in Medicine and Biology Society Annual Conference*, Publ by IEEE, 1988: pp. 273–274. <https://doi.org/10.1109/iembs.1988.94513>.
- [142] G. Di Caprio, G. Coppola, L. De Stefano, M. De Stefano, A. Antonucci, R. Congesti, E. De Tommasi, Shedding light on diatom photonics by means of digital holography, *J Biophotonics*. 7 (2014) 341–350. <https://doi.org/10.1002/jbio.201200198>.
- [143] M.A. Ferrara, P. Dardano, L. De Stefano, I. Rea, G. Coppola, I. Rendina, R. Congesti, A. Antonucci, M. De Stefano, E. De Tommasi, Optical properties of diatom nanostructured biosilica in *Arachnoidiscus* sp: Micro-optics from mother nature, *PLoS One*. 9 (2014) e103750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103750>.
- [144] L. De Stefano, A. Lamberti, L. Rotiroti, M. De Stefano, Interfacing the nanostructured biosilica microshells of the marine diatom *Coscinodiscus wailesii* with biological matter, *Acta Biomater*. 4 (2008) 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.09.003>.
- [145] P.F. Schuler, M.M. Ghosh, P. Gopalan, Slow sand and diatomaceous earth filtration of cysts and other particulates, *Water Res*. 25 (1991) 995–1005. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90149-K](https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90149-K).
- [146] J.E. Ongerth, P.E. Hutton, DE filtration to remove *Cryptosporidium*: DE filtration is far more effective than conventional or direct granular media filtration in reducing concentrations of *Cryptosporidium* oocysts, *J Am Water Works Assoc*. 89 (1997) 39–46. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1997.tb08338.x>.
- [147] P.A. Sims, D.G. Mann, L.K. Medlin, Evolution of the diatoms: Insights from fossil, biological and molecular data, *Phycologia*. 45 (2006) 361–402. <https://doi.org/10.2216/05-22.1>.
- [148] R. Gordon, G.W. Brodland, On square holes in pennate diatoms, *Diatom Research*. 5 (1990) 409–413. <https://doi.org/10.1080/0269249X.1990.9705131>.

- [149] N. Rabiee, M. Khatami, G. Jamalipour Soufi, Y. Fatahi, S. Irvani, R.S. Varma, Diatoms with invaluable applications in nanotechnology, biotechnology, and biomedicine: Recent advances, *ACS Biomater Sci Eng.* 7 (2021) 3053–3068. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00475>.
- [150] A. Kamińska, M. Sprynskyy, K. Winkler, T. Szymborski, Ultrasensitive SERS immunoassay based on diatom biosilica for detection of interleukins in blood plasma, *Anal Bioanal Chem.* 409 (2017) 6337–6347. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0566-5>.
- [151] K. Squire, X. Kong, P. LeDuff, G.L. Rorrer, A.X. Wang, Photonic crystal enhanced fluorescence immunoassay on diatom biosilica, *J Biophotonics.* 11 (2018) e201800009. <https://doi.org/10.1002/jbio.201800009>.
- [152] X. Kong, K. Squire, E. Li, P. Leduff, G.L. Rorrer, S. Tang, B. Chen, C.P. McKay, R. Navarro-Gonzalez, A.X. Wang, Chemical and biological sensing using diatom photonic crystal biosilica with in-situ growth plasmonic nanoparticles, *IEEE Trans Nanobioscience.* 15 (2016) 828–834. <https://doi.org/10.1109/TNB.2016.2636869>.
- [153] M.A. Calfon, A. Rosenthal, G. Mallas, A. Mauskapf, R.N. Nudelman, V. Ntziachristos, F.A. Jaffer, In vivo Near Infrared Fluorescence (NIRF) intravascular molecular imaging of inflammatory plaque, a multimodal approach to imaging of Atherosclerosis, *Journal of Visualized Experiments.* (2011) e2257. <https://doi.org/10.3791/2257>.
- [154] J.K. Herr, J.E. Smith, C.D. Medley, D. Shangguan, W. Tan, Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer cells, *Anal Chem.* 78 (2006) 2918–2924. <https://doi.org/10.1021/ac052015r>.
- [155] S. Santra, P. Zhang, K. Wang, R. Tapeç, W. Tan, Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers, *Anal Chem.* 73 (2001) 4988–4993. <https://doi.org/10.1021/ac010406+>.
- [156] S. Managò, N. Migliaccio, M. Terracciano, M. Napolitano, N.M. Martucci, L. De Stefano, I. Rendina, A.C. De Luca, A. Lamberti, I. Rea, Internalization kinetics and cytoplasmic localization of functionalized diatomite nanoparticles in cancer cells by Raman imaging, *J Biophotonics.* 11 (2018) e201700207. <https://doi.org/10.1002/jbio.201700207>.

- [157] C.D. Medley, S. Bamrungsap, W. Tan, J.E. Smith, Aptamer-conjugated nanoparticles for cancer cell detection, *Anal Chem.* 83 (2011) 727–734. <https://doi.org/10.1021/ac102263v>.
- [158] X. Wu, J. Chen, M. Wu, J.X. Zhao, Aptamers: Active targeting ligands for cancer diagnosis and therapy, *Theranostics.* 5 (2015) 322–344. <https://doi.org/10.7150/thno.10257>.
- [159] K.J. Squire, Y. Zhao, A. Tan, K. Sivashanmugan, J.A. Kraai, G.L. Rorrer, A.X. Wang, Photonic crystal-enhanced fluorescence imaging immunoassay for cardiovascular disease biomarker screening with machine learning analysis, *Sens Actuators B Chem.* 290 (2019) 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.03.102>.
- [160] G. Ozin, The photonic opal - The jewel in the crown of optical information processing, *Chemical Communications.* (2003) 2639–2643. <https://doi.org/10.1039/b306771h>.
- [161] H.E. Townley, K.L. Woon, F.P. Payne, H. White-Cooper, A.R. Parker, Modification of the physical and optical properties of the frustule of the diatom *Coscinodiscus walesii* by nickel sulfate, *Nanotechnology.* 18 (2007) 295101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/29/295101>.
- [162] A.R. Parker, H.E. Townley, Biomimetics of photonic nanostructures, *Nat Nanotechnol.* 2 (2007) 347–353. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.152>.
- [163] T. Fuhrmann, S. Landwehr, M. El Rharbl-Kucki, M. Sumper, Diatoms as living photonic crystals, *Appl Phys B.* 78 (2004) 257–260. <https://doi.org/10.1007/s00340-004-1419-4>.
- [164] Serge. Berthier, G. Kattawar, Iridescences: The physical colors of insects, *Optical Engineering.* 47 (2008) 64–65. <https://doi.org/10.1063/1.2883914>.
- [165] Iridescence, in: *Iridescences*, Springer, New York, NY, 2007: pp. 1–6. https://doi.org/10.1007/978-0-387-34120-0_1.
- [166] L. De Stefano, I. Rea, I. Rendina, M. De Stefano, L. Moretti, Lensless light focusing with the centric marine diatom *Coscinodiscus walesii*, *Opt Express.* 15 (2007) 18082. <https://doi.org/10.1364/oe.15.018082>.
- [167] K.S.A. Butcher, J.M. Ferris, M.R. Phillips, M. Wintrebert-Fouquet, J.W. Jong Wah, N. Jovanovic, W. Vyverman, V.A. Chepurinov, A luminescence study of porous diatoms, *Materials Science and Engineering C.* 25 (2005) 658–663. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.06.049>.

- [168] A. Setaro, S. Lettieri, P. Maddalena, L. De Stefano, Highly sensitive optochemical gas detection by luminescent marine diatoms, *Appl Phys Lett.* 91 (2007) 051921. <https://doi.org/10.1063/1.2768027>.
- [169] V. V. Kharton, Progress and challenges in solid-state electrochemical research: selected aspects, *Journal of Solid State Electrochemistry.* 24 (2020) 2097–2098. <https://doi.org/10.1007/s10008-020-04691-2>.
- [170] R.M. Stewart, Fields and Waves in Excitable Cellular Structures, *Prog Brain Res.* 17 (1965) 244–257. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)60165-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)60165-X).
- [171] S. Papageorgiou, The Hierarchical Genome and Differentiation Waves: Novel Unification of Development, Genetics and Evolution (Vol. I, II), *BioEssays.* 23 (2001) 559–559. <https://doi.org/10.1002/bies.1079>.
- [172] R.S. Lillie, Transmission of activation in passive metals as a model of the protoplasmic or nervous type of transmission, *Science* (1979). 48 (1918) 51–60. <https://doi.org/10.1126/science.48.1229.51>.
- [173] Z. Bao, M.R. Weatherspoon, S. Shian, Y. Cai, P.D. Graham, S.M. Allan, G. Ahmad, M.B. Dickerson, B.C. Church, Z. Kang, H.W. Abernathy, C.J. Summers, M. Liu, K.H. Sandhage, Chemical reduction of three-dimensional silica micro-assemblies into microporous silicon replicas, *Nature.* 446 (2007) 172–175. <https://doi.org/10.1038/nature05570>.
- [174] N.C. Seeman, DNA nanotechnology: Novel DNA constructions, *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 27 (1998) 225–248. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.27.1.225>.
- [175] T. Chakraborty, Charge Migration in DNA: Perspectives from Physics, Chemistry, and Biology, (2007).
- [176] N.L. Rosi, C.S. Thaxton, C.A. Mirkin, Control of Nanoparticle Assembly by Using DNA-Modified Diatom Templates, *Angewandte Chemie.* 116 (2004) 5616–5619. <https://doi.org/10.1002/ange.200460905>.
- [177] J. Fritz, M.K. Baller, H.P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H.J. Güntherodt, C. Gerber, J.K. Gimzewski, Translating biomolecular recognition into nanomechanics, *Science* (1979). 288 (2000) 316–318. <https://doi.org/10.1126/science.288.5464.316>.
- [178] K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, E. Braun, Sequence-specific molecular lithography on single DNA molecules,

Science (1979). 297 (2002) 72–75.
<https://doi.org/10.1126/science.1071247>.

- [179] T.W. Okita, B.E. Volcani, Role of silicon in diatom metabolism IX. Differential synthesis of DNA polymerases and DNA-binding proteins during silicate starvation and recovery in *Cylindrotheca fusiformis*, BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis. 519 (1978) 76–86. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(78\)90063-1](https://doi.org/10.1016/0005-2787(78)90063-1).
- [180] A. Calzada, B. Hodgson, M. Kanemaki, A. Bueno, K. Labib, Molecular anatomy and regulation of a stable replisome at a paused eukaryotic DNA replication fork, Genes Dev. 19 (2005) 1905–1919. <https://doi.org/10.1101/GAD.337205>.
- [181] J. Fournet, C. Roussakis, Silicon Coordinates DNA Replication with Transcription of the Replisome Factors in Diatom Algae, Plant Mol Biol Report. 36 (2018) 257–272. <https://doi.org/10.1007/S11105-018-1074-2/FIGURES/8>.
- [182] R.C. Johnson, Diatoms could triple solar cell efficiency, (2009) 2–3.
- [183] J. V. Rogers, C. V. Parkinson, Y.W. Choi, J.L. Speshock, S.M. Hussain, A preliminary assessment of silver nanoparticle inhibition of monkeypox virus plaque formation, Nanoscale Res Lett. 3 (2008) 129–133. <https://doi.org/10.1007/s11671-008-9128-2>.
- [184] D. Kisailus, J.H. Choi, J.C. Weaver, W. Yang, D.E. Morse, Enzymatic synthesis and nanostructural control of gallium oxide at low temperature, Advanced Materials. 17 (2005) 314–318. <https://doi.org/10.1002/adma.200400815>.
- [185] W. Brzozowska, M. Sprynskyy, I. Wojtczak, P. Dabek, A. Witkowski, B. Buszewski, “Outsourcing” diatoms in fabrication of metal-doped 3D biosilica, Materials. 13 (2020) 2576. <https://doi.org/10.3390/ma13112576>.
- [186] J. Jiao, T. Gutu, D.K. Gale, C. Jeffryes, W. Wang, C.H. Chang, G.L. Rorrer, Electron microscopy and optical characterization of cadmium sulphide nanocrystals deposited on the patterned surface of diatom biosilica, J Nanomater. 2009 (2009). <https://doi.org/10.1155/2009/860536>.
- [187] E.A. Lewis, D.J. Lewis, A.A. Tedstone, G. Kime, S. Hammersley, P. Dawson, D.J. Binks, P. O’Brien, S.J. Haigh, Diatom Frustules as a Biomineralized Scaffold for the Growth of Molybdenum Disulfide Nanosheets, Chemistry of Materials. 28 (2016) 5582–5586. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b01738>.

- [188] A. Jantschke, A.K. Herrmann, V. Lesnyak, A. Eychmüller, E. Brunner, Decoration of diatom biosilica with noble metal and semiconductor nanoparticles (<10 nm): Assembly, characterization, and applications, *Chem Asian J.* 7 (2012) 85–90. <https://doi.org/10.1002/asia.201100563>.
- [189] W. Yang, P.J. Lopez, G. Rosengarten, Diatoms: Self assembled silica nanostructures, and templates for bio/chemical sensors and biomimetic membranes, *Analyst.* 136 (2011) 42–53. <https://doi.org/10.1039/c0an00602e>.
- [190] M. Irimia-Vladu, E. D. Glowacki, N. S. Sariciftci, S. Bauer, R. Ragni, S.R. Cicco, D. Vona, G.M. Farinola, Nanostructured Silica from Diatoms Microalgae: Smart Materials for Photonics and Electronics, *Green Materials for Electronics.* (2017) 287–313. <https://doi.org/10.1002/9783527692958.ch11>.
- [191] K. Umemura, Y. Gao, T. Nishikawa, Preparation of photocatalyst using diatom frustules by liquid phase deposition method, *J Nanosci Nanotechnol.* 10 (2010) 4883–4888. <https://doi.org/10.1166/jnn.2010.2416>.
- [192] R. Gordon, D. Losic, M.A. Tiffany, S.S. Nagy, F.A.S. Sterrenburg, The Glass Menagerie: diatoms for novel applications in nanotechnology, *Trends Biotechnol.* 27 (2009) 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.003>.
- [193] M. Terracciano, L. De Stefano, I. Rea, Diatoms green nanotechnology for biosilica-based drug delivery systems, *Pharmaceutics.* 10 (2018) 1–15. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040242>.
- [194] T. V. Ramachandra, D.M. Mahapatra, B. Karthick, R. Gordon, Milking diatoms for sustainable energy: Biochemical engineering versus gasoline-secreting diatom solar panels, *Ind Eng Chem Res.* 48 (2009) 8769–8788. <https://doi.org/10.1021/ie900044j>.
- [195] I. Zglobicka, A. Chmielewska, E. Topal, K. Kutukova, J. Gluch, P. Krüger, C. Kilroy, W. Swieszkowski, K.J. Kurzydowski, E. Zschech, 3D Diatom–Designed and Selective Laser Melting (SLM) Manufactured Metallic Structures, *Sci Rep.* 9 (2019) 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56434-7>.
- [196] T.M.W.J. Bandara, M. Furlani, I. Albinsson, A. Wulff, B.E. Mellander, Diatom frustules enhancing the efficiency of gel polymer electrolyte based dye-sensitized solar cells with multilayer

- photoelectrodes, *Nanoscale Adv.* 2 (2020) 199–209. <https://doi.org/10.1039/c9na00679f>.
- [197] N. Kröger, N.C. Dubey, E. Kumari, CHAPTER 6: Immobilization of Proteins on Diatom Biosilica, in: *RSC Nanoscience and Nanotechnology*, Royal Society of Chemistry, 2018: pp. 126–149. <https://doi.org/10.1039/9781788010160-00126>.
- [198] R. Ragni, S. Cicco, D. Vona, G. Leone, G.M. Farinola, Biosilica from diatoms microalgae: Smart materials from bio-medicine to photonics, *J Mater Res.* 32 (2017) 279–291. <https://doi.org/10.1557/jmr.2016.459>.
- [199] L. Köhler, S. Machill, A. Werner, C. Selzer, S. Kaskel, E. Brunner, Are diatoms "green" aluminosilicate synthesis microreactors for future catalyst production?, *Molecules.* 22 (2017) 2232. <https://doi.org/10.3390/molecules22122232>.
- [200] A.K. Davis, M. Hildebrand, A self-propagating system for Ge incorporation into nanostructured silica, *Chemical Communications.* (2008) 4495–4497. <https://doi.org/10.1039/b804955f>.
- [201] T.N. Basharina, E.N. Danilovtseva, S.N. Zelinskiy, I. V. Klimenkov, Y. V. Likhoshway, V. V. Annenkov, The Effect of Titanium, Zirconium and Tin on the Growth of Diatom *Synedra Acus* and Morphology of Its Silica Valves, *Silicon.* 4 (2012) 239–249. <https://doi.org/10.1007/s12633-012-9119-x>.
- [202] T. Qin, T. Gutu, C.H. Chang, J. Jiao, G.L. Rorrer, Biological fabrication of photoluminescent nanocomb structures by metabolic incorporation of germanium into the biosilica of the diatom *Nitzschia frustulum*, *ACS Nano.* 2 (2008) 1296–1304. <https://doi.org/10.1021/nm800114q>.
- [203] D.K. Gale, C. Jeffryes, T. Gutu, J. Jiao, C.H. Chang, G.L. Rorrer, Thermal annealing activates amplified photoluminescence of germanium metabolically doped in diatom biosilica, *J Mater Chem.* 21 (2011) 10658–10665. <https://doi.org/10.1039/c1jm10861a>.
- [204] D.M. Ali, C. Divya, M. Gunasekaran, N. Thajuddin, Biosynthesis and Characterization of Silicon-Germanium Oxide Nanocomposite By Diatom, *Dig J Nanomater Biostruct.* 6 (2011) 117–120.
- [205] C. Jeffryes, T. Gutu, J. Jiao, G.L. Rorrer, Metabolic Insertion of Nanostructured TiO₂ into the Patterned Biosilica of the Diatom, *ACS Nano.* 2 (2008) 2103–2112. <https://doi.org/10.1021/nm800470x> CCC:\$40.75.

- [206] E. Van Eynde, Z.Y. Hu, T. Tytgat, S.W. Verbruggen, J. Watté, G. Van Tendeloo, I. Van Driessche, R. Blust, S. Lenaerts, Diatom silica-titania photocatalysts for air purification by bio-accumulation of different titanium sources, *Environ Sci Nano*. 3 (2016) 1052–1061. <https://doi.org/10.1039/c6en00163g>.
- [207] M.S. Chauton, L.M.B. Skolem, L.M. Olsen, P.E. Vullum, J. Walmsley, O. Vadstein, Titanium uptake and incorporation into silica nanostructures by the diatom *Pinnularia* sp. (*Bacillariophyceae*), *J Appl Phycol*. 27 (2015) 777–786. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0373-8>.
- [208] L.M.B. Skolem, Biosynthesis and characterization of Ti-doped silica-based Nanostructures formed by the Diatoms *Pinnularia* sp. and *Coscinodiscus wailesii*, Norwegian University of Science and Technology, 2011. <http://hdl.handle.net/11250/245760>.
- [209] Y. Maeda, Y. Niwa, H. Tang, D. Kisailus, T. Yoshino, T. Tanaka, Development of Titania-Integrated Silica Cell Walls of the Titanium-Resistant Diatom, *Fistulifera solaris*, *ACS Appl Bio Mater*. 1 (2018) 2021–2029. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00520>.
- [210] Y. Lang, F. Del Monte, B.J. Rodriguez, P. Dockery, D.P. Finn, A. Pandit, Integration of TiO₂ into the diatom *Thalassiosira weissflogii* during frustule synthesis, *Sci Rep*. 3 (2013) 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep03205>.
- [211] G.L. Rorrer, C.H. Chang, S.H. Liu, C. Jeffryes, J. Jiao, J.A. Hedberg, Biosynthesis of silicon-germanium oxide nanocomposites by the marine diatom *Nitzschia frustulum*, *J Nanosci Nanotechnol*. 5 (2005) 41–49. <https://doi.org/10.1166/jnn.2005.005>.
- [212] C. Jeffryes, T. Gutu, J. Jiao, G.L. Rorrer, Two-stage photobioreactor process for the metabolic insertion of nanostructured germanium into the silica microstructure of the diatom *Pinnularia* sp., *Materials Science and Engineering C*. 28 (2008) 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.01.002>.
- [213] K.P. Gannavarapu, V. Ganesh, M. Thakkar, S. Mitra, R.B. Dandamudi, Nanostructured Diatom-ZrO₂ composite as a selective and highly sensitive enzyme free electrochemical sensor for detection of methyl parathion, *Sens Actuators B Chem*. 288 (2019) 611–617. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.03.036>.
- [214] G. Leone, D. Vona, M. Lo Presti, L. Urbano, S. Cicco, R. Gristina, F. Palumbo, R. Ragni, G.M. Farinola, Ca²⁺-in vivo doped biosilica from living *Thalassiosira weissflogii* diatoms: Investigation on Saos-

- 2 biocompatibility, in: MRS Adv, Materials Research Society, 2017: pp. 1047–1058. <https://doi.org/10.1557/adv.2017.49>.
- [215] J. Li, J. Han, Q. Sun, Y. Wang, Y. Mu, K. Zhang, X. Dou, M. Kong, X. Chen, C. Feng, Biosynthetic calcium-doped biosilica with multiple hemostatic properties for hemorrhage control, *J Mater Chem B*. 6 (2018) 7834–7841. <https://doi.org/10.1039/c8tb00667a>.
- [216] S. Machill, L. Kohler, S. Ueberlein, R. Hedrich, M. Kunaschk, S. Paasch, R. Schulze, E. Brunner, Analytical studies on the incorporation of aluminium in the cell walls of the marine diatom *Stephanopyxis turris*, *BioMetals*. 26 (2013) 141–150. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9601-3>.
- [217] M. Gehlen, L. Beck, G. Calas, A.M. Flank, A.J. Van Bennekom, J.E.E. Van Beusekom, Unraveling the atomic structure of biogenic silica: Evidence of the structural association of Al and Si in diatom frustules, *Geochim Cosmochim Acta*. 66 (2002) 1601–1609. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(01\)00877-8](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(01)00877-8).
- [218] T. Jaccard, D. Ariztegui, K.J. Wilkinson, Incorporation of zinc into the frustule of the freshwater diatom *Stephanodiscus hantzschii*, *Chem Geol*. 265 (2009) 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2009.04.016>.
- [219] M.J. Ellwood, K.A. Hunter, The incorporation of zinc and iron into the frustule of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*, *Limnol Oceanogr*. 45 (2000) 1517–1524. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.7.1517>.
- [220] G. Zhang, W. Jiang, L. Wang, X. Liao, P. Liu, X. Deng, J. Li, Preparation of silicate-based red phosphors with a patterned nanostructure via metabolic insertion of europium in marine diatoms, *Mater Lett*. 110 (2013) 253–255. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.08.045>.
- [221] G.L. Rorrer, CHAPTER 4: Functionalization of Frustules from Diatom Cell Culture for Optoelectronic Properties, in: RSC Nanoscience and Nanotechnology, Royal Society of Chemistry, 2018: pp. 79–110. <https://doi.org/10.1039/9781788010160-00079>.
- [222] J. Lewin, Silicon Metabolism in Diatoms. V. Germanium Dioxide, a Specific Inhibitor of Diatom Growth, *Phycologia*. 6 (1966) 1–12. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-6-1-1.1>.
- [223] D. Werner, Hemmung der Chlorophyllsynthese und der NADP⁺-abhängigen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase durch

- Germaniumsäure bei *Cyclotella cryptica*, Arch Mikrobiol. 57 (1967) 51–60. <https://doi.org/10.1007/BF00405767>.
- [224] F. Azam, B.B. Hemmingsen, B.E. Volcani, Germanium incorporation into the silica of diatom cell walls, Arch Mikrobiol. 92 (1973) 11–20. <https://doi.org/10.1007/BF00409507>.
- [225] O. Richter, Zur Physiologie der Diatomeen, I, III, Sitzungsberichte Der Kaiserlichen Akademie Der Wissenschaften, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse. 115 (1906) 27–119.
- [226] N.H. W., Growth media-freshwater, Culture Methods and Growth Measurements. (1973) 7–24.
- [227] S. Monkonsit, S. Powtongsook, P. Pavasant, Comparison between Airlift Photobioreactor and Bubble Column for *Skeletonema Costatum* Cultivation, Engineering Journal. 15 (2011) 53–64. <https://doi.org/10.4186/ej.2011.15.4.53>.
- [228] R. Ghosh, Chemistry of silver(III) and some of its compounds: A review, Journal of the Indian Chemical Society. 98 (2021) 100238. <https://doi.org/10.1016/J.JICS.2021.100238>.
- [229] S. Ebnesajjad, Surface and Material Characterization Techniques, in: Handbook of Adhesives and Surface Preparation: Technology, Applications and Manufacturing, William Andrew Publishing, 2010: pp. 31–48. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-4461-3.10004-5>.
- [230] R.W. Drum, R. Gordon, Star Trek replicators and diatom nanotechnology, Trends Biotechnol. 21 (2003) 325–328. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00169-0).
- [231] R.R. Naik, M.O. Stone, Integrating biomimetics, Materials Today. 8 (2005) 18–26. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(05\)71077-4](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(05)71077-4).
- [232] P.J. Lopez, J. Desclés, A.E. Allen, C. Bowler, Prospects in diatom research, Curr Opin Biotechnol. 16 (2005) 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.002>.
- [233] I.C. Gebeshuber, Biotribology inspires new technologies, Nano Today. 2 (2007) 30–37. [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(07\)70141-X](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(07)70141-X).
- [234] N.J. Halas, Nanoscience under glass: The versatile chemistry of silica nanostructures, ACS Nano. 2 (2008) 179–183. <https://doi.org/10.1021/nn800052e>.

- [235] D. Losic, J.G. Mitchell, N.H. Voelcker, Diatomaceous lessons in nanotechnology and advanced materials, *Advanced Materials*. 21 (2009) 2947–2958. <https://doi.org/10.1002/adma.200803778>.
- [236] M. Soleimani, L. Rutten, S.P. Maddala, H. Wu, E.D. Eren, B. Mezari, I. Schreur-Piet, H. Friedrich, R.A.T.M. van Benthem, Modifying the thickness, pore size, and composition of diatom frustule in *Pinnularia* sp. with Al^{3+} ions, *Sci Rep*. 10 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76318-5>.
- [237] K.J. Kulacki, B.J. Cardinale, Effects of Nano-Titanium Dioxide on Freshwater Algal Population Dynamics, *PLoS One*. 7 (2012) e47130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047130>.
- [238] X.L. Guo, M. Kuang, F. Li, X.Y. Liu, Y.X. Zhang, F. Dong, D. Losic, Engineering of three dimensional (3-D) diatom@TiO₂@MnO₂ composites with enhanced supercapacitor performance, *Electrochim Acta*. 190 (2016) 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.12.178>.
- [239] J. He, D. Chen, Y. Li, J. Shao, J. Xie, Y. Sun, Z. Yan, J. Wang, Diatom-templated TiO₂ with enhanced photocatalytic activity: Biomimetics of photonic crystals, *Appl Phys A Mater Sci Process*. 113 (2013) 327–332. <https://doi.org/10.1007/s00339-013-7970-2>.
- [240] A. Li, J. Wang, W. Zhang, R. McNaughton, S. Anderson, X. Zhang, Sol-gel based TiO₂ thin film deposition on frustules towards facile and scalable manufacturing, in: *J Phys Conf Ser*, IOP Publishing, 2016: p. 012112. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/773/1/012112>.
- [241] X. Liu, P.K. Chu, C. Ding, Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Materials Science and Engineering R: Reports*. 47 (2004) 49–121. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2004.11.001>.
- [242] *Titanium Alloys in Surgical Implants*, ASTM International, 1983. <https://doi.org/10.1520/stp796-eb>.
- [243] G. Charlton, P.B. Howes, C.L. Nicklin, P. Steadman, J.S.G. Taylor, C.A. Muryn, S.P. Harte, J. Mercer, R. McGrath, D. Norman, T.S. Turner, G. Thornton, Relaxation of TiO₂(110)-(1×1) using surface X-ray diffraction, *Phys Rev Lett*. 78 (1997) 495–498. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.78.495>.
- [244] U. Diebold, The surface science of titanium dioxide, *Surf Sci Rep*. 48 (2003) 53–229. [https://doi.org/10.1016/s0167-5729\(02\)00100-0](https://doi.org/10.1016/s0167-5729(02)00100-0).

- [245] T. Kijima, *Inorganic and Metallic Nanotubular Materials: Recent Technologies and Applications*, Topics in Applied Physics. 117 (2010). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-03622-4>.
- [246] X. Bai, D. Golberg, Y. Bando, C. Zhi, C. Tang, M. Mitome, K. Kurashima, Deformation-driven electrical transport of individual boron nitride nanotubes, *Nano Lett.* 7 (2007) 632–637. <https://doi.org/10.1021/nl062540l>.
- [247] D. Golberg, M. Mitome, K. Kurashima, C.Y. Zhi, C.C. Tang, Y. Bando, O. Lourie, In situ electrical probing and bias-mediated manipulation of dielectric nanotubes in a high-resolution transmission electron microscope, *Appl Phys Lett.* 88 (2006) 123101. <https://doi.org/10.1063/1.2186987>.
- [248] J.H. Kim, T.V. Pham, J.H. Hwang, C.S. Kim, M.J. Kim, Boron nitride nanotubes: synthesis and applications, *Nano Converg.* 5 (2018) 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40580-018-0149-y>.
- [249] Z.L. Wang, New developments in transmission electron microscopy for nanotechnology, *Advanced Materials.* 15 (2003) 1497–1514. <https://doi.org/10.1002/adma.200300384>.
- [250] M.M.J. Treacy, T.W. Ebbesen, J.M. Gibson, Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes, *Nature.* 381 (1996) 678–680. <https://doi.org/10.1038/381678a0>.
- [251] P. Saravanan, M. Ganapathy, A. Charles, S. Tamilselvan, R. Jeyasekaran, M. Vimalan, Electrical properties of green synthesized TiO₂ nanoparticles, *Pelagia Research Library Advances in Applied Science Research.* 7 (2016) 158–168.
- [252] M. Pelaez, N.T. Nolan, S.C. Pillai, M.K. Seery, P. Falaras, A.G. Kontos, P.S.M. Dunlop, J.W.J. Hamilton, J.A. Byrne, K. O'Shea, M.H. Entezari, D.D. Dionysiou, A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications, *Appl Catal B.* 125 (2012) 331–349. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2012.05.036>.
- [253] M. Nadeem, D. Tungmunnithum, C. Hano, B.H. Abbasi, S.S. Hashmi, W. Ahmad, A. Zahir, The current trends in the green syntheses of titanium oxide nanoparticles and their applications, *Green Chem Lett Rev.* 11 (2018) 492–502. <https://doi.org/10.1080/17518253.2018.1538430>.

- [254] J.K. Wang, M. Seibert, Prospects for commercial production of diatoms, *Biotechnol Biofuels*. 10 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0699-y>.
- [255] E. Van Eynde, T. Tytgat, M. Smits, S.W. Verbruggen, B. Hauchecorne, S. Lenaerts, Biotemplated diatom silica-titania materials for air purification, in: *Photochemical and Photobiological Sciences*, The Royal Society of Chemistry, 2013: pp. 690–695. <https://doi.org/10.1039/c2pp25229e>.
- [256] J. Ouwehand, E. Van Eynde, E. De Canck, S. Lenaerts, A. Verberckmoes, P. Van Der Voort, Titania-functionalized diatom frustules as photocatalyst for indoor air purification, *Appl Catal B*. 226 (2018) 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.12.063>.
- [257] S.K. Padmanabhan, S. Pal, E. Ul Haq, A. Licciulli, Nanocrystalline TiO₂-diatomite composite catalysts: Effect of crystallization on the photocatalytic degradation of rhodamine B, *Appl Catal A Gen*. 485 (2014) 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2014.08.002>.
- [258] L. Mao, J. Liu, S. Zhu, D. Zhang, Z. Chen, C. Chen, Sonochemical fabrication of mesoporous TiO₂ inside diatom frustules for photocatalyst, *Ultrason Sonochem*. 21 (2014) 527–534. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.09.001>.
- [259] D. Sen, A. Das, J. Bahadur, Dissolution of amorphous SiO₂ nanoparticles at high alkaline pH: Real time SAXS investigation, in: *AIP Conf Proc*, AIP Publishing LLC AIP Publishing, 2019: p. 030035. <https://doi.org/10.1063/1.5112874>.
- [260] F. Maumus, A.E. Allen, C. Mhiri, H. Hu, K. Jabbari, A. Vardi, M.A. Grandbastien, C. Bowler, Potential impact of stress activated retrotransposons on genome evolution in a marine diatom, *BMC Genomics*. 10 (2009) 1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-624>.
- [261] V. Martin-Jézéquel, M. Hildebrand, M.A. Brzezinski, Silicon metabolism in diatoms: Implications for growth, *J Phycol*. 36 (2000) 821–840. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.00019.x>.
- [262] K. Thamatrakoln, M. Hildebrand, Silicon uptake in diatoms revisited: A model for saturable and nonsaturable uptake kinetics and the role of silicon transporters, *Plant Physiol*. 146 (2008) 1397–1407. <https://doi.org/10.1104/pp.107.107094>.

- [263] B. Ketheesan, N. Nirmalakhandan, Modeling microalgal growth in an airlift-driven raceway reactor, *Bioresour Technol.* 136 (2013) 689–696. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.028>.
- [264] T.M. Mata, A.A. Martins, Nidia.S. Caetano, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 14 (2010) 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.
- [265] E.C. Henry, Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, *J Phycol.* 40 (2004) 1001–1002. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.40502.x>.
- [266] D.A. Vaccari, P.F. Strom, J.E. Alleman, *Environmental Biology for Engineers and Scientists*, Wiley-Interscience, 2005. <https://doi.org/10.1002/0471741795>.
- [267] E. Lee, M. Jalalizadeh, Q. Zhang, Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review, *Algal Res.* 12 (2015) 497–512. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.004>.
- [268] M. Pujo-Pay, P. Raimbault, P. Conan, Sous-estimation des teneurs en azote particulaire en milieu oceanique par l'utilisation des filtres GF/F, *Comptes Rendus - Academie Des Sciences, Serie II: Sciences de La Terre et Des Planetes.* 324 (1997) 401–407.
- [269] K. Flynn, I. Butler, Nitrogen sources for the growth of marine microalgae: role of dissolved free amino acids, *Mar Ecol Prog Ser.* 34 (1986) 281–304. <https://doi.org/10.3354/meps034281>.
- [270] J.A. Hellebust, I. Ahmad, Regulation of Nitrogen Assimilation in Green Microalgae, *Biol. Oce.* 6 (1989) 241–256. <https://doi.org/10.1080/01965581.1988.10749529>.
- [271] N. Poulsen, M. Sumper, N. Kröger, Biosilica formation in diatoms: Characterization of native silaffin-2 and its role in silica morphogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (2003) 12075–12080. <https://doi.org/10.1073/pnas.2035131100>.
- [272] U.T. Uthappa, M. Kigga, G. Sriram, K. V. Ajeya, H.Y. Jung, G.M. Neelgund, M.D. Kurkuri, Facile green synthetic approach of bio inspired polydopamine coated diatoms as a drug vehicle for controlled drug release and active catalyst for dye degradation, *Microporous and Mesoporous Materials.* 288 (2019) 109572. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2019.109572>.
- [273] M.S. Aw, M. Bariana, Y. Yu, J. Addai-Mensah, D. Losic, Surface-functionalized diatom microcapsules for drug delivery of water-

- insoluble drugs, *J Biomater Appl.* 28 (2013) 163–174. <https://doi.org/10.1177/0885328212441846>.
- [274] M.H. El-Naas, R.J. Munz, J. Rossi, A.Y. Zekri, Plasma heating of carbonate formations, *Pet Sci Technol.* 25 (2007) 1143–1161. <https://doi.org/10.1080/10916460500527021>.
- [275] A.P. Nowak, M. Sprynskyy, I. Wojtczak, K. Trzeciński, J. Wysocka, M. Szkoda, B. Buszewski, A. Lisowska-Oleksiak, Diatoms biomass as a joint source of biosilica and carbon for lithium-ion battery anodes, *Materials.* 13 (2020) 1673. <https://doi.org/10.3390/ma13071673>.
- [276] Y. Li, C. Zhang, Z. Hu, Selective removal of pharmaceuticals and personal care products from water by titanium incorporated hierarchical diatoms in the presence of natural organic matter, *Water Res.* 189 (2021) 116628. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116628>.
- [277] J.I. Goldstein, D.E. Newbury, J.R. Michael, N.W.M. Ritchie, J.H.J. Scott, D.C. Joy, Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis.* (2017) 1–550. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6676-9/COVER>.
- [278] D.E. Newbury, Quantitative electron probe microanalysis of rough targets: Testing the peak-to-local background method, *Scanning.* 26 (2004) 103–114. <https://doi.org/10.1002/sca.4950260302>.
- [279] M. Pannico, I. Rea, S. Chandrasekaran, P. Musto, N.H. Voelcker, L. De Stefano, Electroless Gold-Modified Diatoms as Surface-Enhanced Raman Scattering Supports, *Nanoscale Res Lett.* 11 (2016) 1–6. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1539-x>.
- [280] D.J. DeMaster, The Diagenesis of Biogenic Silica: Chemical Transformations Occurring in the Water Column, Seabed, and Crust, in: *Treatise on Geochemistry*, Pergamon, 2003: pp. 1–12. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043751-6/07095-X>.
- [281] Z. Wang, S.K. Saxena, V. Pischedda, H.P. Liermann, C.S. Zha, X-ray diffraction study on pressure-induced phase transformations in nanocrystalline anatase/rutile (TiO₂), *Journal of Physics Condensed Matter.* 13 (2001) 8317–8323. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/13/36/307>.
- [282] K.E. Cole, A.N. Ortiz, M.A. Schoonen, A.M. Valentine, Peptide- and long-chain polyamine-induced synthesis of micro- and

- nanostructured titanium phosphate and protein encapsulation (Chemistry of Materials (2006) 18 (4592-4599)), Chemistry of Materials. 21 (2009) 194. <https://doi.org/10.1021/cm8030076>.
- [283] R.R. Unocic, F.M. Zalar, P.M. Sarosi, Y. Cai, K.H. Sandhage, Anatase assemblies from algae: coupling biological self-assembly of 3-D nanoparticle structures with synthetic reaction chemistry, Chemical Communications. 4 (2004) 796–797. <https://doi.org/10.1039/b400599f>.
- [284] J.L. Sumerel, W. Yang, D. Kisailus, J.C. Weaver, J.H. Choi, D.E. Morse, Biocatalytically Templated Synthesis of Titanium Dioxide, Chemistry of Materials. 15 (2003) 4804–4809. <https://doi.org/10.1021/cm030254u>.
- [285] N. Kröger, M.B. Dickerson, G. Ahmad, Y. Cai, M.S. Haluska, K.H. Sandhage, N. Poulsen, V.C. Sheppard, Bioenabled synthesis of rutile (TiO₂) at ambient temperature and neutral pH, Angewandte Chemie - International Edition. 45 (2006) 7239–7243. <https://doi.org/10.1002/anie.200601871>.
- [286] M.B. Dickerson, S.E. Jones, Y. Cai, G. Ahmad, R.R. Naik, N. Kröger, K.H. Sandhage, Identification and design of peptides for the rapid, high-yield formation of nanoparticulate TiO₂ from aqueous solutions at room temperature, Chemistry of Materials. 20 (2008) 1578–1584. <https://doi.org/10.1021/cm071515t>.
- [287] V. Bansal, D. Rautaray, A. Bharde, K. Ahire, A. Sanyal, A. Ahmad, M. Sastry, Fungus-mediated biosynthesis of silica and titania particles, J Mater Chem. 15 (2005) 2583–2589. <https://doi.org/10.1039/b503008k>.
- [288] J.P. Bachheimer, Anomaly in the beta phase near the alpha - beta transition of quartz., Journal de Physique. Lettres. 41 (1980) 559–561. <https://doi.org/10.1051/jphyslet:019800041023055900>.
- [289] M. Kosmulski, E. Matijević, Zeta potential of anatase (TiO₂) in mixed solvents, Colloids and Surfaces. 64 (1992) 57–65. [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(92\)80162-U](https://doi.org/10.1016/0166-6622(92)80162-U).
- [290] R.K. Henderson, A. Baker, S.A. Parsons, B. Jefferson, Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms, Water Res. 42 (2008) 3435–3445. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.032>.
- [291] L. Wang, K. Pan, L. Zhang, C. Zhou, Y. Li, B. Zhu, J. Han, Tentative identification of key factors determining the hemostatic efficiency of

- diatom frustule, *Biomater Sci.* 9 (2021) 2162–2173. <https://doi.org/10.1039/d0bm02002h>.
- [292] A. Galletti, S. Seo, S.H. Joo, C. Su, P. Blackwelder, Effects of titanium dioxide nanoparticles derived from consumer products on the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*, *Environmental Science and Pollution Research.* 23 (2016) 21113–21122. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7556-6>.
- [293] H. Konno, Settling and coagulation of slender type diatoms, in: *Water Science and Technology*, IWA Publishing, 1993: pp. 231–240. <https://doi.org/10.2166/wst.1993.0281>.
- [294] G. V. Franks, Zeta potentials and yield stresses of silica suspensions in concentrated monovalent electrolytes: Isoelectric point shift and additional attraction, *J Colloid Interface Sci.* 249 (2002) 44–51. <https://doi.org/10.1006/jcis.2002.8250>.
- [295] S. Lebrette, C. Pagnoux, P. Abélard, Stability of aqueous TiO₂ suspensions: Influence of ethanol, *J Colloid Interface Sci.* 280 (2004) 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.07.033>.
- [296] D.L. Liao, G.S. Wu, B.Q. Liao, Zeta potential of shape-controlled TiO₂ nanoparticles with surfactants, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 348 (2009) 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.07.036>.
- [297] M. Kosmulski, P. Prochniak, J. Rosenholm, Letter: The IEP of carbonate-free neodymium(III) oxide, *J Dispers Sci Technol.* 30 (2009) 589–591. <https://doi.org/10.1080/01932690902766319>.
- [298] V. Uskoković, Dynamic Light Scattering Based Microelectrophoresis: Main Prospects and Limitations, *J Dispers Sci Technol.* 33 (2012) 1762–1786. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.625523>.
- [299] A.W. Coats, J.P. Redfern, Thermogravimetric analysis. A review, *Analyst.* 88 (1963) 906–924. <https://doi.org/10.1039/AN9638800906>.
- [300] L.T. Zhuravlev, The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 173 (2000) 1–38. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00556-2](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00556-2).
- [301] D.M. Kadam, M. Thunga, S. Wang, M.R. Kessler, D. Grewell, B. Lamsal, C. Yu, Preparation and characterization of whey protein isolate films reinforced with porous silica coated titania

- nanoparticles, *J Food Eng.* 117 (2013) 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.046>.
- [302] T.A. Safonova, V. V. Annenkov, E.P. Chebykin, E.N. Danilovtseva, Y. V. Likhoshway, M.A. Grachev, Aberration of morphogenesis of siliceous frustule elements of the diatom *Synedra acus* in the presence of germanic acid, *Biochemistry (Moscow)*. 72 (2007) 1261–1269. <https://doi.org/10.1134/S0006297907110132>.
- [303] H. Xie, Q. Zhang, T. Xi, J. Wang, Y. Liu, Thermal analysis on nanosized TiO₂ prepared by hydrolysis, *Thermochim Acta*. 381 (2002) 45–48. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(01\)00642-6](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(01)00642-6).
- [304] S.S. Ibrahim, A.Q. Selim, Heat treatment of natural diatomite, *Physicochemical Problems of Mineral Processing*. 48 (2012) 413–424. <https://doi.org/10.5277/ppmp120208>.
- [305] A.P. Nowak, M. Sprynskyy, W. Brzozowska, A. Lisowska-Oleksiak, Electrochemical behavior of a composite material containing 3D-structured diatom biosilica, *Algal Res.* 41 (2019) 101538. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101538>.
- [306] J. Eckert, O. Gourdon, D.E. Jacob, C. Meral, P.J.M. Monteiro, S.C. Vogel, R. Wirth, H.-R. Wenk, Ordering of water in opals with different microstructures, *European Journal of Mineralogy*. 27 (2015) 203–213. <https://doi.org/10.1127/ejm/2015/0027-2428>.
- [307] A. Heredia, E. Figueira, C.T. Rodrigues, A. Rodríguez-Galván, V.A. Basiuk, E.G. Vrieling, S.F.P. Almeida, Cd²⁺ affects the growth, hierarchical structure and peptide composition of the biosilica of the freshwater diatom *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith, *Phycological Res.* 60 (2012) 229–240. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2012.00652.x>.
- [308] N. Kröger, R. Deutzmann, M. Sumper, Silica-precipitating peptides from diatoms: The chemical structure of silaffin-1A from *Cylindrotheca fusiformis*, *Journal of Biological Chemistry*. 276 (2001) 26066–26070. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102093200>.
- [309] G. Della Rosa, D. Vona, A. Aloisi, R. Ragni, R. Di Corato, M. Lo Presti, S.R. Cicco, E. Altamura, A. Taurino, M. Catalano, G.M. Farinola, R. Rinaldi, Luminescent Silica-Based Nanostructures from in Vivo Iridium-Doped Diatoms Microalgae, *ACS Sustain Chem Eng.* 7 (2019) 2207–2215. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b04888>.

- [310] S.C. Boyatzis, G. Velivasaki, E. Malea, Erratum to: A study of the deterioration of aged parchment marked with laboratory iron gall inks using FTIR-ATR spectroscopy and micro hot table [Herit Sci., 4 (2016) (13)], DOI: 10.1186/s40494-016-0083-4, Herit Sci. 4 (2016) 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40494-016-0107-0>.
- [311] X. Wang, R. Kong, X. Pan, H. Xu, D. Xia, H. Shan, J.R. Lu, Role of ovalbumin in the stabilization of metastable vaterite in calcium carbonate biomineralization, *Journal of Physical Chemistry B*. 113 (2009) 8975–8982. <https://doi.org/10.1021/jp810281f>.
- [312] D. Rickert, M. Schlüter, K. Wallmann, Dissolution kinetics of biogenic silica from the water column to the sediments, *Geochim Cosmochim Acta*. 66 (2002) 439–455. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(01\)00757-8](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(01)00757-8).
- [313] *The Infrared Spectra of Minerals*, Mineralogical Society of Great Britain and Ireland, 1974. <https://doi.org/10.1180/mono-4>.
- [314] M. Hernández-Ortiz, G. Hernández-Padrón, R. Bernal, C. Cruz-Vázquez, V. Castano, Nanocrystalline mimetic opals: synthesis and comparative characterization vs. natural stones, *International Journal of Basic and Applied Sciences*. 4 (2015) 238. <https://doi.org/10.14419/ijbas.v4i2.4174>.
- [315] I. Adamo, C. Ghisoli, F. Caucia, A contribution to the study of FTIR spectra of opals, *Neues Jahrbuch Fur Mineralogie, Abhandlungen*. 187 (2010) 63–68. <https://doi.org/10.1127/0077-7757/2010/0161>.
- [316] H. Bin Lu, Y.Z. Zhou, S. Vongehr, S.C. Tang, X.K. Meng, Effects of hydrothermal temperature on formation and decoloration characteristics of anatase TiO₂ nanoparticles, *Sci China Technol Sci*. 55 (2012) 894–902. <https://doi.org/10.1007/s11431-011-4706-4>.
- [317] J. Wei, L. Zhao, S. Peng, J. Shi, Z. Liu, W. Wen, Wettability of urea-doped TiO₂ nanoparticles and their high electrorheological effects, *J Solgel Sci Technol*. 47 (2008) 311–315. <https://doi.org/10.1007/s10971-008-1787-z>.
- [318] E. Camargo, P.C.J. Jaime, C.-F. Lin, M.-S. Lin, T.-Y. Yu, M.-C. Wu, S.-Y. Lai, M.-Y. Wang, Chemical and optical characterization of *Psammodyctyon panduriforme* (Gregory) Mann comb nov (*Bacillariophyta*) frustules, *Opt Mater Express*. 6 (2016) 1436. <https://doi.org/10.1364/ome.6.001436>.
- [319] M. Kammer, R. Hedrich, H. Ehrlich, J. Popp, E. Brunner, C. Krafft, Spatially resolved determination of the structure and composition of

- diatom cell walls by Raman and FTIR imaging, *Anal Bioanal Chem.* 398 (2010) 509–517. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3924-0>.
- [320] E. De Tommasi, Light Manipulation by Single Cells: The Case of Diatoms, *Journal of Spectroscopy.* 2016 (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/2490128>.
- [321] H. Tang, H. Berger, P.E. Schmid, F. Lévy, G. Burri, Photoluminescence in TiO₂ anatase single crystals, *Solid State Commun.* 87 (1993) 847–850. [https://doi.org/10.1016/0038-1098\(93\)90427-O](https://doi.org/10.1016/0038-1098(93)90427-O).
- [322] L. V. Saraf, S.I. Patil, S.B. Ogale, S.R. Sainkar, S.T. Kshirsager, Synthesis of nanophase TiO₂ by ion beam sputtering and cold condensation technique, *Int J Mod Phys B.* 12 (1998) 2635–2647. <https://doi.org/10.1142/S0217979298001538>.
- [323] C. Itoh, K. Tanimura, N. Itoh, Optical studies of self-trapped excitons in SiO₂, *Journal of Physics C: Solid State Physics.* 21 (1988) 4693–4702. <https://doi.org/10.1088/0022-3719/21/26/017>.
- [324] *Defects in SiO₂ and Related Dielectrics: Science and Technology*, Springer Netherlands, 2000. <https://doi.org/10.1007/978-94-010-0944-7>.
- [325] S. Gallis, V. Nikas, H. Suhag, M. Huang, A.E. Kaloyeros, White light emission from amorphous silicon oxycarbide (a-SiC_xO_y) thin films: Role of composition and postdeposition annealing, *Appl Phys Lett.* 97 (2010) 081905. <https://doi.org/10.1063/1.3482938>.
- [326] Y. Lei, L.D. Zhang, Fabrication, characterization, and photoluminescence properties of highly ordered TiO₂ nanowire arrays, *J Mater Res.* 16 (2001) 1138–1144. <https://doi.org/10.1557/JMR.2001.0157>.
- [327] L.M.P. Garcia, M.T.S. Tavares, N.F. Andrade Neto, R.M. Nascimento, C.A. Paskocimas, E. Longo, M.R.D. Bomio, F. V. Motta, Photocatalytic activity and photoluminescence properties of TiO₂, In₂O₃, TiO₂/In₂O₃ thin films multilayer, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics.* 29 (2018) 6530–6542. <https://doi.org/10.1007/s10854-018-8635-x>.
- [328] N. Serpone, D. Lawless, R. Khairutdinov, Size effects on the photophysical properties of colloidal anatase TiO₂ particles: Size quantization or direct transitions in this indirect semiconductor?, *Journal of Physical Chemistry.* 99 (1995) 16646–16654. <https://doi.org/10.1021/j100045a026>.

- [329] A. Setaro, S. Lettieri, D. Diamare, P. Maddalena, C. Malagù, M.C. Carotta, G. Martinelli, Nanograined anatase titania-based optochemical gas detection, *New J Phys.* 10 (2008) 053030. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/10/5/053030>.
- [330] S. Mathew, A. Kumar Prasad, T. Benoy, P.P. Rakesh, M. Hari, T.M. Libish, P. Radhakrishnan, V.P.N. Nampoori, C.P.G. Vallabhan, UV-visible photoluminescence of TiO₂ nanoparticles prepared by hydrothermal method, *J Fluoresc.* 22 (2012) 1563–1569. <https://doi.org/10.1007/s10895-012-1096-3>.
- [331] J. Davies, Origins and evolution of antibiotic resistance., *Microbiologia.* 12 (1996) 9–16. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00016-10>.
- [332] C.A. Arias, B.E. Murray, A New Antibiotic and the Evolution of Resistance, *New England Journal of Medicine.* 372 (2015) 1168–1170. <https://doi.org/10.1056/nejmcibr1500292>.
- [333] M. Rae, J. Carruthers, The future of public health, *Br J Hosp Med.* 83 (2022). <https://doi.org/10.12968/hmed.2022.0228>.
- [334] Y. Kuthati, R.K. Kankala, S.X. Lin, C.F. Weng, C.H. Lee, pH-Triggered Controllable Release of Silver-Indole-3 Acetic Acid Complexes from Mesoporous Silica Nanoparticles (IBN-4) for Effectively Killing Malignant Bacteria, *Mol Pharm.* 12 (2015) 2289–2304. <https://doi.org/10.1021/mp500836w>.
- [335] D. Liu, L. Ma, L. Liu, L. Wang, Y. Liu, Q. Jia, Q. Guo, G. Zhang, J. Zhou, Polydopamine-Encapsulated Fe₃O₄ with an Adsorbed HSP70 Inhibitor for Improved Photothermal Inactivation of Bacteria, *ACS Appl Mater Interfaces.* 8 (2016) 24455–24462. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b08119>.
- [336] D.I. Andersson, D. Hughes, Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations, *FEMS Microbiol Rev.* 35 (2011) 901–911. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00289.x>.
- [337] F. Huang, Y. Gao, Y. Zhang, T. Cheng, H. Ou, L. Yang, J. Liu, L. Shi, J. Liu, Silver-Decorated Polymeric Micelles Combined with Curcumin for Enhanced Antibacterial Activity, *ACS Appl Mater Interfaces.* 9 (2017) 16880–16889. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b03347>.
- [338] X. Ding, S. Duan, X. Ding, R. Liu, F.J. Xu, Versatile Antibacterial Materials: An Emerging Arsenal for Combatting Bacterial

- Pathogens, *Adv Funct Mater.* 28 (2018) 1802140. <https://doi.org/10.1002/adfm.201802140>.
- [339] T. Wei, Q. Yu, W. Zhan, H. Chen, A Smart Antibacterial Surface for the On-Demand Killing and Releasing of Bacteria, *Adv Health Mater.* 5 (2016) 449–456. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500700>.
- [340] S. Ma, S. Zhan, Y. Jia, Q. Zhou, Superior Antibacterial Activity of Fe₃O₄-TiO₂ Nanosheets under Solar Light, *ACS Appl Mater Interfaces.* 7 (2015) 21875–21883. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b06264>.
- [341] J. Arul Mary, J. Judith Vijaya, L. John Kennedy, M. Bououdina, Microwave-assisted synthesis, characterization and antibacterial properties of Ce-Cu dual doped ZnO nanostructures, *Optik (Stuttg).* 127 (2016) 2360–2365. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2015.11.019>.
- [342] M.S.A.S. Shah, M. Nag, T. Kalagara, S. Singh, S. V. Manorama, Silver on PEG-PU-TiO₂ polymer nanocomposite films: An excellent system for antibacterial applications, *Chemistry of Materials.* 20 (2008) 2455–2460. <https://doi.org/10.1021/cm7033867>.
- [343] K. Zou, Q. Liu, J. Chen, J. Du, Silver-decorated biodegradable polymer vesicles with excellent antibacterial efficacy, *Polym Chem.* 5 (2014) 405–411. <https://doi.org/10.1039/c3py00966a>.
- [344] W. Bing, Z. Chen, H. Sun, P. Shi, N. Gao, J. Ren, X. Qu, Visible-light-driven enhanced antibacterial and biofilm elimination activity of graphitic carbon nitride by embedded Ag nanoparticles, *Nano Res.* 8 (2015) 1648–1658. <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0654-1>.
- [345] B. Le Ouay, F. Stellacci, Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight, *Nano Today.* 10 (2015) 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.04.002>.
- [346] M. Mahmoudi, V. Serpooshan, Silver-coated engineered magnetic nanoparticles are promising for the success in the fight against antibacterial resistance threat, *ACS Nano.* 6 (2012) 2656–2664. <https://doi.org/10.1021/nn300042m>.
- [347] T. Harifi, M. Montazer, Photo-, bio-, and magneto-active colored polyester fabric with hydrophobic/hydrophilic and enhanced mechanical properties through synthesis of TiO₂/Fe₃O₄/Ag nanocomposite, *Ind Eng Chem Res.* 53 (2014) 1119–1129. <https://doi.org/10.1021/ie403052m>.
- [348] D.M. Tobaldi, C. Piccirillo, R.C. Pullar, A.F. Gualtieri, M.P. Seabra, P.M.L. Castro, J.A. Labrincha, Silver-modified nano-titania as an

- antibacterial agent and photocatalyst, *Journal of Physical Chemistry C*. 118 (2014) 4751–4766. <https://doi.org/10.1021/jp411997k>.
- [349] C. Dominguez-Wong, G.M. Loredó-Becerra, C.C. Quintero-González, M.E. Noriega-Treviño, M.E. Compeán-Jasso, N. Niño-Martínez, I. Dealba-Montero, F. Ruiz, Evaluation of the antibacterial activity of an indoor waterborne architectural coating containing Ag/TiO₂ under different relative humidity environments, *Mater Lett*. 134 (2014) 103–106. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.07.067>.
- [350] J. Adhikary, B. Das, S. Chatterjee, S.K. Dash, S. Chattopadhyay, S. Roy, J.W. Chen, T. Chattopadhyay, Ag/CuO nanoparticles prepared from a novel trinuclear compound [Cu(Imdz)₄(Ag(CN)₂)₂] (Imdz = imidazole) by a pyrolysis display excellent antimicrobial activity, *J Mol Struct*. 1113 (2016) 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.02.029>.
- [351] A.H. Shah, E. Manikandan, M. Basheer Ahmed, V. Ganesan, Enhanced bioactivity of Ag/ZnO nanorods-a comparative antibacterial study, *J Nanomed Nanotechnol*. 4 (2013). <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000168>.
- [352] H. Zhang, G. Chen, potent antibacterial activities of Ag/TiO₂ nanocomposite powders synthesized by a one-pot sol-gel method, *Environ Sci Technol*. 43 (2009) 2905–2910. <https://doi.org/10.1021/es803450f>.
- [353] M.J. Hajipour, K.M. Fromm, A. Akbar Ashkarran, D. Jimenez de Aberasturi, I.R. de Larramendi, T. Rojo, V. Serpooshan, W.J. Parak, M. Mahmoudi, Antibacterial properties of nanoparticles, *Trends Biotechnol*. 30 (2012) 499–511. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>.
- [354] M. Lungu, Ș. Gavriliu, E. Enescu, I. Ion, A. Brătulescu, G. Mihăescu, L. Măruțescu, M.C. Chifiriuc, Silver-titanium dioxide nanocomposites as effective antimicrobial and antibiofilm agents, *Journal of Nanoparticle Research*. 16 (2014) 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-2203-3>.
- [355] S. Mei, H. Wang, W. Wang, L. Tong, H. Pan, C. Ruan, Q. Ma, M. Liu, H. Yang, L. Zhang, Y. Cheng, Y. Zhang, L. Zhao, P.K. Chu, Antibacterial effects and biocompatibility of titanium surfaces with graded silver incorporation in titania nanotubes, *Biomaterials*. 35 (2014) 4255–4265. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.005>.

- [356] F.C. Yang, K.H. Wu, J.W. Huang, D.N. Horng, C.F. Liang, M.K. Hu, Preparation and characterization of functional fabrics from bamboo charcoal/silver and titanium dioxide/silver composite powders and evaluation of their antibacterial efficacy, *Materials Science and Engineering C*. 32 (2012) 1062–1067. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.11.016>.
- [357] S.A. Amin, M. Pazouki, A. Hosseinnia, Synthesis of TiO₂-Ag nanocomposite with sol-gel method and investigation of its antibacterial activity against *E. coli*, *Powder Technol.* 196 (2009) 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2009.07.021>.
- [358] G. Fu, P.S. Vary, C.T. Lin, Anatase TiO₂ nanocomposites for antimicrobial coatings, *Journal of Physical Chemistry B*. 109 (2005) 8889–8898. <https://doi.org/10.1021/jp0502196>.
- [359] M. Li, M.E. Noriega-Trevino, N. Nino-Martinez, C. Marambio-Jones, J. Wang, R. Damoiseaux, F. Ruiz, E.M.V. Hoek, Synergistic bactericidal activity of Ag-TiO₂ nanoparticles in both light and dark conditions, *Environ Sci Technol.* 45 (2011) 8989–8995. <https://doi.org/10.1021/es201675m>.
- [360] J. Thiel, L. Pakstis, S. Buzby, M. Raffi, C. Ni, D.J. Pochan, S.I. Shah, Antibacterial properties of silver-doped titania, *Small*. 3 (2007) 799–803. <https://doi.org/10.1002/sml.200600481>.
- [361] T.S. Wu, K.X. Wang, G.D. Li, S.Y. Sun, J. Sun, J.S. Chen, Montmorillonite-Supported Ag/TiO₂ nanoparticles: An efficient visible-Light bacteria photodegradation material, *ACS Appl Mater Interfaces*. 2 (2010) 544–550. <https://doi.org/10.1021/am900743d>.
- [362] D. Liu, J. Gu, Q. Liu, Y. Tan, Z. Li, W. Zhang, Y. Su, W. Li, A. Cui, C. Gu, D. Zhang, Metal-organic frameworks reactivate deceased diatoms to be efficient CO₂ absorbents, *Advanced Materials*. 26 (2014) 1229–1234. <https://doi.org/10.1002/adma.201304284>.
- [363] T. Kawawaki, Y. Kataoka, M. Hirata, Y. Akinaga, R. Takahata, K. Wakamatsu, Y. Fujiki, M. Kataoka, S. Kikkawa, A.S. Alotabi, S. Hossain, D.J. Osborn, T. Teranishi, G.G. Andersson, G.F. Metha, S. Yamazoe, Y. Negishi, Inside Cover: Creation of High-Performance Heterogeneous Photocatalysts by Controlling Ligand Desorption and Particle Size of Gold Nanocluster (*Angew. Chem. Int. Ed.* 39/2021), *Angewandte Chemie International Edition*. 60 (2021) 21074–21074. <https://doi.org/10.1002/anie.202108478>.
- [364] S.R. Cicco, D. Vona, E. De Giglio, S. Cometa, M. Mattioli-Belmonte, F. Palumbo, R. Ragni, G.M. Farinola, Chemically Modified Diatoms

- Biosilica for Bone Cell Growth with Combined Drug-Delivery and Antioxidant Properties, *Chempluschem*. 80 (2015) 1104–1112. <https://doi.org/10.1002/cplu.201402398>.
- [365] B. Krishnan, S. Mahalingam, Ag/TiO₂/bentonite nanocomposite for biological applications: Synthesis, characterization, antibacterial and cytotoxic investigations, *Advanced Powder Technology*. 28 (2017) 2265–2280. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2017.06.007>.
- [366] R. Kato, M. Uesugi, Y. Komatsu, F. Okamoto, T. Tanaka, F. Kitawaki, T.A. Yano, Highly Stable Polymer Coating on Silver Nanoparticles for Efficient Plasmonic Enhancement of Fluorescence, *ACS Omega*. 7 (2022) 4286–4292. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06010>.
- [367] L.A.P. Gontijo, E. Raphael, D.P.S. Ferrari, J.L. Ferrari, J.P. Lyon, M.A. Schiavon, pH effect on the synthesis of different size silver nanoparticles evaluated by dls and their size-dependent antimicrobial activity, *Revista Materia*. 25 (2020) 1–10. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620200004.1145>.
- [368] G. Xu, X. Qiao, X. Qiu, J. Chen, Preparation and Characterization of Nano-silver Loaded Montmorillonite with Strong Antibacterial Activity and Slow Release Property, *J Mater Sci Technol*. 27 (2011) 685–690. [https://doi.org/10.1016/S1005-0302\(11\)60126-6](https://doi.org/10.1016/S1005-0302(11)60126-6).
- [369] J. Rakovan, Word to the wise: Hemimorphism, *Rocks and Minerals*. 82 (2007) 329–337. <https://doi.org/10.3200/RMIN.82.4.329-337>.
- [370] U.W. Pohl, *Epitaxy of Semiconductors: Introduction to Physical Principles*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-32970-8>.
- [371] J. Zhang, W. Wang, T. Wang, L. Jiang, N. Wang, D. Sun, X. Zhao, M. Wang, Y. Qi, Nanoscale characterization of the doped SrZrO₃ nanoparticles distribution and its influence on the microstructure of Bi₂Sr₂CaCu₂O₈^{+δ} film, *J Alloys Compd*. 858 (2021) 157650. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2020.157650>.
- [372] Z. Peng, H. Hu, M.I.B. Utama, L.M. Wong, K. Ghosh, R. Chen, S. Wang, Z. Shen, Q. Xiong, Heteroepitaxial decoration of Ag nanoparticles on Si nanowires: A case study on Raman scattering and mapping, *Nano Lett*. 10 (2010) 3940–3947. <https://doi.org/10.1021/nl101704p>.
- [373] X. Cheng, J.C. Wong, M. Weyland, N. Valanoor, Encapsulation of Metal Oxide Nanoparticles by Oxide Supports during Epitaxial

- Growth, *ACS Appl Electron Mater.* 1 (2019) 1482–1488. <https://doi.org/10.1021/acsaelm.9b00277>.
- [374] S. Tang, H. Wang, H.S. Wang, Q. Sun, X. Zhang, C. Cong, H. Xie, X. Liu, X. Zhou, F. Huang, X. Chen, T. Yu, F. Ding, X. Xie, M. Jiang, Silane-catalysed fast growth of large single-crystalline graphene on hexagonal boron nitride, *Nat Commun.* 6 (2015) 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms7499>.
- [375] L. Carbone, P.D. Cozzoli, Colloidal heterostructured nanocrystals: Synthesis and growth mechanisms, *Nano Today.* 5 (2010) 449–493. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2010.08.006>.
- [376] J. Nozawa, S. Uda, H. Niinomi, J. Okada, K. Fujiwara, Heteroepitaxial Growth of Colloidal Crystals: Dependence of the Growth Mode on the Interparticle Interactions and Lattice Spacing, *Journal of Physical Chemistry Letters.* 13 (2022) 6995–7000. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.2c01707>.
- [377] Y. Du, B. Xu, G. Wang, Y. Miao, B. Li, Z. Kong, Y. Dong, W. Wang, H.H. Radamson, Review of Highly Mismatched III-V Heteroepitaxy Growth on (001) Silicon, *Nanomaterials.* 12 (2022) 741. <https://doi.org/10.3390/nano12050741>.
- [378] Y. Hu, H.L. Tsai, C.L. Huang, Effect of brookite phase on the anatase-rutile transition in titania nanoparticles, *J Eur Ceram Soc.* 23 (2003) 691–696. [https://doi.org/10.1016/S0955-2219\(02\)00194-2](https://doi.org/10.1016/S0955-2219(02)00194-2).
- [379] C. Pighini, D. Aymes, N. Millot, L. Saviot, Low-frequency Raman characterization of size-controlled anatase TiO₂ nanopowders prepared by continuous hydrothermal syntheses, *Journal of Nanoparticle Research.* 9 (2007) 309–315. <https://doi.org/10.1007/s11051-005-9061-6>.
- [380] H. Zhang, J.F. Banfield, Understanding polymorphic phase transformation behavior during growth of nanocrystalline aggregates: Insights from TiO₂, *Journal of Physical Chemistry B.* 104 (2000) 3481–3487. <https://doi.org/10.1021/jp000499j>.
- [381] V. Dmitriev, P. Tolédano, Theory of reconstructive phase transitions between polymorphs, *Phys Rev B Condens Matter Mater Phys.* 58 (1998) 11911–11921. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.58.11911>.
- [382] L. Ramirez, S.R. Gentile, S. Zimmermann, S. Stoll, Behavior of TiO₂ and CeO₂ nanoparticles and polystyrene nanoplastics in bottled mineral, drinking and Lake Geneva waters. Impact of water hardness and natural organic matter on nanoparticle surface properties and

- aggregation, *Water* (Switzerland). 11 (2019) 721. <https://doi.org/10.3390/w11040721>.
- [383] Z. Qiao, Y. Yao, S. Song, M. Yin, J. Luo, Silver nanoparticles with pH induced surface charge switchable properties for antibacterial and antibiofilm applications, *J Mater Chem B*. 7 (2019) 830–840. <https://doi.org/10.1039/c8tb02917b>.
- [384] Z. Zhang, Y. Wang, Q. Chen, Q. Gao, L. Liu, J. Yang, X. Pan, Y. Miao, F. Chi, Application of High Potential Electrophoretic Particles Modified with High Ionization Mono Ionic Liquid for Electrophoretic Displays, *Micromachines* (Basel). 13 (2022) 1235. <https://doi.org/10.3390/mi13081235>.
- [385] N. Daude, C. Gout, C. Jouanin, Electronic band structure of titanium dioxide, *Phys Rev B*. 15 (1977) 3229–3235. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.15.3229>.
- [386] Y. Lei, L.D. Zhang, G.W. Meng, G.H. Li, X.Y. Zhang, C.H. Liang, W. Chen, S.X. Wang, Preparation and photoluminescence of highly ordered TiO₂ nanowire arrays, *Appl Phys Lett*. 78 (2001) 1125–1127. <https://doi.org/10.1063/1.1350959>.
- [387] Z. Parang, A. Keshavarz, S. Farahi, S.M. Elahi, M. Ghoranneviss, S. Parhoodeh, Fluorescence emission spectra of silver and silver/cobalt nanoparticles, *Scientia Iranica*. 19 (2012) 943–947. <https://doi.org/10.1016/j.scient.2012.02.026>.
- [388] B. Choudhury, A. Choudhury, Tailoring luminescence properties of TiO₂ nanoparticles by Mn doping, *J Lumin*. 136 (2013) 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2012.12.011>.
- [389] J. Liu, J. Li, A. Sedhain, J. Lin, H. Jiang, Structure and photoluminescence study of TiO₂ nanoneedle texture along vertically aligned carbon nanofiber arrays, *Journal of Physical Chemistry C*. 112 (2008) 17127–17132. <https://doi.org/10.1021/jp8060653>.
- [390] D. Komaraiyah, E. Radha, J. Sivakumar, M. V. Ramana Reddy, R. Sayanna, Photoluminescence and photocatalytic activity of spin coated Ag⁺ doped anatase TiO₂ thin films, *Opt Mater (Amst)*. 108 (2020) 110401. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2020.110401>.
- [391] S. Prabhu, E.K. Poulouse, Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects, *Int Nano Lett*. 2 (2012). <https://doi.org/10.1186/2228-5326-2-32>.

- [392] N.G.M. Attallah, E. Elekhnawy, W.A. Negm, I.A. Hussein, F.A. Mokhtar, O.M. Al-Fakhrany, *In Vivo* and *In Vitro* Antimicrobial Activity of Biogenic Silver Nanoparticles against *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates, *Pharmaceuticals*. 15 (2022) 194. <https://doi.org/10.3390/ph15020194>.
- [393] I.L. Hsiao, Y.K. Hsieh, C.F. Wang, I.C. Chen, Y.J. Huang, Trojan-horse mechanism in the cellular uptake of silver nanoparticles verified by direct intra- and extracellular silver speciation analysis, *Environ Sci Technol*. 49 (2015) 3813–3821. <https://doi.org/10.1021/es504705p>.
- [394] W. He, H.K. Kim, W.G. Wamer, D. Melka, J.H. Callahan, J.J. Yin, Photogenerated charge carriers and reactive oxygen species in ZnO/Au hybrid nanostructures with enhanced photocatalytic and antibacterial activity, *J Am Chem Soc*. 136 (2014) 750–757. <https://doi.org/10.1021/ja410800y>.
- [395] S.S.D. Kumar, N.K. Rajendran, N.N. Houreld, H. Abrahamse, Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer-based biomaterials for wound healing applications, *Int J Biol Macromol*. 115 (2018) 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.003>.
- [396] P. Kanmani, J.W. Rhim, Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay, *Food Hydrocoll*. 35 (2014) 644–652. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.011>.
- [397] N.V. Ayala-Núñez, H.H. Lara Villegas, L. Del Carmen Ixtepan Turrent, C. Rodríguez Padilla, Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale does matter, *Nanobiotechnology*. 5 (2009) 2–9. <https://doi.org/10.1007/s12030-009-9029-1>.
- [398] M.A. Khalil, G.M. El Maghraby, F.I. Sonbol, N.G. Allam, P.S. Ateya, S.S. Ali, Enhanced Efficacy of Some Antibiotics in Presence of Silver Nanoparticles Against Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Recovered From Burn Wound Infections, *Front Microbiol*. 12 (2021) 2645. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.648560>.
- [399] F. Paladini, M. Pollini, Antimicrobial silver nanoparticles for wound healing application: Progress and future trends, *Materials*. 12 (2019) 2540. <https://doi.org/10.3390/ma12162540>.

- [400] N. Wali, A. Shabbir, N. Wajid, N. Abbas, S.Z.H. Naqvi, Synergistic efficacy of colistin and silver nanoparticles impregnated human amniotic membrane in a burn wound infected rat model, *Sci Rep.* 12 (2022) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10314-9>.
- [401] S.A.H. Jalali, A.R. Allafchian, S.S. Banifatemi, I. Ashrafi Tamai, The antibacterial properties of Ag/TiO₂ nanoparticles embedded in silane sol–gel matrix, *J Taiwan Inst Chem Eng.* 66 (2016) 357–362. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.06.011>.
- [402] Z. Bekissanova, V. Railean, W. Brzozowska, I. Wojtczak, A. Ospanova, B. Buszewski, M. Sprynskyy, Synthesis, characterization of silver/kaolinite nanocomposite and studying its antibacterial activity, *Colloids Surf B Biointerfaces.* 220 (2022) 112908. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112908>.
- [403] J.L. Howe, Inorganic chemistry, *J Am Chem Soc.* 48 (1926) 111–128. <https://doi.org/10.1021/ja01419a807>.
- [404] C. Bouzigues, T. Gacoin, A. Alexandrou, Biological applications of rare-earth based nanoparticles, *ACS Nano.* 5 (2011) 8488–8505. <https://doi.org/10.1021/nn202378b>.
- [405] S. Yuvaraj, R. Kalai Selvan, V. Bhooshan Kumar, I. Perelshtein, A. Gedanken, S. Isakkimuthu, S. Arumugam, Sonochemical synthesis, structural, magnetic and grain size dependent electrical properties of NdVO₄ nanoparticles, *Ultrason Sonochem.* 21 (2014) 599–605. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.08.015>.
- [406] M. Dragomir, M. Valant, Room-temperature synthesis and optical properties of NdVO₄ nanoneedles, *Acta Chim Slov.* 65 (2018) 679–686. <https://doi.org/10.17344/acsi.2018.4373>.
- [407] S. Mahapatra, G. Madras, T.N. Guru Row, Structural and photocatalytic activity of lanthanide (Ce, Pr, and Nd) molybdovanadates, *Journal of Physical Chemistry C.* 111 (2007) 6505–6511. <https://doi.org/10.1021/jp069007e>.
- [408] R.A. Fields, M. Birnbaum, C.L. Fincher, Highly efficient Nd:YVO₄ diode-laser end-pumped laser, *Appl Phys Lett.* 51 (1987) 1885–1886. <https://doi.org/10.1063/1.98500>.
- [409] H. Zhang, J. Liu, J. Wang, X. Xu, M. Jiang, Continuous-wave laser performance of Nd:LuVO₄ crystal operating at 1.34 μm, *Appl Opt.* 44 (2005) 7439–7441. <https://doi.org/10.1364/AO.44.007439>.
- [410] A. Di Paola, E. García-López, G. Marci, L. Palmisano, A survey of photocatalytic materials for environmental remediation, *J Hazard*

Mater. 211–212 (2012) 3–29.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.11.050>.

- [411] X. Huang, S. Han, W. Huang, X. Liu, Enhancing solar cell efficiency: The search for luminescent materials as spectral converters, *Chem Soc Rev.* 42 (2013) 173–201. <https://doi.org/10.1039/c2cs35288e>.
- [412] C.C. Lin, R.S. Liu, Advances in phosphors for light-emitting diodes, *Journal of Physical Chemistry Letters.* 2 (2011) 1268–1277. <https://doi.org/10.1021/jz2002452>.
- [413] Y. Liu, D. Tu, H. Zhu, X. Chen, Lanthanide-doped luminescent nanoprobes: Controlled synthesis, optical spectroscopy, and bioapplications, *Chem Soc Rev.* 42 (2013) 6924–6958. <https://doi.org/10.1039/c3cs60060b>.
- [414] C. Yao, C. Yao, Y. Tong, Lanthanide ion-based luminescent nanomaterials for bioimaging, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry.* 39 (2012) 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.07.007>.
- [415] M. Abdesselem, M. Schoeffel, I. Maurin, R. Ramodiharilafy, G. Autret, O. Clément, P.L. Tharaux, J.P. Boilot, T. Gacoin, C. Bouzigues, A. Alexandrou, Multifunctional rare-earth vanadate nanoparticles: Luminescent labels, oxidant sensors, and MRI contrast agents, *ACS Nano.* 8 (2014) 11126–11137. <https://doi.org/10.1021/nn504170x>.
- [416] H. Deng, S. Yang, S. Xiao, H.M. Gong, Q.Q. Wang, Controlled synthesis and upconverted avalanche luminescence of cerium(III) and neodymium(III) orthovanadate nanocrystals with high uniformity of size and shape, *J Am Chem Soc.* 130 (2008) 2032–2040. <https://doi.org/10.1021/ja0778141>.
- [417] S.S. Ibrahim, A.Q. Selim, Heat treatment of natural diatomite, *Physicochemical Problems of Mineral Processing.* 48 (2012) 413–424. <https://doi.org/10.5277/ppmp120208>.
- [418] A.P. Nowak, M. Sprynskyy, I. Wojtczak, K. Trzeciński, J. Wysocka, M. Szkoda, B. Buszewski, A. Lisowska-Oleksiak, Diatoms biomass as a joint source of biosilica and carbon for lithium-ion battery anodes, *Materials.* 13 (2020) 1673. <https://doi.org/10.3390/ma13071673>.
- [419] L. Vasylechko, A. Tupys, V. Hreb, V. Tsiumra, I. Lutsiuk, Y. Zhydashkevskyy, New mixed $Y_{0.5}R_{0.5}VO_4$ and $RVO_4:Bi$ materials: Synthesis, crystal structure and some luminescence properties,

Inorganics (Basel). 6 (2018) 94.
<https://doi.org/10.3390/inorganics6030094>.

- [420] J. Xu, C. Hu, G. Liu, H. Liu, G. Du, Y. Zhang, Synthesis and visible-light photocatalytic activity of NdVO₄ nanowires, *J Alloys Compd.* 509 (2011) 7968–7972.
<https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2011.05.051>.
- [421] M.A. Hernández-Rodríguez, U.R. Rodríguez-Mendoza, V. Lavín, J.E. Muñoz-Santiuste, I.R. Martín, A.D. Lozano-Gorrín, High pressure sensitivity of anti-Stokes fluorescence in Nd³⁺ doped yttrium orthoaluminate nano-perovskites, *J Lumin.* 196 (2018) 20–24.
<https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2017.12.008>.
- [422] Y. Luo, Y. Liu, C. Wang, G. Bai, Y. Shen, Z. Jiang, S. Xu, L. Chen, Near-infrared anti-Stokes luminescence from neodymium doped perovskite calcium titanate particles for optical temperature sensors, *Sens Actuators A Phys.* 326 (2021) 112741.
<https://doi.org/10.1016/j.sna.2021.112741>.
- [423] H. Singh, T. Singh, D. Singh, V. Bhatia, D. Kumar, S.P. Singh, Up-conversion and downconversion studies of Nd³⁺ doped borophosphate glasses, *Opt Mater (Amst).* 137 (2023) 113586.
<https://doi.org/10.1016/j.optmat.2023.113586>.
- [424] K. Du, J. Feng, X. Gao, H. Zhang, Nanocomposites based on lanthanide-doped upconversion nanoparticles: diverse designs and applications, *Light Sci Appl.* 11 (2022) 1–23.
<https://doi.org/10.1038/s41377-022-00871-z>.