

# Zelena sinteza nanočestica srebra upotrebom gljive *Ophiostoma novo-ulmi*

---

**Radojković, Iva**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:071415>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-23**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku- Odjel za kemiju

Sveučilišni prijediplomski studij Kemija

Iva Radojković

**Zelena sinteza nanočestica srebra upotrebom  
gljive *Ophiostoma novo-ulmi***

Završni rad

Osijek, 2024.

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku- Odjel za kemiju

Sveučilišni prijediplomski studij Kemija

Iva Radojković

**Zelena sinteza nanočestica srebra upotrebom  
gljive *Ophiostoma novo-ulmi***

Završni rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vlatka Gvozdić

Komentor: izv. prof. dr. sc. Zorana Katanić

Osijek, 2024.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Naziv sveučilišta: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku- Odjel za kemiju

Naziv studija: Sveučilišni prijediplomski studij Kemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Znanstvena grana: Fizikalna kemija

### ZELENA SINTEZA NANOČESTICA SREBRA UPOTREBOM GLJIVE *Ophiostoma novo-ulmi*

IVA RADOJKOVIĆ

**Rad je izrađen na:** Sveučilište u Osijeku - Odjel za kemiju

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Vlatka Gvozdić

**Komentator:** izv. prof. dr. sc. Zorana Katanić

**Sažetak:** Zelena sinteza je metoda koja za sintezu nanočestica koristi netoksične i biorazgradive kemikalije. U ovome istraživanju prvi put je prikazana sinteza nanočestica srebra upotrebom vodenog ekstrakta gljive *Ophiostoma novo-ulmi* i vodene otopine  $\text{AgNO}_3$ . *Ophiostoma novo-ulmi* je fitopatogena gljiva mješinaraka koji uzrokuje holandsku bolest brijesta (DED). Biosintetizirane nanočestice srebra karakterizirane su UV-Vis, FT-IR i PXRD tehnikama. Rezultati karakterizacije sintetiziranih nanočestica ukazuju na uspješnu sintezu korištenjem ekstrakta *O. novo-ulmi* kao reducirajućeg i stabilizirajućeg sredstva, s UV-Vis maksimumom na  $\approx 413$  nm. FT-IR analizom su identificirani glavni fitokemijski spojevi koji bi mogli biti odgovorni za bio-redukcijski potencijal. Prema rezultatima PXRD, promjer kristalita AgNP-a izračunat pomoću Scherrer-ove jednadžbe iznosi 30 nm, sa plošno centriranom kubičnom (fcc) strukturom.

**Ključne riječi:** zelena sinteza, nanočestice srebra, gljive

**Jezik izvorika:** hrvatski jezik

**Završni rad obuhvaća:** 27 stranica, 11 slika, 0 tablica, 28 literaturnih navoda, 0 priloga

**Rad prihvaćen:** 11.09.2024.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu rada:**

izv. prof. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić, predsjednica

izv. prof. dr. sc. Vlatka Gvozdić, mentorica i članica

izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, članica

izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović Kosanović, zamjena člana

**Rad je pohranjen:** Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, 31000 Osijek

Repozitorij Odjela za kemiju, Osijek

## FUNDAMENTAL DOCUMENTATION CARD

Final thesis

University Name: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek – Department of Chemistry**

Name of study programme: **University Undergraduate study programme in Chemistry**

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific branch:** Physical chemistry

### **GREEN SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES USING FUNGUS *Ophiostoma novo-ulmi***

**IVA RADOJKOVIĆ**

**The paper was created on:** Department of Chemistry

**Supervisor:** Vlatka Gvozdić, PhD, associate prof.

**Co-mentor:** Zorana Katanić, PhD, associate prof.

**Abstract:** Green synthesis is a method that uses non-toxic, biodegradable chemicals for the synthesis of nanoparticles. In the present study, we report for the first time a green approach to the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using an aqueous extract of the fungus *Ophiostoma novo-ulmi* and an aqueous solution of AgNO<sub>3</sub>. *Ophiostoma novo-ulmi* is a phytopathogenic ascomycete that causes Dutch elm disease (DED), a devastating vascular wilt disease of elms. The biosynthesised nanoparticles were characterised by UV-Vis, FTIR and PXRD. The results of the characterisation of the synthesised nanoparticles indicate the successful synthesis using *O. novo-ulmi* extract as a reducing and capping agent, with a UV-Vis absorption peak at  $\approx 413$  nm. FTIR identified major phytochemical compounds that could be responsible for the bio-reducing potential. According to the PXRD results, the AgNP crystallite diameter calculated using the Scherrer equation is 30 nm, with a face centred cubic (fcc) structure.

**Keywords:** green synthesis, silver nanoparticles, fungus

**Original language:** Croatian language

**Thesis includes:** 27 pages, 11 figures, 0 tables, 28 references and 0 attachment

**Thesis accepted:** 11.09.2024.

**Reviewers:** Assoc. Prof. Elvira Kovač-Andrić, PhD

Assoc. Prof. Vlatka Gvozdić, PhD

Assoc. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, PhD

Assoc. Prof. Martina Medvidović Kosanović, PhD

**Thesis deposited in:** Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek, Repository of the Department of Chemistry, Osijek

## *Zahvale*

*Zahvaljujem svojoj profesorici i mentorici Izv. prof. dr. sc. Vlatki Gvozdić na prenesnom znanju, strpljenju i vodstvu pri izradi ovoga završnog rada. Hvala Vam na svakom savjetu, pomoći i potpori.*

*Zahvaljujem Izv. prof. dr. sc. Zorani Katanić na utrošenom vremenu i pomoći kod uzgoja gljive i dodatnim usmjerenjima za izradu ovoga završnog rada.*

*Zahvaljujem svojim prijateljima i Bruni na podršci i ohrabrivanju u vrijeme kada mi je to bilo najpotrebnije.*

*Na kraju zahvaljujem se svojim roditeljima, bratu i sestrama koji su uvijek bili uz mene i bez kojih ovaj uspjeh ne bi bio moguć. Hvala Vam što se mi omogućili bezbrižno školovanje.*

*I.R.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1 Nanočestice .....	2
2.2. Nanaočestice srebra .....	2
2.2.1. Primjena nanočestica srebra.....	3
2.3. Zelena sinteza nanočestica.....	4
2.3.1 Zelena sinteza posredovana gljivama .....	5
2.4. Vrsta <i>Ophiostoma novo-ulmi</i> .....	6
2.4.1 Morfologija .....	7
2.4.2. Stanište.....	7
3. EKSPRIMENTALNI DIO .....	8
3.1 Materijali i metode.....	8
3.1.1. Prikupljanje uzorka .....	8
3.1.2. Uzgoj gljive <i>Ophiostoma novo-ulmi</i> na krutoj MEA podlozi.....	8
3.1.3. Ekstracija.....	9
3.1.4. Sinteza nanočestica .....	9
3.1.5. Obrada podataka .....	10
3.1.6. UV-Vis spektroskopija.....	10
3.1.7. FT-IR spektroskopija.....	11
3.1.8. Rendgenska difrakcija na prahu.....	12
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	14

5. ZAKLJUČAK .....	20
6. LITERATURA .....	20



## 1. UVOD

Veličina nanočestica kreće se između 1 i 100 nanometara (nm) zbog čega nalaze veliku primjenu u tehnologiji i znanosti. Svojstva im ovise o obliku i veličini. Mogu se sintetizirati korištenjem različitih tehnika uključujući kemijske, fizikalne i biološke metode. Novija istraživanja usmjerena su na razvoj metoda zelene kemije u cilju proizvodnje nanočestica bez upotrebe tvari opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš. Za razliku od tradicionalnih metoda (kemijskih i fizikalnih), biosinteza nanočestica je brža, sigurnija i ekološki prihvatljivija metoda. Tradicionalne metode sinteze nanočestica većinom su dugotrajne, opasne i temelje se na upotrebi kemikalija koje nisu sigurne (citotoksične, kancerogene, genotoksične), onečišćuju okoliš, a zbog nestabilnosti i toksičnosti ograničena im je i biomedicinska primjena.

Do sada je objavljen niz znanstvenih radova koji opisuju postupke sinteze nanočestica uz pomoć ekstrakata dijelova različitih biljaka, voća i povrća, gljiva, lišajeva, bakterija, algi, ljuske jajeta, pa čak i kravljeg urina [1]. Sinteza nanočestica uz pomoć ekstrakata gljiva važna je biološka metoda sinteze. U usporedbi s npr. bakterijama, poznato je da gljive izlučuju mnogo veće količine bioaktivnih tvari, što ih čini pogodnijima za masovnu proizvodnju [2]. U posljednje vrijeme objavljeni su brojni znanstveni radovi koji se bave sintezom nanočestica uz pomoć ekstrakata različitih vrsta gljiva kao što su npr: *Fusarium acuminatum* [3] i *Penicillium fellutanum* [4], *Trichoderma viride* [5], *Aspergillus fumigatusi* [6], *Rhizopus stolonifer* [7], *Fusarium oxysporum* [8], *Pleurotus ostreatus* [9], *Rhizoctonia solani* [10], *Guignardia mangifera* [11], *Richoderma longibrachiatum* [12], *Penicillium purpurogenum* [13].

Unatoč brojnim radovima, sposobnost gljiva čiji se ekstrakti mogu koristiti u sintezi nanočestica različitih metala još uvijek nije u potpunosti istražena, a detaljan mehanizam nije dobro razjašnjen. Stoga je u postupcima sinteze nanočestica od velike važnosti istražiti mogućnost primjene i drugih vrsta gljiva, bez upotrebe toksičnih kemikalija, okarakterizirati ih i u nastavku istraživanja istražiti njihovo antitumorsko i antibakterijsko djelovanje. Cilj ovog istraživanja je zelena sinteza nanočestica srebra korištenjem ekstrakta gljive *Ophiostoma novo-ulmi*. Uspješnost sinteze i karakterizacija dobivenih nanočestica provedena su metodama UV-Vis spektroskopije (*engl. Ultraviolet-visible spectroscopy*), Infracrvne spektroskopija s

Fourierovom transformacijom, FT-IR (*engl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), transmisijske elektronske mikroskopije i metode rendgenske difrakcije na prahu, PXRD (*engl. Powder x-ray diffraction*).

## **2. LITERATURNI PREGLED**

### **2.1 Nanočestice**

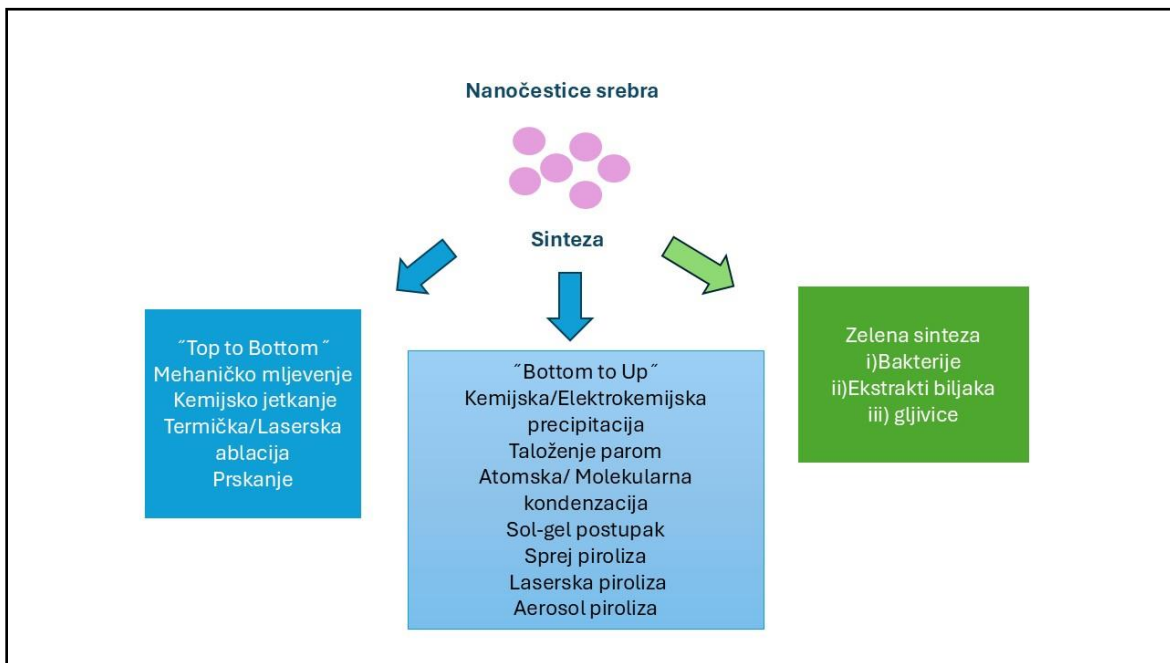
Veličina nanočestice (*engl. nanoparticles, NPs*) kreće se u rasponu od 1 do 100 nm. Svojstva nanočestica određuju njihova veličina, oblik, sastav i struktura [2]. Kako bi se podesila željena svojstva nanočestica moguće je kontrolirati pH vrijednost, temperaturu, omjere, reakcijsko vrijeme, koncentracije itd. [2]. Zanimanje za nanočestice poraslo je u posljednjem desetljeću. Jedan od razloga jest njihova široka primjena, ali i nove ekološki održive metode sinteze samih nanočestica [2]. Nanočestice napravljene od plemenitih metala kao što su zlato i srebro privukle su interes i ulaganja posljednjih godina zbog svojih posebnih bioloških, kemijskih i fizičkih karakteristika [14].

### **2.2. Nanočestice srebra**

U zemljinoj kori srebro je zastupljeno u manjim količinama i zbog toga se uz zlato smatra jednim od najvrjednijih metala. Srebro je još od drevnih vremena imalo široku upotrebu. Svoju primjenu pronašlo prvo u izradi nakita, kovanica i posuđa za vino i vodu. Poslije se počeo koristiti u fotografiji, industriji i medicini [15].

Korišteno je i u razne medicinske svrhe, da bi nakon otkrića antibiotika njegova upotreba naglo pala. U upotrebu se ponovo vraća sredinom 60-tih godina kao sastojak sulfodiazin-srebrove kreme protiv opekline. Krema je širokog spektra djelovanja i pokazala se učinkovitom u liječenju bakterija *Escherichie coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsielle*, *Pseudomonasa*, kao i različitih vrsta virusa i gljivica [16].

Nanočestice srebra mogu se dobiti dvjema glavnim metodama: „Top to Bottom“ i „Bottom to Up“ (Slika 1). U metodi „Top to Bottom“ nanočestice se formiraju iz velikih materijala. Upotrebljavaju se različite fizičke sile (mljevenja i usitnjavanje), električne sile (električno pražnjenje ili laserska ablacija) te termalne sile (isparavanja i kondenzacije) kako bi se takvi materijali smanjili na nano veličinu. U „Bottom to Up“ metodi nanočestice se sintetiziraju kemijskim ili biološkim pristupom gdje se atomi i molekule kontrolirano grupiraju u formu nanomaterijala. Prednost takve metode jesu čestice homogenog sastava bez artefakata u kristalnoj strukturi [17].



**Slika 1.** Metode dobivanja nanočestica srebra

### 2.2.1. Primjena nanočestica srebra

Nanočestice srebra nalaze sve širu primjenu u medicini, pri čemu su njihova antimikrobna i antikancerogena svojstva posebno istaknuta. Veličina nanočestica, oblik

nanočestica, njihova koncentracija i prisutnost drugih tvari samo su neki od čimbenika koji mogu utjecati na antimikrobnu i antikancerogenu učinkovitost nanočestica srebra. Nanočestice srebra mogu inhibirati ili u potpunosti zaustaviti rast mikroorganizama poput bakterija, virusa i gljivica. Postoje nekoliko ključnih mehanizama kojima se odvija antimikrobno djelovanje nanočestice srebra, a to su: generiranje slobodnih radikala, oštećenje DNA, sposobnost pojačavanja učinka drugih lijekova, itd.

S druge strane, antikancerogeni učinci nanočestica srebra su složeniji. Nanočestice srebra mogu uzrokovati smrt stanica raka (apoptozu i nekrozu), spriječiti njihovu invaziju i migraciju, te blokirati formiranje novih krvnih žila koje su potrebne za rast tumora [18].

Nanočestice srebra se također mogu koristiti kao aditiv ili pomoćna tvar u koštanim strukturama, dentalnim materijalima i cjepivima. Istražuju se i antidijabetički učinci nanočestica srebra. Osim impresivnih antimikrobnih i antikancerogenih djelovanja, jedinstvena optička svojstva nanočestica srebra čine ih izvrsnim za primjenu u području biosenzora [18]. Rad na razvoju novih ekološki prihvatljivih, jeftinijih i bržih metoda u sintezi nanočestica različitih metala zasigurno je jedan od prioriteta, a krajnji cilj je istraživanje njihove primjene u medicini, kao antitumorskih i antibakterijskih sredstava [19].

### **2.3. Zelena sinteza nanočestica**

Do danas su za sintezu razvijene brojne fizičke i kemijske (tradicionalne) metode. Toksične kemikalije koje se koriste u takvim metodama izazvale su zabrinutost. Zbog toga je bilo nužno razviti zelenu metodu koja omogućuje proizvodnju nanočestica bez upotrebe opasnih tvari koje bi mogle štetiti ljudskom zdravlju i okolišu [2]. Osim što su dosadašnje (tradicionalne) sinteze nanočestica štetne za ljudsko zdravlje i okoliš, sama sinteza nije ekonomična jer zahtjeva skupe kemijske reagense [10].

Biljke čine iznimno pogodan izvorni materijal za proizvodnju nanočestica. Zbog svoje otpornosti na toksične metale, biljke pružaju ekološki prihvatljiviju alternativu [19]. Biljni ekstrakti se koriste u proizvodnji nanomaterijala postupcima zelene sinteze pri čemu kao reducensi  $Ag^+$  iona služe aminokiseline, polisaharidi, proteini, polifenoli, vitamini i druge tvari

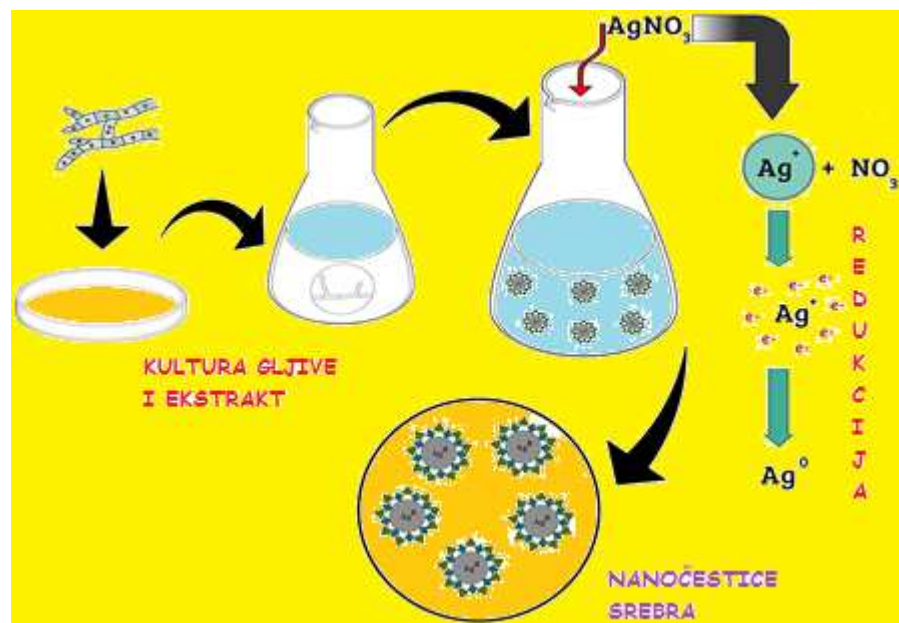
prisutne u ekstraktima. Ovakvi biološki pristupi su učinkoviti, jeftini i ekološki prihvatljivi. Korištenje ekološki prihvatljivih materijala kao što su biljni ekstrakti (listova, pupoljaka, kore, sjemenki, stabljika itd.) i mikroorganizama (kao što su alge, kvasci, bakterije i gljive) zbog svoje netoksičnosti, odnosno ekološke prihvatljivosti ima brojne prednosti u odnosu na druge metode [20].

### **2.3.1 Zelena sinteza posredovana gljivama**

Biljke i mikroorganizmi (kao što su gljive, alge, kvasci i bakterije) smatraju se vrijednim izvorima za sintezu nanočestice srebra [19]. Gljive imaju sposobnost proizvodnje različitih kemijskih spojeva. Ekstrakti ovih organizama često se koriste kao redukcijska i stabilizacijska sredstva ponajviše zbog svoje tolerancije na teške metale te sposobnosti internalizacije i bioakumulacije metala. Nadalje, gljive se lako mogu uzgajati u velikim razmjerima pri čemu je moguće sintetizirati nanočestice kontrolirane veličine i morfologije.

Mehanizam zelene sinteze nanočestica pomoću gljiva (*Slika 2*) može biti unutarstanični ili izvanstanični. U slučaju unutarstanične sinteze, metalni prekursor se dodaje micelijskoj kulturi i internalizira u biomasi. Nakon sinteze potrebno je izdvojiti nanočestice, što se postiže kemijskom obradom, centrifugiranjem i filtracijom. U izvanstaničnoj sintezi, metalni prekursor se dodaje vodenom filtratu koji sadrži samo gljivične biomolekule, što dovodi do stvaranja slobodnih nanočestica. Ova posljednja metoda je najšire korištena jer nisu potrebni postupci za oslobađanje nanočestica iz stanica. Dobivene nanočestice dodatno se pročišavaju kako bi se uklonili gljivični ostaci i nečistoće, pri čemu se koriste metode jednostavne filtracije, membranske filtracije, gel filtracije, dijalize i metoda ultracentrifugiranja.

Međutim, specifični mehanizmi koji su uključeni u taj proces još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Poznato je da se izvanstanična sinteza nanočestica odvija prema reakcijama u kojima enzimi prisutni u gljivičnom filtratu djeluju na redukciju srebrnih iona, stvarajući elementarno srebro ( $\text{Ag}^0$ ) na nanometarskoj skali [21] [22].



Slika 2. Postupak sinteze nanočestica srebra

#### 2.4. Vrsta *Ophiostoma novo-ulmi*

Vrsta *O. novo-ulmi* Brasier izazvala je drugu pandemiju holandske bolesti brijesta te je znatno agresivniji patogen u usporedbi s vrstom *O. ulmi* (Buism.) Nannf. koja je uzrokovala prvu pandemiju ove bolesti. Vrsta *O. novo-ulmi* formalno je opisana 1991. godine, a pojavljuje se u formi dvije podvrste: *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* i *O. novo-ulmi* subsp. *americana*. Podvrsta *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* prvi puta se pojavila u Ukrajni na području Crnog mora, a nakon toga počela se širiti u zapadnoj Europi. Podvrsta *O. novo-ulmi* subsp. *americana* pojavila se prvi puta u Sjevernoj Americi na području Velikih jezera, a nakon toga se proširila cijelom Amerikom i Kanadom. Kasnije se širila putem zaraženih brijestova iz Ontaria u Veliku Britaniju, odakle se zatim proširila na sve ostale dijelove Europe [23].

### 2.4.1 Morfologija

*Ophiostoma novo-ulmi* stvara bijeli ili blago pigmentiran micelij (mrežu hifa) koji se može razviti unutar tkiva stabla. Hife se granaju i omogućuju gljivi da prodire i širi se kroz provodni sustav stabla. Gljiva proizvodi dvije glavne vrste spora: konidije i askospore. Kondije su aseksualne spore i najvažnije su za širenje bolesti pomoću vektora potkornjaka. Askospore su seksualne i nastaju unutar struktura zvanih askusi. Spolno razmnožavanje važno je za genetičku raznolikost patogena, ali su askospore obično manje važne za širenje bolesti u usporedbi s konidijama. Osim višestaničnog nitastog rasta, ova vrsta može rasti i u jednostaničnoj formi [24].

### 2.4.2. Stanište

*Ophiostoma novo-ulmi* primarno naseljava brijestove, gdje se širi kroz provodni sustav stabla, posebno kroz ksilem, uzrokujući začepljenje provodnih tkiva i smrt stabla. Gljiva također može preživjeti u zaraženim trupcima, granama i ostacima drva te se širi transportom zaraženog drva. Prijenos se može odvijati putem korijenskih veza između stabala, kao i pomoću kornjaša (posebno vrsta iz roda *Scolytus*), koji služe kao vektori gljive i prenose je s jednog stabla na drugo. Zbog ovih specifičnih staništa, *O. novo-ulmi* se širi u područjima gdje su brijestovi rasprostranjeni, posebice u Europi, Sjevernoj Americi i dijelovima Azije, gdje su prisutni osjetljivi brijestovi koji su pogodni za razvoj te gljive [25]

### 3. EKSPRIMENTALNI DIO

#### 3.1 Materijali i metode

##### 3.1.1. Prikupljanje uzorka

Korišten izolat gljive *O. novo-ulmi* izoliran je iz zaraženog stabla brijesta veza (*Ulmus laevis*) s područja Kopačkog rita te održavan u čistoj kulturi na Odjelu za biologiju na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

##### 3.1.2. Uzgoj gljive *Ophiostoma novo-ulmi* na krutoj MEA podlozi

Gljiva *O. novo-ulmi* uzgajana je na krutoj MEA (*eng. malt extract agar*) podlozi koja je pružila optimalne uvjete za rast i precjepljivana na nove MEA podloge svaka dva do tri tjedna. Podloga je pripravljena prema uputama proizvođača, sterilizirana autoklaviranjem i izljevana u Petrijeve zdjelice (*Slika 3*). Nakon hlađenja na podloge je precijepljen komadić stare podloge s već proraslim micelijem. Za potrebe primjene micelija u sintezi nanočestica srebra, na hranjivu podlogu postavljen je sterilni celofan koji omogućava neometan rast gljive u isto vrijeme osiguravajući mogućnost odvajanja micelija od podloge nakon prorastanja. Na takvoj podlozi izolat *O. novo-ulmi* prorastao je deset dana u mraku pri 22 °C, nakon čega je sterilnim nožićem sastrugan s celofana.



**Slika 3.** Uzgoj izolata *Ophiostoma novo-ulmi* na krutoj MEA hranjivoj podlozi



### 3.1.3. Ekstracija

Ekstrakt gljive *O. novo-ulmiprired*en je na način da je 23,7 g gljive pomiješano s 50 ml demineralizirane vode u čaši od 200 ml. Sadržaj je ostavljen 10 dana u mraku na sobnoj temperaturi nakon čega je profiltriran dva puta uz pomoć filter papira Whatman No.1.

### 3.1.4. Sinteza nanočestica

20 ml dobivenog filtrata pomiješano je s 20 ml 5 mM AgNO<sub>3</sub> u omjeru 1:1 nakon čega je smjesa zagrijavana dvije minute na 70 C°, a pH je korigiran s početnog 7,3 na 9. Nakon stvaranja nanočestica, smjesa je centrifugirana 45 minuta pri 6000 rpm. Nastale nanočestice osušene su stajanjem na zraku u trajanju od 7 dana (*Slika 4*). Uspješnost sinteze i karakterizacija nanočestica srebra provedena je pomoću UV-Vis, FT-IR i PXDR.



*Slika 4.* Sintetizirane nanočestice srebra

### 3.1.5. Obrada podataka

Podatci su obrađeni u programima Excel i Statistica Tibco 14.0.0.15.

### 3.1.6. UV-Vis spektroskopija

Među različitim tehnikama za karakterizaciju nano-materijala, UV-Vis spektroskopija je najjednostavnija, najbrža, najosjetljivija, selektivna i pouzdana tehnika za karakterizaciju različitih vrsta sintetiziranih nano-materijala i praćenje interakcija i stabilnosti. Karakterizacija koloidnih suspenzija pomoću UV-Vis spektroskopije ne zahtijeva kalibraciju, a temelji se na apsorpciji, refleksiji i prijenosu fotona kroz uzorke poput tekućina te prozirnih ili neprozirnih čvrstih tvari u UV-vidljivom području. Koristi fotone svjetlosti između UV (200–400 nm) i vidljivog (400–800 nm) dijela elektromagnetskog spektra. U ovom dijelu elektromagnetskog spektra, atomi i molekule prolaze kroz elektronske prijelaze. Apsorpcijska spektroskopija uključuje mjerenje apsorpcije elektromagnetskog zračenja u funkciji valne duljine ili frekvencije. Temelji se na mjerenju svjetlosnog snopa koji prolazi kroz uzorak. Apsorpcijski spektar uzorka karakterističan je za boju u vidljivom dijelu spektra. Princip UV-Vis spektroskopije temelji se na Beer-Lambertovom zakonu (1). Prema ovom zakonu, apsorpcija svjetlosti izravno ovisi o koncentraciji uzorka i duljini puta svjetlosti kroz otopinu.

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon bc \quad (1)$$

Gdje je : A – apsorbancija na određenoj valnoj duljini svjetlosti

$I_0/I$  – omjer intenziteta upadnog i propuštenog zračenja svjetlosti

$\epsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent, specifičan za svaku kemijsku vrstu

b – duljina puta svjetlosti kroz uzorak

c – koncentracija tvari u otopini [26].

Za snimanje je korišten SHIMADZU UV-1900 UV-VIS spektrofotometar (*Slika 5*).



**Slika 5.** SHIMADZU UV-1900 UV-Vis spektrofotometar

### 3.1.7. FT-IR spektroskopija

FT-IR (*engl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) analiza koristi se za identifikaciju organskih, anorganskih i polimernih materijala. Promjene u karakterističnom obrascu apsorpcijskih vrpca jasno ukazuju na promjenu u sastavu materijala. FTIR je koristan za identifikaciju i karakterizaciju nepoznatih materijala, otkrivanje nečistoća u materijalu, pronalaženje aditiva kao i za identifikaciju razgradnje i oksidacije.

Tipični FT-IR spektrometar uključuje izvor, ćeliju za uzorak, detektor, pojačalo, A/D pretvarač i računalo. Zračenje iz izvora dolazi do detektora nakon što prođe kroz interferometar. Signal se pojačava i pretvara u digitalni signal pomoću A/D pretvarača i pojačala, nakon čega se signal prenosi na računalo gdje se provodi Fourierova transformacija.

Infracrveno zračenje u rasponu od oko  $10.000\text{--}100\text{ cm}^{-1}$  prolazi kroz uzorak, pri čemu se dio zračenja apsorbira, a dio prolazi kroz uzorak. Apsorbirano zračenje uzorak pretvara u vibracijsku ili rotacijsku energiju. Spektar je obično u rasponu od  $4000$  do  $400\text{ cm}^{-1}$ . Svaka molekula ima jedinstven otisak prsta, što čini FT-IR neizostavnom metodom za identifikaciju kemijskih vrsta [27].

Za snimanje IR spektra priređenih uzoraka korišten je FT-IR-8400S SHIMADZU spektrofotometar (*Slika 6*).



*Slika 6.* FT-IR-8400S SHIMADZU spektrofotometar

### 3.1.8. Rendgenska difrakcija na prahu

PXRD (*eng. Powder X-ray Diffraction*) metoda je vrlo korisna tehnika za karakterizaciju nanočestica. Ova metoda omogućuje dobivanje informacija o kristalnoj strukturi, veličini kristalita, stupnju kristalnosti, te identificiranje faza prisutnih u uzorku nanočestica.

Rendgenske zrake su elektromagnetsko zračenje kratke valne duljine. Kada se električki nabijene čestice s dovoljnom energijom usporavaju, proizvode se rendgenske zrake. Visoki napon održava se između elektroda, privlačeći elektrone prema metalnoj meti. Na mjestu udara stvaraju se rendgenske zrake koje se zrače u svim smjerovima, a potom se kolimiraju i usmjeravaju na

uzorak, koji je u obliku fino mljevenog praha. Rendgenske zrake detektira detektor, a signali se obrađuju mikroprocesorom ili elektronički.

Skener rendgenskih zraka ili spektrograf dobiva se variranjem kuta između izvora, uzorka i detektora. Raspršenje se događa kada rendgenska zraka udari u kristalnu rešetku. Maksimalno raspršenje eliminira se zbog destruktivne interferencije, dok se difrakcija događa kada se raspršenje uskladi s raspršenjima s druge ravnine. Ovdje dolazi do konstruktivne interferencije jer se refleksije kombiniraju u nove valne fronte. Svaki kristalni materijal ima jedinstvenu atomsku strukturu i time difraktira rendgenske zrake u jedinstvenom uzorku. Braggova jednadžba (2) koristi se za mjerenje kuta difrakcije

$$n \lambda = 2d \sin \theta \quad (2)$$

gdje "d" označava razmak između ravnina, " $\theta$ " označava kut upada, "n" označava cijeli broj, a " $\lambda$ " označava valnu duljinu zrake [27].

Uređaj korišten za snimanje difraktograma je AERIS PANalytical X-ray difraktometar (*Slika 7*).



**Slika 7.** AERIS PANalytical X-ray difraktometar

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. UV-Vis

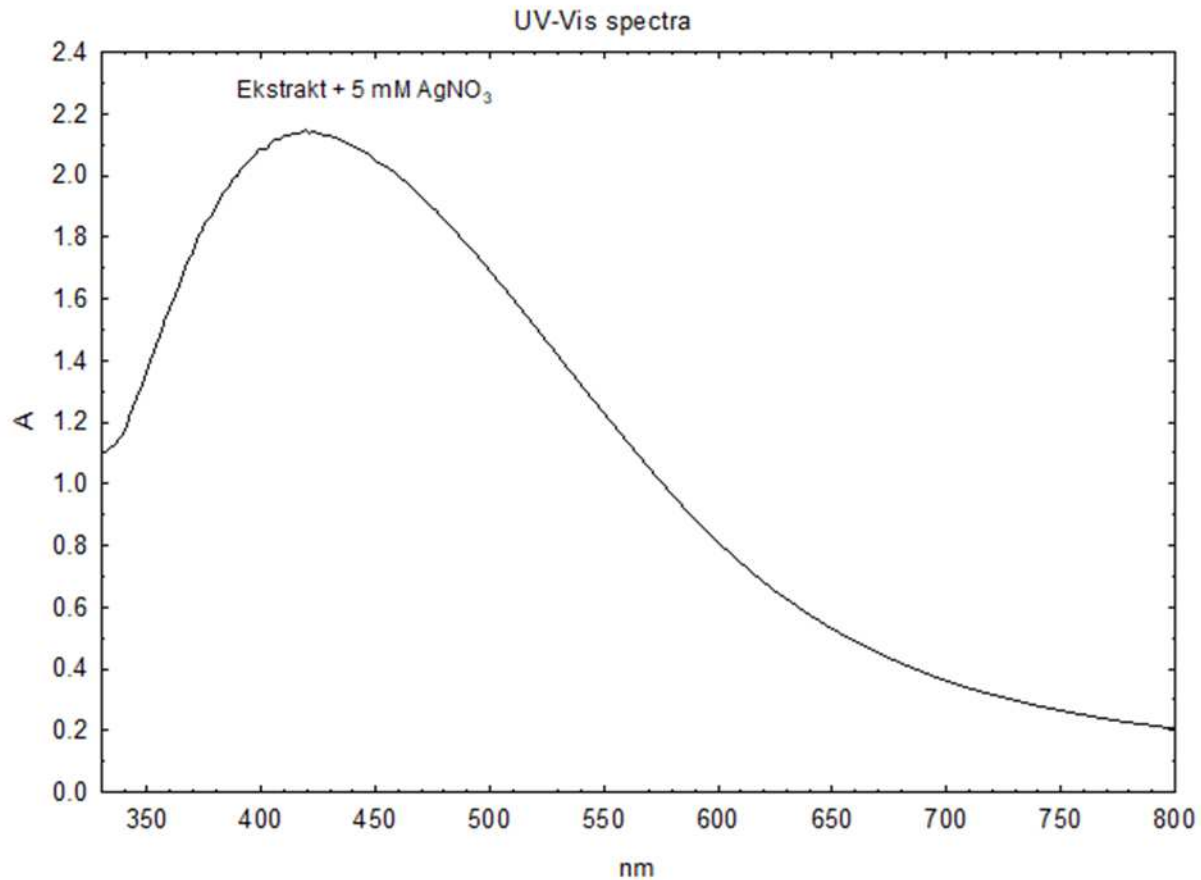
U ovome istraživanju nanočestice srebra su sintetizirane uz pomoć vodene otopine  $\text{AgNO}_3$  i vodenog ekstrakta kulture gljive *O. novo-ulmi*. pri temperaturi od  $70\text{ }^\circ\text{C}$ .

Opće je poznato da je stvaranje nanočestica srebra popraćeno pojavom smeđeg obojenja otopine, zbog efekta površinske plazmonske rezonancije (SPR) i redukcije  $\text{AgNO}_3$  [29]. Uspješnost sinteze potvrđena je vizualno i metodom UV-Vis spektroskopije. Nakon dodatka vodene otopine  $\text{AgNO}_3$ , vodeni ekstrakt *O. novo-ulmi* promijenio je boju iz svijetložute u smeđu boju u roku od nekoliko sati. Budući da do promjene boje nije došlo u vodenom ekstraktu kulture *O. novo-ulmi* u koji nije dodan  $\text{AgNO}_3$ , promjena boje otopine jasno je ukazala na stvaranje nanočestica srebra (*Slika 8*).



**Slika 8.** Ekstrakt gljive *Ophiostoma novo-ulmi*, (ekstrakt i  $\text{AgNO}_3$  nakon 8 sati i ekstrakt i  $\text{AgNO}_3$  nakon 14 sati (s lijeva na desno))

Početa karakterizacija biosinteze srebrnih nanočestica provedena je pomoću UV-Vis spektrofotometrije. Apsorbancija je mjerena u rasponu od 330–800 nm. Karakteristični vrh u rasponu od 400–450 nm pokazatelj je stvaranja srebrnih nanočestica. Vrijednost  $\lambda_{\max}$  zabilježena je na 427 nm, što je bilo moguće pripisati fenomenu SPR (*engl. Surface Plasmon Resonance*), odnosno pojavi površinske plazmonske rezonancije [25]. Uzorak je praćen kroz dulji vremenski period, ali nisu zabilježene veće promjene pomaka maksimuma UV-Vis spektara (*Slika 9*).

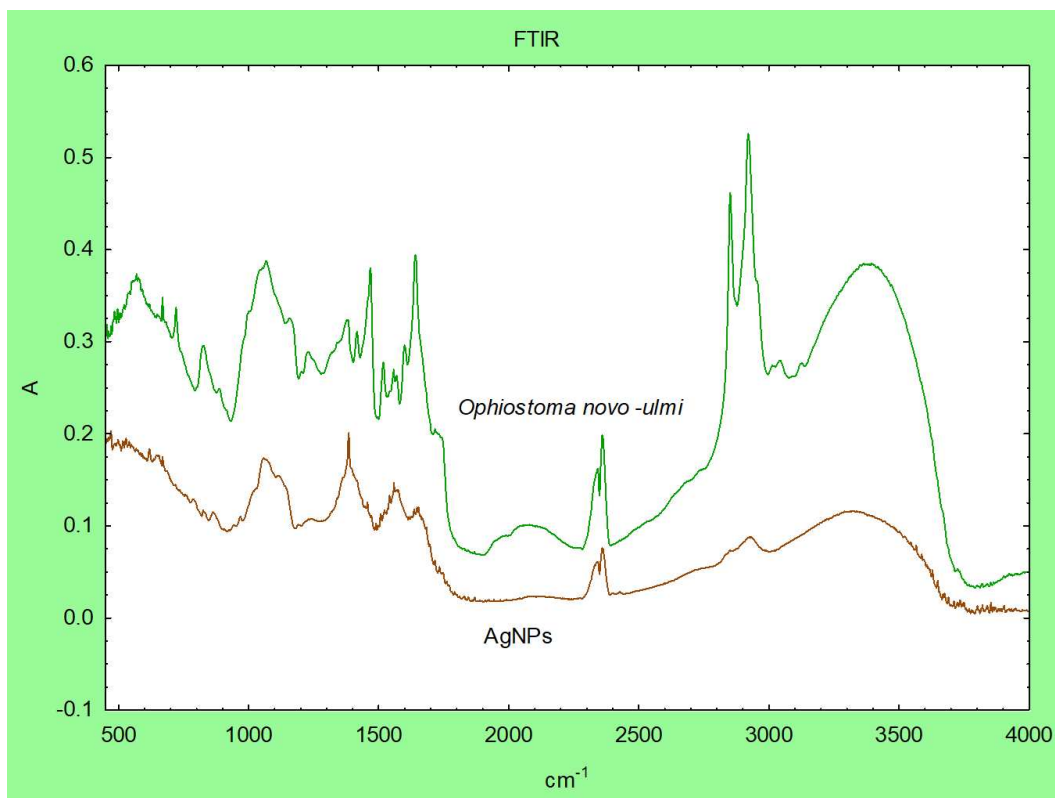


**Slika 9.** UV-Vis spektroskopija

Poznato je da brojni faktori (temperatura, reakcijsko vrijeme, pH, omjer AgNO<sub>3</sub> i ekstrakta, koncentracija AgNO<sub>3</sub>, brzina i vrijeme miješanja) mogu imati utjecaj na veličinu nanočestica. Prethodnim je istraživanjima utvrđeno da manje i stabilnije nanočestice nastaju pri pH vrijednostima koje se kreću u rasponu od pH=8 do pH=9 [29]. Nanočestice srebra mogu agregirati ukoliko ne postoje jake elektrostatske sile koje bi ih mogle držati odvojenim. Zbog više pH vrijednosti, slobodne organske skupine s površine nanočestica imaju veći stupanj

deprotonacije, uslijed čega se povećava negativni naboj i raste elektrostatsko odbijanje među česticama [29]. Budući da su preliminarna mjerenja pokazala da na pomak maksimuma utječe pH vrijednost otopine tj. da se pri izvornoj pH vrijednosti maksimum vrpce nalazi pri većim vrijednostima, u ovom je radu za sintezu nanočestica srebra odabrana vrijednost pH= 9 .

FT-IR spektri vodenog ekstrakta *O. novo-ulmi* i sintetiziranih srebrnih nanočestica (AgNPs, eng. *silver nanoparticles*) prikazani su na *Slici 10*.



**Slika 10.** FT-IR spektar ekstrakta *Ophiostoma novo-ulmi* i nanočestica srebra (AgNPs)

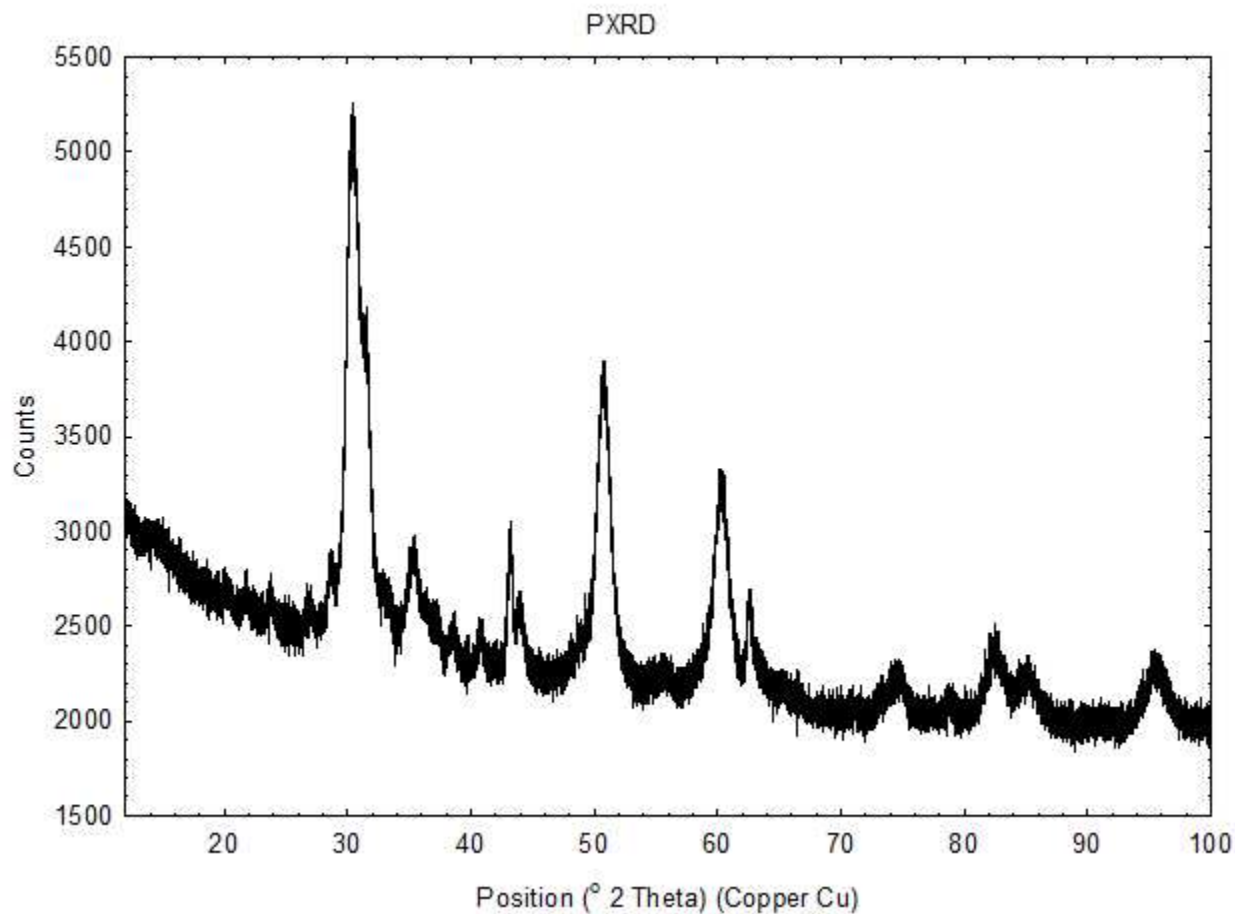


FT-IR spektri vodenog ekstrakta *O. novo-ulmi* i nanočestica srebra poslužili su za identifikaciju funkcionalnih skupina vodenog ekstrakta *O. novo-ulmi* odgovornih za redukciju  $\text{AgNO}_3$ .

Općenito, FT-IR spektri ekstrakta *O. novo-ulmi* (Slika 10) otkrivaju prisutnost apsorpcijskih vrhova smještenih na oko  $3300\text{ cm}^{-1}$ ,  $2932\text{ cm}^{-1}$ ,  $2853\text{ cm}^{-1}$ ,  $1654\text{ cm}^{-1}$  i  $858\text{ cm}^{-1}$ . Vrpce pri  $2932\text{ cm}^{-1}$  i  $2853\text{ cm}^{-1}$  karakteristične su za C-H rastezanje u alkilnim skupinama, kao što su metil ( $-\text{CH}_3$ ) i metilen ( $-\text{CH}_2$ ) skupine. Obično se vrpca pri oko  $2932\text{ cm}^{-1}$  pripisuje antisimetričnom rastezanju C-H veza, dok se vrpca pri oko  $2853\text{ cm}^{-1}$  pripisuje simetričnom rastezanju. Vrpca smještena na  $1654\text{ cm}^{-1}$  može biti povezana s rastezanjem C=O veze u amidima (tipično za peptide veze u proteinima) ili može ukazivati na prisutnost C=C veze u alkenima. U slučaju proteina, ovo bi mogla biti tzv. amidna I vrpca, koja je karakteristična za proteinske strukture. Vrpca na  $858\text{ cm}^{-1}$  pri ovom valnom broju često se povezuje s deformacijama C-H veza izvan ravnine u aromatskim prstenima. Nakon nastanka nanočestica srebra dolazi do pomaka ili smanjenja intenziteta nekih vrpca, što je najviše izraženo u dijelovima spektra pri  $2932\text{ cm}^{-1}$  i  $2853\text{ cm}^{-1}$ , kao i u cijelom području „otiska prsta“ (eng. *fingerprint region*) koji se nalazi u području od približno  $700$  do  $1500\text{ cm}^{-1}$  i prema kojemu je s obzirom na velik broj maksimuma bilo moguće uspoređivati spektre ekstrakta i nanočestica srebra..

Rezultati FT-IR analize ukazali su na prisutnost različitih bio-molekula u vodenom ekstraktu (proteini, lipidi i ugljikohidrati), koji mogu igrati ključnu ulogu u biosintezi i stabilizaciji nanočestica srebra.

Difraktogram uzorka sintetiziranih srebrenih nanočestica prikazan je na *Slici 11*.



*Slika 11.* Difraktogram sintetiziranog uzorka nanočestica srebra.

Na difraktogramu sintetiziranih nanočestica vidljiva je kristalna struktura i nekoliko karakterističnih glavnih signala pri  $2\theta$  vrijednostima od  $31.8^\circ$ ,  $45.5^\circ$ ,  $51.6^\circ$ ,  $61^\circ$  i  $75.25^\circ$  i indeksirani su kao (113), (124), (240), (226), te (300) kristalografske ravnine plošno centrirane kubične rešetke (fcc) srebra (*Slika 11*). Pojavu dodatnih slabije izraženih pikova moguće je pripisati ostacima organske tvari prisutne u ekstraktu, odnosno biomolekulama prisutnim u ekstraktu koje su tijekom sinteze učestvovala u redukciji i stabilizaciji nanočestica srebra.

Pomoću Scherrer-ove jednadžbe (3) određena je prosječna veličina kristalita koja je iznosila 30 nm.

$$L = \frac{K\lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad (3)$$

Gdje je :

L-veličina kristalita izražena u nm

K-faktor oblika

$\lambda$ -valna duljina

$\beta$ -širina na pola visine vrha, vrijednost se očitava iz difraktograma

$\theta$ -kut čija se vrijednost očitava iz difraktograma

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom je radu prikazana je po prvi puta, zelena, ekološki prihvatljiva i uspješna sinteza nanočestica srebra iz vodenog ekstrakta gljive *Ophiostoma novo-ulmi* kao reducirajućeg i stabilizirajućeg sredstva. Pored toga što je jeftina i brza za izvođenje, prednost ovakve sinteze ogledala se i u tome što tijekom postupka nije bilo potrebe za uporabom bilo kakvih stabilizatora ili toksičnih kemikalija. Daljnji eksperimenti vezani uz sintetizirane nanočestice bavit će istraživanjima antibakterijskih i antitumorskih svojstava.

## 6. LITERATURA

1. K. A. Altammar. A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14.
2. G. Li, D. He, Y. Qian, B. Guan, S. Gao, Y. Cui, K. Yokoyama, and L. Wang, Fungus-Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus terreus*. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13(1), 466-476. In: *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14.
3. A. Ingle, A. Gade, S. Pierrat, C. Sonnichsen, and M. Rai, Mycosynthesis of Silver Nanoparticles Using the Fungus *Fusarium acuminatum* and Its Activity Against Some Human Pathogenic Bacteria. *Curr. Nanosci.* 2008, 4, 141–144.
4. K. Kathiresan, S. Manivannan, M.A. Nabeel, and B. Dhivya, Studies on Silver Nanoparticles Synthesized by a Marine Fungus, *Penicillium fellutanum* Isolated from Coastal Mangrove Sediment. *Colloid Surface B.* 2009, 71, 133–13.
5. M. Fayaz, K. Balaji, M. Girilal, P.T. Kalaichelvan, R. Venkatesan. Mycobased synthesis of silver nanoparticles and their incorporation into sodium alginate films for vegetable and fruit preservation. *J Agric Food Chem.* 2009, 57(14), 6246-6252.
6. A. Shahzad, H. Saeed, M. Iqtedar, S.Z. Hussain, A. Kaleem, R. Abdullah, S. Sharif, S. Naz, F. Saleem, A. Aihetasham, A. Ch. Size Controlled Production of Silver Nanoparticles by *Aspergillus fumigatus*. *J Appl Microbiol.* 2019, 126(2), 453-462.
7. K. AbdelRahim, S.Y. Mahmoud, A.M. Ali, K.S. Almaary, A.E. Mustafa, S.M. Hussein. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. *Saudi J Biol Sci.* 2017, 24(1), 208-216.
8. H. Korbekandi, Z. Ashari, S. Iravani, S. Abbasi. Optimization of Biological Synthesis of Silver Nanoparticles using *Fusarium oxysporum*. *Iran J Pharm Res.* 2013, 12(3), 289-298.
9. K. Bhardwaj, A. Sharma, N. Tejwan, S. Bhardwaj, P. Bhardwaj, E. Nepovimova, A. Shami, A. Kalia, A. Kumar, K.A. Abd-Elsalam, K. Kuča. *Pleurotus* Macrofungi-Assisted Nanoparticle Synthesis and Its Potential Applications: A Review. *J Fungi (Basel).* 2020, 6(4), 351.

10. K. AbdelRahim, S.Y. Mahmoud, A.M. Ali, K.S. Almaary, A.E.Z.M.A. Mustafa, S.M. Husseiny. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. *Saudi J Biol Sci.* 2017, 24(1), 208-216.
11. L.P. Costa Silva, J.P. Oliveira, W.J. Keijok, A.R. Silva, A.R. Aguiar, M.C.C. Guimarães, et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the cell-free filtrate of nematophagous fungus *Duddingtonia flagans*. *Int J Nanomed.* 2017, 12(1), 1871-1884.
12. R.M. Elamawi, R.E. Al-Harbi, A.A. Hendi. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Egypt J Biol Pest Control.* 2018, 28(1), 28.
13. R.R. Nayak, N. Pradhan, D. Behera, K.M. Pradhan, S. Mishra, L.B. Sukla, et al. Green synthesis of silver nanoparticle by *Penicillium purpurogenum* NPMF: the process and optimization. *J Nanopart Res.* 2011, 13(7), 3129-3137.
14. L. Xu, Y.Y. Wang, J. Huang, C.Y. Chen, Z.X. Wang, H. Xie, Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics* 2020, 10(20)
15. Y. Sun and Y. Xia, Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles. *Science* 2002, 298(5601), 2176–2179
16. M. Rai, A. Yadav, A. Gade. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* 2009, 27(1), 76-83
17. I. Ivanišević, Sinteza i karakterizacija nanočestica srebra pogodnih za ispis tintinim pisačem, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2020.
18. A.C. Burdușel, O. Gherasim, A.M. Grumezescu, L. Mogoantă, A. Ficai, E. Andronescu. Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials* (Basel). 2018, 8(9), 681.
19. M. Rizwan, C. Gwenin, Nanomaterials in renewable energy: UV-Visible spectroscopy characterization and applications. In: S. Devasahayam, C.M. Hussain (eds.), *Nano Tools and Devices for Enhanced Renewable Energy*, Elsevier. 2021, Micro and Nano Technologies, Pages 103-120

20. D. Titus, E. James Jebaseelan Samuel, S.M. Roopan. Nanoparticle characterization techniques. In: Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles, 2019, Pages 303-319.
21. V. Balan, C.-T. Mihai, F.-D. Cojocaru, C.-M. Uritu, G. Dodi, D. Botezat, I. Gardikiotis. Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: From Molecular to Clinical Practice. *Materials*.2019, 12, 2884.
22. M. Guilger-Casagrande, R. de Lima, Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019, 7, 287
23. C. M. Brasier, K. W. Buck, Rapid evolutionary changes in a globally invading fungal pathogen (Dutch elm disease). *Biological Invasions*. 2001, 3, 223-233.
24. M. Nigg, L. Bernier, From yeast to hypha: defining transcriptomic signatures of the morphological switch in the dimorphic fungal pathogen *Ophiostoma novo-ulmi*. *BMC Genomics* 2016, 17, 920
25. CABI Compendium.  
<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.37594#sec-24> (14.8.2024.)
26. M. Rizwan, C. Gwenin, Nanomaterials in renewable energy: UV-Visible spectroscopy characterization and applications. In: S. Devasahayam, C.M. Hussain (eds.), *Nano Tools and Devices for Enhanced Renewable Energy*, Elsevier. 2021, Micro and Nano Technologies, Pages 103-120
27. D. Titus, E. James Jebaseelan Samuel, S.M. Roopan. Nanoparticle characterization techniques. In: Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles, 2019, Pages 303-319.
28. A.C. Burduşel, O. Gherasim, A.M. Grumezescu, L. Mogoantă, A. Fikai, E. Andronescu. Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials* (Basel). 2018, 8(9), 681.

29. L. Marciniak, M. Nowak, A. Trojanowska, B. Tylkowski, and R. Jastrzab, "The Effect of pH on the Size of Silver Nanoparticles Obtained in the Reduction Reaction with Citric and Malic Acids," *Materials*, vol. 13, no. 5444, 2020.