

*As a manuscript*

**MARYAM BAYAT**

**BIOSYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NANOPARTICLES AND  
EVALUATING THEIR PROSPECTIVE BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS**

**Specialties**

**4.1.3 Agrochemistry, agrosil science, plant protection and quarantine**

**1.5.6 Biotechnology**

**ABSTRACT**

dissertation for a degree  
candidate of biological sciences

Moscow – 2022

The work was carried out at the Agrarian and Technological institute of the Federal State Autonomous Educational Institution for Higher Education “Peoples Friendship University of Russia” of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

**Scientific supervisor:**

doctor of agricultural sciences, professor,  
RUDN, department of Agrobiotechnology,  
professor

**Astarkhanova Tamara Sarjanovna**

**Official opponents:**

doctor of agricultural sciences,  
leading research fellow,  
All-Russian Research Institute  
of Phytopathology

**Filipchuk Olga Dmitrievna**

candidate of biological sciences,  
head of the testing laboratory of the CINAO  
FGBNU “All-Russian Research Institute of  
Agrochemistry named after D.N. Pryanishnikov”

**Lyubun Elena Valentinovna**

**Lead organization:**

Federal State Budgetary Scientific Institution “Federal Potato Research Center named after A.G. Lorkh”

Defense will take place «30» November 2022 year at 14.00 at a meeting of the dissertation council ПДЦ 2021.002 at FGAOU VO «Peoples Friendship University of Russia» located at: 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 8/2 .

The dissertation can be found in the reading room of the UNIBC (Scientific library) FGAOU VO «Peoples Friendship University of Russia» located at: 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 6.

The abstract was sent «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 y.

Scientific secretary  
of the dissertation council ПДЦ 2021.002  
candidate of agricultural sciences

**Vvedensky Valentin Valentinovich**

## CONCEPT DESCRIPTION OF THE RESEARCH

**The relevance of research.** Cultivation of cereal crops are associated with high risks of bacterial and fungal disease. Infection with different plant pathogens, significantly decreases the quality of cereal crops in agricultural systems. Plant pathogens accumulate in a latent form over several generations, which causes serious crop losses. Since the new and modern strategy such as nanotechnology will promote protecting crops against different plant diseases. Synthesis of metal-based nanoparticles (NPs) mainly mediates by physical or chemical methods. Physical methods need expensive equipment, high energy and large space area allocating for equipment. Chemical methods need costly and toxic chemicals, which may remain in the synthesized NPs and limit their application due to the toxicity of harmful residues. The use of chemicals is environmentally unfriendly and also hazardous for the person who deals with. To mitigate the problem of expensive equipment and toxic chemicals, green methods have been developed rapidly, presenting facile and cost-effective biosynthesis approaches. Plant parts are the most preferred biosystem for this purpose as they contain exclusive phytochemicals which can participate in the reduction process during the biosynthesis of NPs. The rate of NP biosynthesis in plants is higher than in microorganisms; the obtained NPs are more stable and diverse in shape and size. Based on this, we used strawberry leaves as an economical material from agricultural waste to prepare an aqueous extract and use it for green synthesis of various NPs. There are no data in the literature on the use of strawberry leaves in green synthesis of NPs. After the biosynthesis of NPs, we studied their physical and chemical properties. To determine the positive or negative effect of biosynthesized NPs on plants, we chose two crops with a seed type of reproduction: wheat as the most demanded food crop and flax as the main industrial crop. Also, the task of our research was to evaluate the antimicrobial activity of biosynthesized NPs for subsequent use as non-chemical plant protection products in the greening of agricultural production.

**The degree of development of the topic.** Plants are the most preferred source for biosynthesis of NPs because plant parts containing exclusive phytochemicals involve in reduction process of NPs biosynthesis. The rate of the biosynthesis in plant-mediated methods are more than microorganism-oriented one and the produced NPs are more stable and more diverse in shape and size. Plant extracts are widely applied in green synthesis of the metal-based NPs due to its the simplicity, ecofriendly and cost effectiveness for mass production of NPs and taking very less time. These features influence the potential scope and reproducibility of NP production.

After the synthesis of NPs, the chemical composition and crystal structure of the synthesized NPs need to be investigated. Numerous experimental techniques are available to evaluate a variety of physical and chemical characteristics of biosynthesized nanoparticle samples such as size, shape, morphology, crystal structure as well as elemental composition (Agarwal et al., 2013; Murdikudis et al., 2018; Krutyakov et al., 2017; Krutyakov et al., 2022).

**Research goal and tasks.** The objective of the present work was the biosynthesis and characterization of seven NPs based on zinc, magnesium, silver, copper and iron salts, and then evaluating some biotechnological application for the synthesized nanoparticles and using them as the modern approach for protecting plants against different plant pathogens. The objectives of the research included:

1. To research on the use of an agro-waste materials, strawberry leaf, and extract its phytochemicals in water and use it instead of chemicals to develop a safe, cost effective and ecofriendly synthesis method for production of new materials with prospective application in agriculture such as using in plant protection or in fertilizers formulations
2. To develop a method with high production efficiency with no need to use high pressure, energy, temperature and toxic chemicals which could easily scaled up for large scale synthesis for future industrial applications
3. Determine the possibility of synthesizing metal-based NPs based on Zn, Mg, Fe, Cu (micronutrients) and Ag during a green method
4. To characterize biosynthesized NPs using high-tech analytical instruments
5. To evaluate various applications of NPs in increasing growth and sustainability of crops
6. Evaluating antibacterial and antifungal activity of the biosynthesized NPs

**Scientific novelty of the research.** For the first time in my dissertation:

- The effectiveness of metal nanoparticles for their use as antibacterial, antifungal and growth-stimulating agents was studied.
- Bifunctional NPs (as growth regulators and pesticides) are proposed to be used as bactericidal additives to plant protection products.
- Strawberry leaf extracts were used in green NP synthesis (a method for obtaining metal nanoparticles from metal salts using plant extracts as reducing and stabilizing agents).

**Theoretical and practical significance.** Developed and tested a new green method for biosynthesis of metallic nanoparticles which are more biocompatible than chemically synthesized ones and more ecofriendly than physically synthesized nanoparticles. Also, these nanoparticles were tested and investigated for their antimicrobial activities against different pathogens (*Pseudomonas aeruginosa*; *Botrytis cinerea*; *Pilidium concavum* (Desm.) Höhn. and *Pestalotia* sp.) and on seed germination and germination growth of wheat (*triticum aestivum*) and flax (*Linum usitatissimum*).

The results of the research were introduced into the educational process of the agrobiotechnological department of ATI PFUR and can be recommended in the industrial production.

**Basic provisions for defense.**

1. Synthesis of nanoparticles based on Zn, Mg, Fe, Cu (trace elements) and Ag in an environmentally friendly way (green synthesis).
2. Characterization of synthesized NPs
3. Evaluation of the effect of synthesized nanoparticles on various plant pathogens *Pseudomonas aeruginosa*, *Botrytis cinerea*, *Pilidium concavum* (Desm.) Höhn. and *Pestalotia* sp. to solve the problem of resistance to chemical pesticides
4. Evaluation of the effectiveness of biosynthesized nanoparticles on seed germination and seedling growth of wheat (*triticum aestivum*) and flax (*Linum usitatissimum*).

**Thesis approbation.**

The results were reported at:

- International conference of young scientists in PFUR ‘Innovative processes in Agrarian Industry’ in 2018 year.

**Publication of research results.** Based on the results of the dissertation research, 10 papers were published, including 5 articles in scientific journals indexed in the Web of Science and Scopus databases, 3 articles in peer-reviewed scientific journals included in the list of VAC, and 2 abstracts of conferences.

**Personal contribution of the author.** The applicant participated in setting the goal and objectives of the study, collected and analyzed the material obtained, processed and interpreted the data, and also prepared publications in co-authorship.

**Structure and volume of thesis.** The PhD thesis consist of 160 pages in computer text, contains 22 tables, 83 figures. Thesis compounds are introduction, literature review, materials and methods, results and discussion, conclusion, and recommendations. References consist of 124 authors.

## **THE CONTENT OF THE WORK**

**Introduction.** The relevance and scientific novelty of the study are substantiated, the goal and objectives are formulated, as well as the provisions submitted for defense.

### **Chapter 1. Literature Review**

This chapter discusses the biosynthesis and characterization of seven NPs based on zinc, magnesium, silver, copper and iron salts, evaluates the biotechnological application of the synthesized nanoparticles and their use as a modern approach to plant protection against various plant pathogens; as well as their effectiveness on seed germination and seedling growth of wheat and flax.

### **Chapter 2. Materials and methods**

**Extract preparation.** To prepare a plant extract, 20 g of leaf powder was mixed with 200 ml of distilled water in a flask, boiled and stirred for 1 hour. The mixture was cooled at room temperature, then filtered with a cloth filter and centrifuged for 20 minutes at 10,000 rpm. The supernatant was filtered through a paper filter to remove all solids.

**Biosynthesis of Nanoparticles.** Nanoparticles are by mixing specific amount of extract and 0.01M salt solution. In some cases, the synthesis was in alkaline pH and followed by calcination.

**Characterization of Biosynthesized NPs.** After the successful biosynthesis of NPs, their physical and chemical properties were studied using various characterization methods. First of all, the formation of NPs is confirmed by UV-Vis spectroscopy. After that, the size, shape, morphology, heterogeneity and agglomeration of the nanoparticles were studied by FESEM (transmission emission scanning electron microscopy). FESEM was followed by EDS (Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy) to obtain information on the chemical composition of the biosynthesized NPs, which gave us some data on the chemical composition of the NPs. Photon cross-correlation spectroscopy (PCCS) has been used to measure the hydrodynamic size, size distribution, and detection of nanoparticle agglomerates in an aqueous environment. The FT-IR method (Fourier transform infrared spectroscopy) was used to recognize functional organic groups, inorganic residues, and biomolecule residues along with the formation of NPs that can get

through the reducing agent to the surface of synthesized NPs formed during the interaction of NPs with coating agents. The synthesized NPs were subjected to X-ray diffraction (X-Ray) studies to confirm the presence of NPs, to obtain crystallinity or amorphous nature and to detect possible impurities, and to calculate the average size of NP crystallites (Table 1).

**Table 1.** Summary of the applied techniques for nanoparticle characterization featured in this paper.

Technique	Main information derived
XRD (group: X-ray based techniques)	Crystal structure, composition, crystalline grain size
FT-IR	Surface composition, ligand binding
UV-Vis	Optical properties, size, concentration, agglomeration state, hints on NP shape
FESEM-EDS	Morphology, dispersion of NPs in cells and other matrices/supports, precision, elemental analysis
PCCS	Hydrodynamic size, size distribution, detection of agglomerates

**In vitro evaluation of antibacterial activity of biosynthesized nanoparticles.** The method of broth dilution applied for evaluation of antibacterial activity of NPs against bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. The bacteria were cultured for 24 h in the LB medium and then used for the tests. 10µl of this solution and different amounts of NPs added to the test tubes containing 2 mL of LB medium and incubated for 24 h at room temperature (three replicates). Bacterial medium with no NPs was considered as control. The volume of 10µl from the test tube were put in LB agar petri dishes, swabbed by L-shape rod and incubated for 24 h. Then followed by culturing on petri dishes. The antibacterial activity and effective concentrations for each NP was studied by counting the number of grown colonies.

**In vitro evaluation of antifungal activity of biosynthesized nanoparticles.** *Botrytis cinerea*., *Pilidium concavum* (Desm.) Höhn. and *Pestalotia sp.* were used in this study. Two methods were applied to study antifungal properties of NPs:

(I) Agar dilution method applied using oatmeal agar medium. The strains of *B. cinerea*, *P. concavum* and *Pestalotia sp.* were used in this experiment. Diameter of each colony measured every three days.

(II) To determine the ability of *B. cinerea* spore's germination oatmeal agar medium was used with the addition of different concentrations of silver nanoparticles.

The spores with the final concentration of 4.3 spore per  $\mu\text{l}$  placed on agar culture containing different amounts of the Ag NPs of 0 (as control) 1, 10, and 100ppm. The plates were incubated at laboratory conditions and the presence of growth was observed. The number of the colonies is reported after observation of visible growth. To obtain reliable results, the experiment was carried out in triplicate.

#### **Effect of NPs on seed germination and seedling growth of crop plants**

**Preparation of priming solutions.** Different concentrations (50, 100, 150 ppm) of NPs (C-ZnO, NC-ZnO, Zn, MgO, Ag, Cu and Fe) and also their counterpart metal salts (Zn  $(\text{CH}_2\text{COO})_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$  and  $\text{FeCl}_3$ ) prepared in distilled water and the NPs dispersed by ultrasonic vibrations for 20 minutes.

**Preparation of seeds:** Seeds of wheat (*Triticum aestivum L.*) variety Firuza 40 and flax (*Linum usitatissimum*) variety Semi Lini were used in this experiment. Each treatment consisted of 30 randomly selected seeds with three replications.

Then seeds soaked in a prepared NPs suspensions or metal salt solutions for approximately 12 hours. A set of seeds was soaked in distilled water without providing any treatment as a control.

**In vitro germination of seeds:** One piece of filter paper placed into a Petri plate (10 cm in diameter) and 5 ml distilled water added. Then 30 seeds were transferred onto each the filter paper and incubated at room temperature in Petri plates.

**Measurement of physiological indexes:** Germination percentages, shoot length, root length, seedlings length, root-shoot ratio, seedling vigor index (SVI), shoot length stress tolerance index (SLSI) and root length stress tolerance index (RLSI) were calculated at 2nd and 7th days for 10 randomly selected seeds. Means and standard deviations were derived from measurements on three replicates for each treatment and the related controls.



### Chapter 3. Results and discussion

**Biosynthesis of NPs.** In this investigation, for the first time, the biosynthesis of NPs was carried out based on silver, copper, iron, zinc and magnesium salts employing an environmentally benign synthetic strategy, using strawberry leaf extract. Strawberry leaf extract contains minerals and biomolecules responsible for the biochemical reactions wherein biological molecules react with the metallic precursors leading to formation of the NPs.

#### **Characterization of Biosynthesized NPs *UV-Visible Absorption Spectroscopy***

**Extract.** The UV-Vis spectrum of aqueous extract of strawberry leaf shows peak maximum at 250 nm due to the  $\pi/\pi^*$  transitions strongly confirming the presence of aromatic compounds inside the plant extract.

**C-ZnO.** The UV-Vis spectra of C-ZnO NPs indicated an absorption band at 355 nm.

**NC-ZnO.** The spectra exhibited a strong absorption band at 345 nm presented in which is due to the surface plasmon resonance.

**Zn.** There are two peaks of UV-Vis spectrum in the range of 200–800 nm. The peak maximum was observed at 270 nm, which is attributed to the Zn NPs.

**MgO.** Various peaks were observed under UV region, at about 200 to 300 nm.

**Ag.** The UV-Vis measurements showed that the Ag NPs exhibit one peak in the UV-Vis region centered at 457 nm.

**Cu.** The UV-Vis absorption spectra of Cu NPs showed an absorption band of around 270 to 370 nm. The Cu NPs exhibit a dark brown color in aqueous solution due to the SPR excitation in UV-Vis spectrum depending upon the particle size.

**Fe.** The UV-Vis spectra of Fe NPs showed prominent absorbance maximum at 270 nm and another low intense peak at 318nm, thereby confirming the production of Fe nanoparticles. These peaks were due to the excitation of SPR vibrations in the Fe NPs.

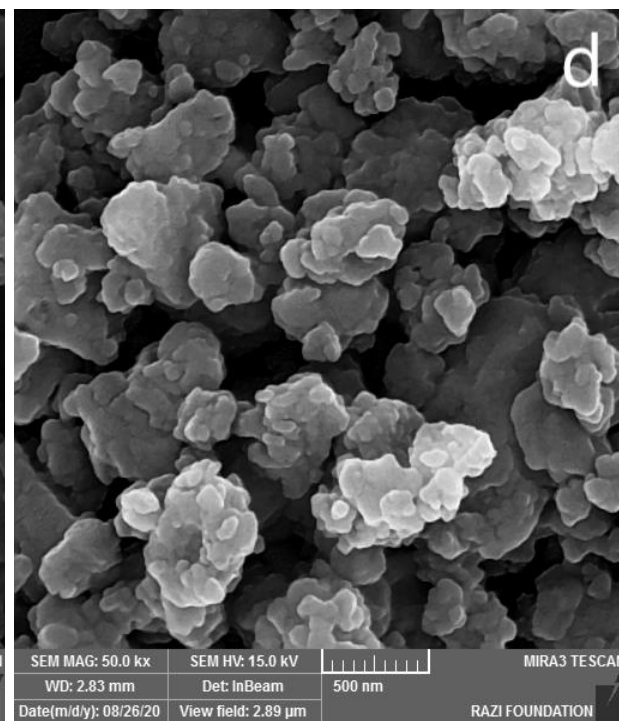
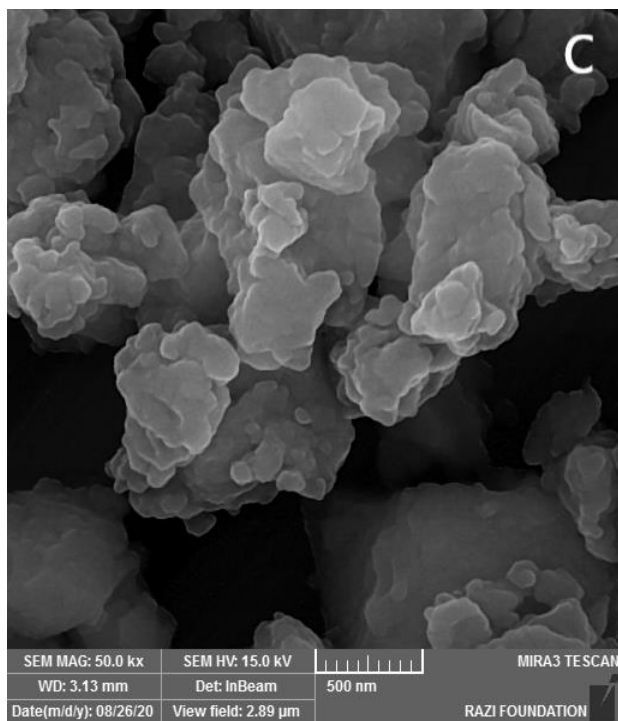
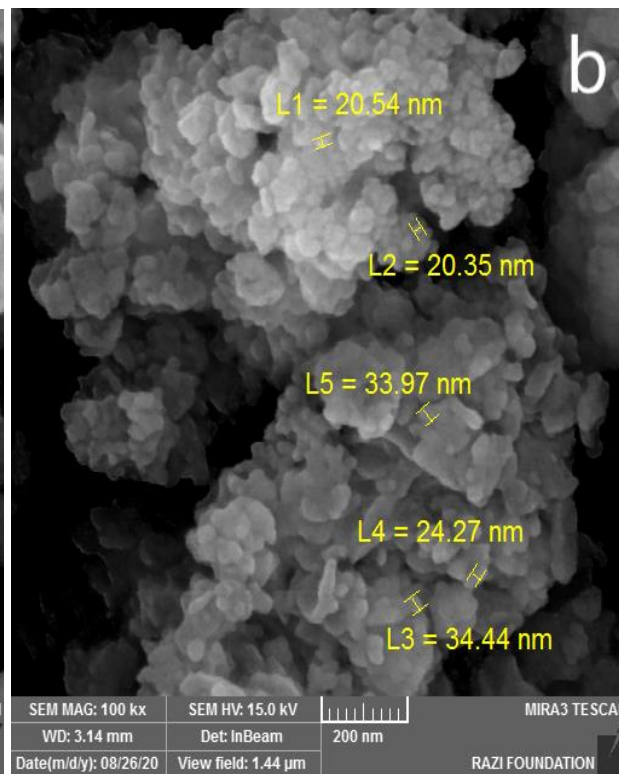
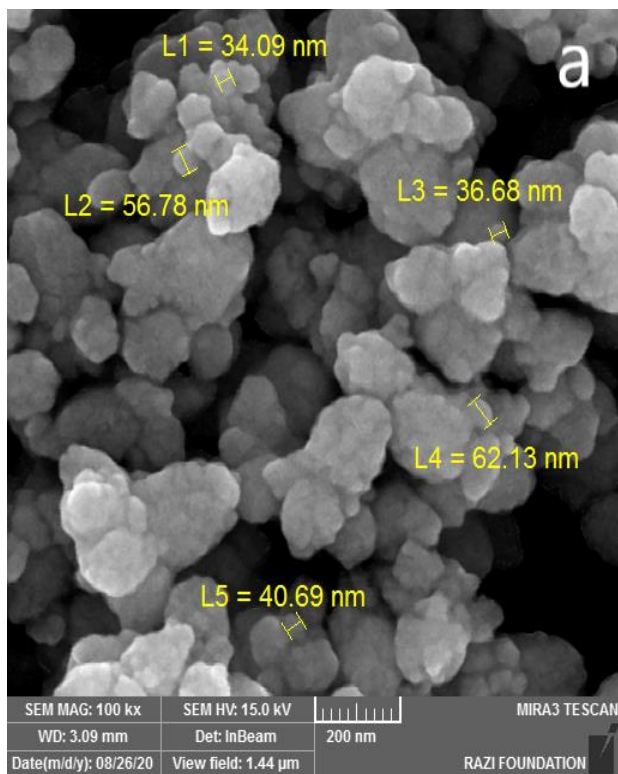
#### **Field Emission Scanning Electron Microscopic (FESEM) Images Analysis**

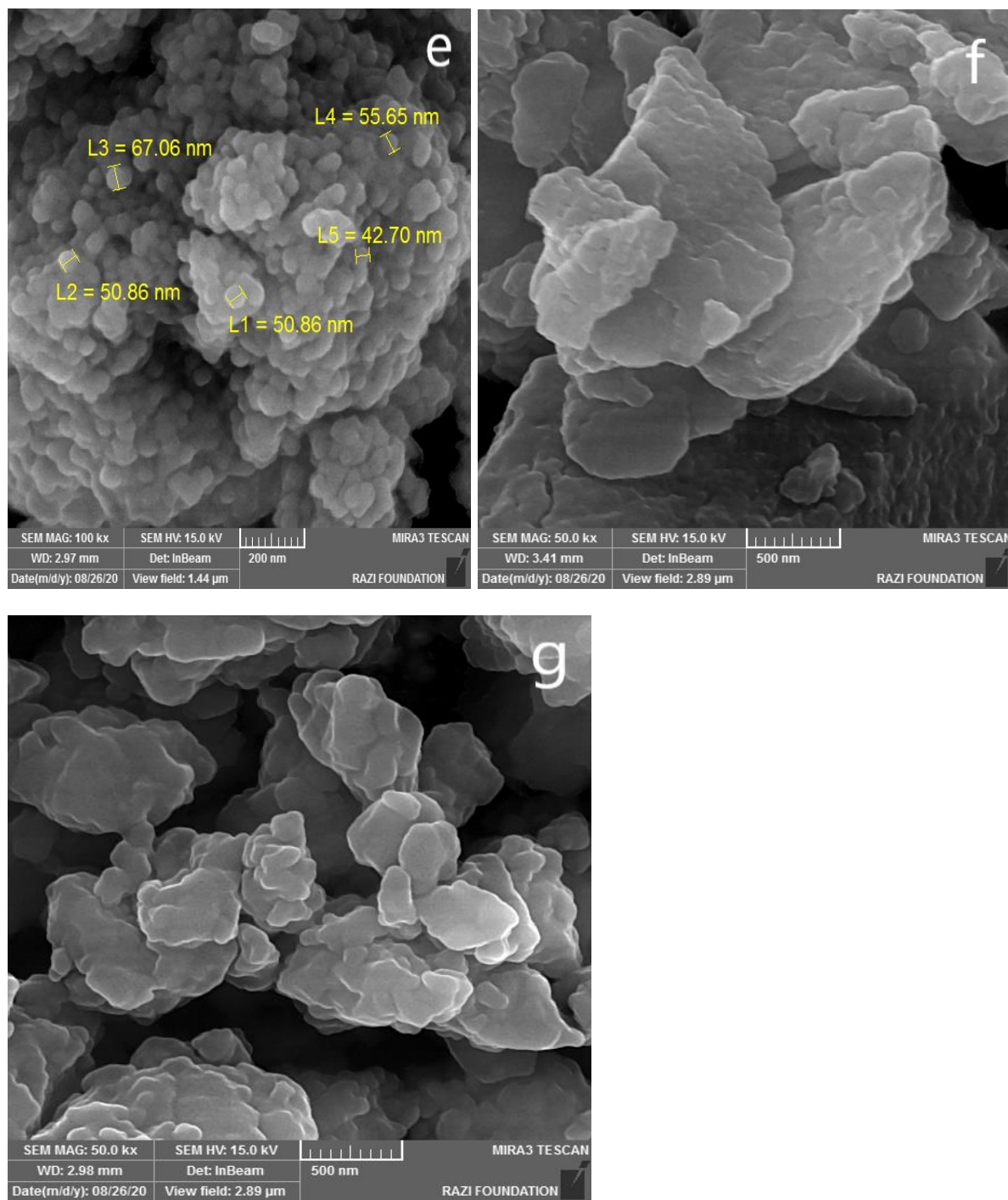
After confirming the biosynthesis of nanoparticles first by color change and then by UV-Visible spectroscopy, FESEM examined the morphology of the nanoparticles, which provides information on structural properties such as size, size distribution, shape, shape heterogeneity, and NPs aggregation.

All biosynthesized NPs had sizes in the nanometer range, while some of them had an almost uniform structure (C-ZnO, NC-ZnO, MgO, Ag NPs), while others had heterogeneous structures (Zn, Cu, Fe NPs) (Table 2 and Fig. 1). Some NPs were well separated from each other, while most of them were present in agglomerated form. Since a nanoparticle is defined as a particle with at least one size in the nanometer range, the FESEM results confirmed the nanostructure of the synthesized particles.

**Table 1.** Average size and shape of the synthesized nanoparticles.

NP	C-ZnO	NC-ZnO	Zn	MgO	Ag	Cu	Fe
Shape	Spherical	spherical	Small sheets	Semi-spherical	spherical	sheets	Small sheets
Diameter (nm)	40	25	100	65	50	180	130
Thickness	-	-	25	-	-	30	20
Standard deviation	9	5	24	36	4	51	29
Homogeneity	yes	yes	no	yes	yes	no	no





**Figure 2.** FESEM images of biosynthesized (a) C-ZnO NPs, (b) NC-ZnO NPs, (c) Zn NPs, (d) MgO NPs, (e) Ag NPs, (f) Cu NPs, (g) Fe NPs.

### Photon Cross Correlation Spectroscopy (PCCS) Analysis

The average size distribution of hydrated nanoparticles synthesized using the present new green strategy are shown in Table 3. The observed results showed that the size obtained from the PCCS did not correlate with electron microscopy observations, since these results are associated with hydrated nanoparticle aggregates, and not with single. Biosynthesized nanoparticles existed as an agglomeration of small individual nanosized particles, since there is a significant tendency to form agglomerates that are inhomogeneous in size and shape.

The polydispersity index (PDI) indicates the heterogeneity of the sample in size and may arise from size distribution in the sample or agglomeration of the sample. According to PCCS results, C-ZnO had high polydispersity, NC-ZnO and Zn had good monodispersity, MgO had medium monodispersity, Ag, Cu and Fe had good monodispersity.

**Table 3.** The average hydrated particle size of biosynthesized NPs and the particle size obtained from FESEM, SD: standard deviation, Ave: average hydrodynamic particle diameter of the agglomerates, PDI: polydispersity index, polymodal distribution of NPs.

NP	C-ZnO	NC-ZnO	Zn	MgO	Ag	Cu	Fe
Ave size (nm)	995	210	525	1551	133	795	559
Ave size (nm) of FESEM	40	25	100	65	50	30×180	20×130
SD	1026	15.16	37.84	278.9	4.47	59.50	31.53
PDI	1.06	0.005	0.005	0.32	0.001	0.005	0.003
Size distribution condition	High polydispersity	Good monodispersity	Good monodispersity	Mid-range monodispersity	Good monodispersity	Good monodispersity	Good monodispersity

### Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

The obtained FT-IR spectra confirmed the interaction of biomolecules with synthesized nanoparticles. Aliphatic and aromatic structures contain a wide range of functional groups, such as cyano (–CN), mercapto (–SH), carboxylic acid (–COOH) and amino (–NH<sub>2</sub>). They have a high affinity for the functionalization of noble metal nanoparticles and hence are useful as surface protecting functional groups. Table 4 shows the absorption bands of all spectra obtained from the extract and nanoparticles.

**Table 4.** the absorption peaks of extract and synthesized NPs as obtained from FT-IR spectrophotometer and their corresponding functional groups.

Absorption Peak Position ( $\text{cm}^{-1}$ )								Functional Group
Extract	C-ZnO	NC-ZnO	Zn	MgO	Ag	Cu	Fe	
3539	3553	3553	3553	3554	3552	3553	3523	O-H alcohol and phenol
-	3480	3475	3479	3482	3479	3479	3479	
-	3415	3411	3416	3417	3416	3416	3416	N-H primary amine
3392	-	-	-	-	-	-	-	N-H aliphatic primary amine
-	3238	3237	3239	3233	3239	3239	3239	C-H alkene
-	-	-	-	-	-	2923	2922	aliphatic C-H/ secondary amine/ amine salt
-	-	-	-	2362	-	-	-	CO <sub>2</sub>
2028	2030	2028	2039	1996	2090	2039	2039	C-H aromatic
1624	1621	1620	1622	1621	1622	1622	1622	C=O/C=C aromatic ring
-	1513	-	-	1549	-	-	-	N-O nitro/C=C
-	1424	-	-	-	-	-	-	N-H aromatic amine
-	-	1395	-	-	-	-	-	Sulphate S=O
-	-	-	-	-	-	1327	-	
1084	1079	1069	1148	1078	1151	1151	1144	C-O/ C-N amine/C-OH bending
-	-	-	-	871	-	-	-	C-H Alkane/ alkene/aromatics/
770	-	-	-	-	-	-	-	C-S thiol or thioether
621	623	623	621	626	621	621	622	C-H alkyne/O-H alcohol (out of plane bend)
474	481	482	480	486	479	479	480	Organometalics/
423	418	418	418	-	418	-	418	S-S sulphides (stretch)

#### X-Ray Diffraction (XRD) Analysis

**C-ZnO.** Number of Bragg reflections for biosynthesized calcinated ZnO NPs appears at  $2\theta = 31.77^\circ$  (100),  $34.44^\circ$  (002),  $36.26^\circ$  (101),  $47.55^\circ$  (102),  $56.61^\circ$  (110),  $62.89^\circ$  (103),  $66.39^\circ$  (200),  $67.97^\circ$  (112),  $69.10^\circ$  (201),  $72.61^\circ$  (004),  $76.99^\circ$  (202),  $81.43^\circ$  (104) and  $88.65^\circ$  (203).

Using Scherrer's equation, the average particle size of biosynthesized NPs calculated to be 25.3 nm for C-ZnO NPs, which matches the average diameter of particles determined by FESEM. This finding suggests that the NPs are mainly single crystals rather than polycrystalline.

**NC-ZnO.** Peaks for biosynthesized non-calcinated ZnO NPs appears at  $2\theta = 31.73^\circ$  (100),  $34.38^\circ$  (002),  $36.21^\circ$  (101),  $47.48^\circ$  (102),  $56.53^\circ$  (110),  $62.77^\circ$  (103),  $66.30^\circ$  (200),  $67.86^\circ$  (112),  $69.00^\circ$  (201),  $72.46^\circ$  (004),  $76.86^\circ$  (202),  $81.27^\circ$  (104) and  $89.49^\circ$  (203) respectively. The planes show the hexagonal structure, corresponded to pure zinc oxide NPs without any impurity patterns.

For the NC-ZnO NPs, the calculated average particle size using Scherrer's equation was 27.46 nm. These findings are very close to the particles' sizes attained from FESEM analysis.

**Zn, Cu, Fe.** The XRD pattern of the synthesized Zn, Cu and Fe NPs shows no distinctive diffraction peaks, suggesting that these are largely amorphous in nature rather than crystalline, or the size of the individual NPs are smaller than detection limit of the XRD. Also, it could be suggested that the amount of the crystals was lower than the XRD detection level. As there is no diffraction peak, the particle size cannot be calculated using Scherrer's equation.

**MgO.** The wide angle XRD pattern indicates the presence of cubic structure of MgO NPs determined with diffraction peaks at  $2\theta$  values are  $37.04^\circ$  (111),  $43.04^\circ$  (200),  $62.49^\circ$  (220),  $47.93^\circ$  (311) and  $78.89^\circ$  (222). No subsequent peaks of Mg (OH)<sub>2</sub>, Mg or other impurities were detected in the XRD pattern of MgO NPs, showing the high purity of the synthesized nanocrystals. The average grain size 69.6 nm was calculated using Scherrer's equation which is in close agreement with the size of 65 nm obtained from FESEM.

**Ag.** The XRD of the Ag NPs between  $2\theta$  values of  $20^\circ$  and  $90^\circ$  exhibits crystalline nature and is in agreement with earlier published data showing peaks of silver NPs. Bragg's diffraction peaks for biosynthesized Ag NPs are observed at  $2\theta = 38.11^\circ$  (111),  $44.30^\circ$  (200),  $64.45^\circ$  (220),  $77.40^\circ$  (311), and  $81.55^\circ$  (222). The sharp diffraction peaks confirm the crystalline nature of the sample.

The mean grain size of the Ag NPs calculated using Scherer's formula was 40.9 nm, which is close to the obtained size of 50 nm resulted from FESEM analysis.

### **In vitro evaluation of antimicrobial activity of biosynthesized Ag and Cu nanoparticles**

In vitro experiments conducted to evaluate the antimicrobial activity of biosynthesized NPs against *P. aeruginosa* bacteria. showed that the inhibitory effect of Ag NPs increased with their concentration. The effective concentration (EC<sub>50</sub>) was 4 ppm, and the minimum bactericidal concentration (MBC) was 10 ppm.

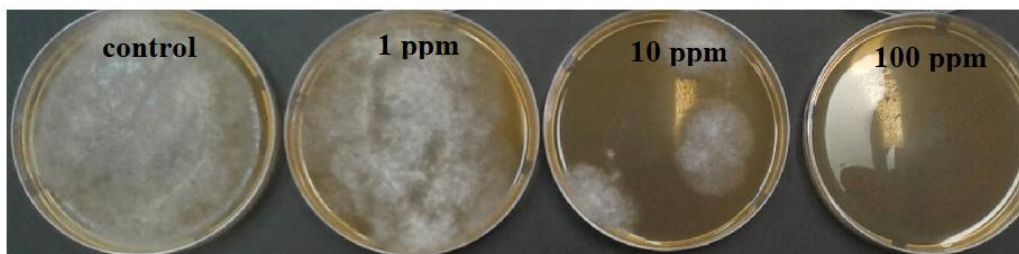
The copper NPs obtained by the green synthesis method also demonstrated antibacterial activity against gram-negative bacteria *P. aeruginosa*. The inhibitory effect of Cu NPs increases with their concentration. The effective concentration (EC<sub>50</sub>) was 2.2 mg/ml, and the minimum bactericidal concentration (MBC) was 5 mg/ml. However, the MBC of Cu NPs turned out to be greater than the MBC of Ag nanoparticles, which indicates a higher antibacterial activity of Ag NPs compared to Cu NPs.

#### **Evaluation of antifungal activity of synthesized Ag nanoparticles in vitro**

Studies carried out using the agar dilution method showed that the biosynthesized Ag NPs exhibit antifungal activity against *B. cinerea* and *P. concavum* and are able to suppress the growth of colonies by 28 and 65.36% compared to the control, respectively (Tables 5 and 6). According to the results presented in tables 5 and 6, the percentage of inhibition decreased over time towards the end of the experiment, and the inhibition percentage increased with increasing dose of NPs. This is probably due to the high density of Ag NPs, at which the medium was able to saturate and combine with fungal hyphae, which deactivated the phytopathogen. For *B. cinerea*, the lowest percent inhibition was 5.7% for 1 ppm NPs on day 9 compared to 28% obtained at 100 ppm on the same day. For *P. concavum*, the lowest percent inhibition was 6.5% at 1 ppm on day 9 compared to 65.36% inhibition achieved at 100 ppm. According to the percentage inhibition values given in Tables 5 and 6, it can be concluded that the presence of Ag NPs in cultures affected the growth of *P. concavum* more than *B. cinerea*. For both fungi, a higher inhibitory effect was obtained at a concentration of Ag nanoparticles of 100 ppm compared to other concentrations.

***Inhibition of spore germination.*** Spore germination was completely inhibited at 100 ppm Ag NPs (Fig. 3).





**Figure 3.** Spore germination inhibition of *B. cinerea* by Ag NPs at concentrations of 0 (as control), 1, 10, and 100 ppm dispersed in an agar medium.

**Table 5.** Growth of *B. cinerea* (colony diameter mm) with different concentration of the synthesized Ag NPs for 9 days.

Concentration (ppm)	6 <sup>th</sup> day Colony diameter (mm)	9 <sup>th</sup> day Colony diameter (mm)	Growth inhibition % (9 <sup>th</sup> day)
Control	27.5	70	-
1	27.5	66	5.7%
10	11.9	60	14.25%
100	5.0	50.4	28%

**Table 6.** Growth of *P. concavum* (colony diameter mm) with different concentration of the synthesized Ag NPs for 9 days.

Concentration (ppm)	6 <sup>th</sup> day Colony diameter (mm)	9 <sup>th</sup> day Colony diameter (mm)	Growth inhibition % (9 <sup>th</sup> day)
Control	3.5	46.2	-
1	1.5	43.2	6.5%
10	1.5	41.6	10%
100	0.5	16	65.36%

### **In vitro evaluation of antifungal activity of synthesized Cu nanoparticles**

*B. cinerea* fungi were used to study the antifungal activity of Cu NPs by dilution in an agar medium. The results obtained showed that there was no significant growth inhibition of *B. cinerea*

in the control, at 1 ppm and 10 ppm, but there was  $25 \pm 0.3\%$  growth inhibition for samples treated with a concentration of 100 ppm. An increase in the concentration of biosynthesized Cu NPs to 100 ppm led to a decrease in the colony radius and the percentage of *B. cinerea* growth inhibition (Table 7).

**Table 7.** Growth of *B. cinerea* (colony diameter mm) with different concentration of the synthesized Cu NPs for 9 days and percentage growth inhibition.

<b>Concentration (ppm)</b>	<b>Colony diameter (mm) (9<sup>th</sup> day)</b>	<b>Growth inhibition % (9<sup>th</sup> day)</b>
Control	80	-
1	72	10%
10	64	20%
100	60	25%

**A comparison between the effect of biogenic NPs and their counterpart salts on physiological characteristics of wheat and flax seedlings:**

The biosynthesized nanoparticles at different concentrations affected the growth and development of wheat and flax seeds differently. Both the effects of "stimulation" and "phytotoxicity" were observed, and in some cases, there was no significant effect of NPs and their analogue salts on seed germination and seedling development (Fig. 4 and 5).

On the 7<sup>th</sup> day of the experiment, in a comparative analysis of the effect of biosynthesized NPs in the applied concentrations, Zn NPs were the most effective in the development of shoots and roots, while Ag NPs turned out to be less effective for wheat and Fe NPs for flax seeds.

**Comparing NPs and their counterpart salts treatment of flax seeds:**

Comparing averages of the results of different concentrations, C-ZnO, NC-ZnO and Zn NPs showed 27%, 41% and 31% increase in root length respectively in comparison with 7% increase in zinc acetate treated ones. Also, there is no significant effect on shoot length over the control. MgO NPs resulted in 30% increase and MgSO<sub>4</sub> resulted in 9% decrease in root length. MgO NPs had no significant effect on shoot length, but MgSO<sub>4</sub> showed 6% decrease.

Ag NPs and AgNO<sub>3</sub> had negative effects on root length (20% and 41% decrease respectively), also on shoot length (20% and 41% decrease respectively).

Cu NPs had positive effect on root and shoot length (14% and 9% increase respectively), but CuSO<sub>4</sub> had negative effect on both root and shoot lengths (73% and 30% decrease respectively).

Fe NPs and FeCl<sub>3</sub> showed a little positive effect on both root and shoot lengths (between 5 to 9% increase).

So, all of the NPs had better effects on wheat seeds rather than their counterpart salts.

#### **Comparing NPs and their counterpart salts treatment of flax seeds:**

Comparing averages of the results of different concentrations, C-ZnO, NC-ZnO and Zn NPs showed an average 90%, 118% and 145% increase in root length respectively in comparison with 124% increase in zinc acetate treated ones. Also, C-ZnO, NC-ZnO and Zn NPs showed an average 13%, 20% and 24% increase in shoot length respectively in comparison with 22% increase in zinc acetate treated ones. Then Zn NPs had better effect on root length rather than zinc acetate.

MgO NPs and MgSO<sub>4</sub> showed increase of 52% and 117% in root length, respectively. Also, MgO NPs and MgSO<sub>4</sub> resulted in an increase of 21% and 44% in shoot length, respectively.

Ag NPs showed positive effect on both root and shoot lengths (69% and 30% increase respectively), but AgNO<sub>3</sub> negatively affected shoot lengths (44% decrease) and had not any significant effect on root length.

Cu NPs showed positive effect on both root and shoot lengths (37% and 8% increase respectively), but CuSO<sub>4</sub> negatively affected root lengths (40% decrease) and had not any significant effect on shoot length.

Fe NPs had a 10% decrease on root length and no significant effect on shoot length. FeCl<sub>3</sub> showed 46% and 44% increase on root and shoot lengths.

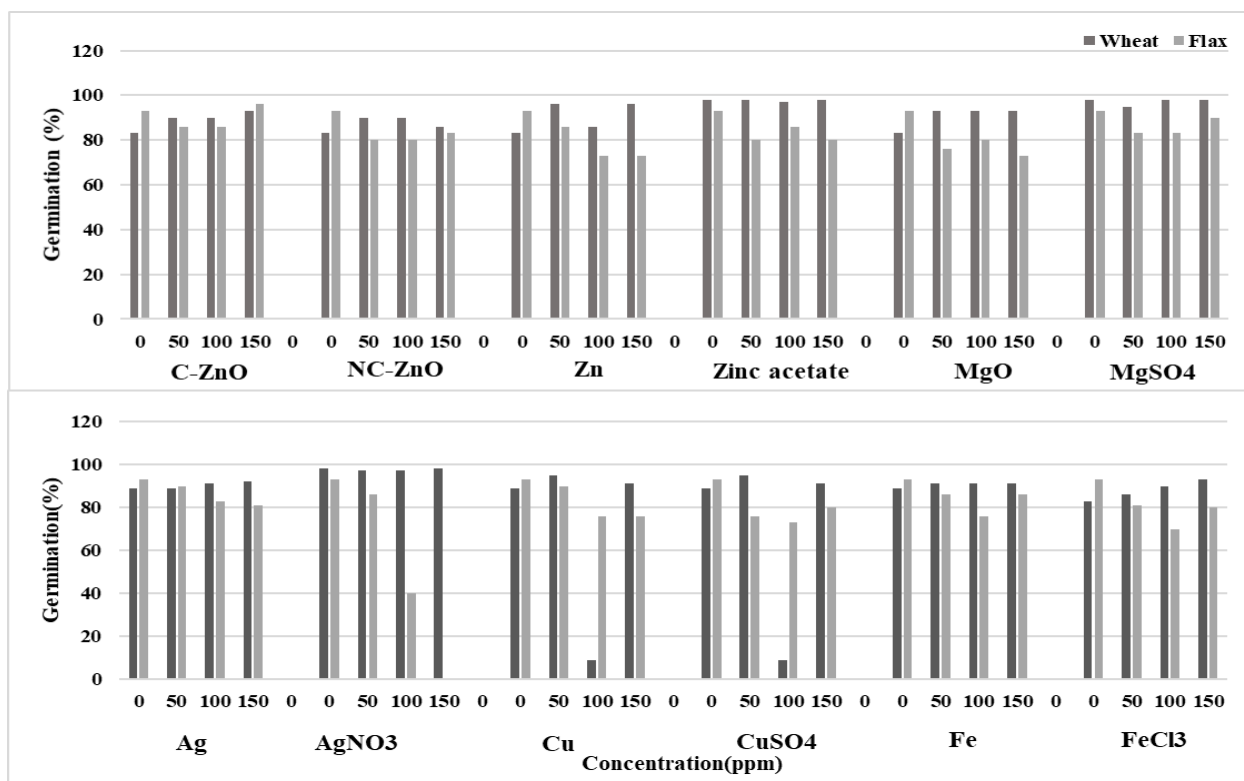
Among the synthesized NPs, Zn, Ag and Cu NPs effects on flax seeds was better than their counterpart salts.

The results of the experiments showed that the applied concentrations of Ag NPs are toxic for wheat but stimulating for flax. Since all experimental conditions are the same for all samples, it can be concluded that the differences are related to the type of seeds. Among the tested metal salts, zinc acetate had the greatest stimulating effect, while CuSO<sub>4</sub> was the most toxic for both flax and wheat.

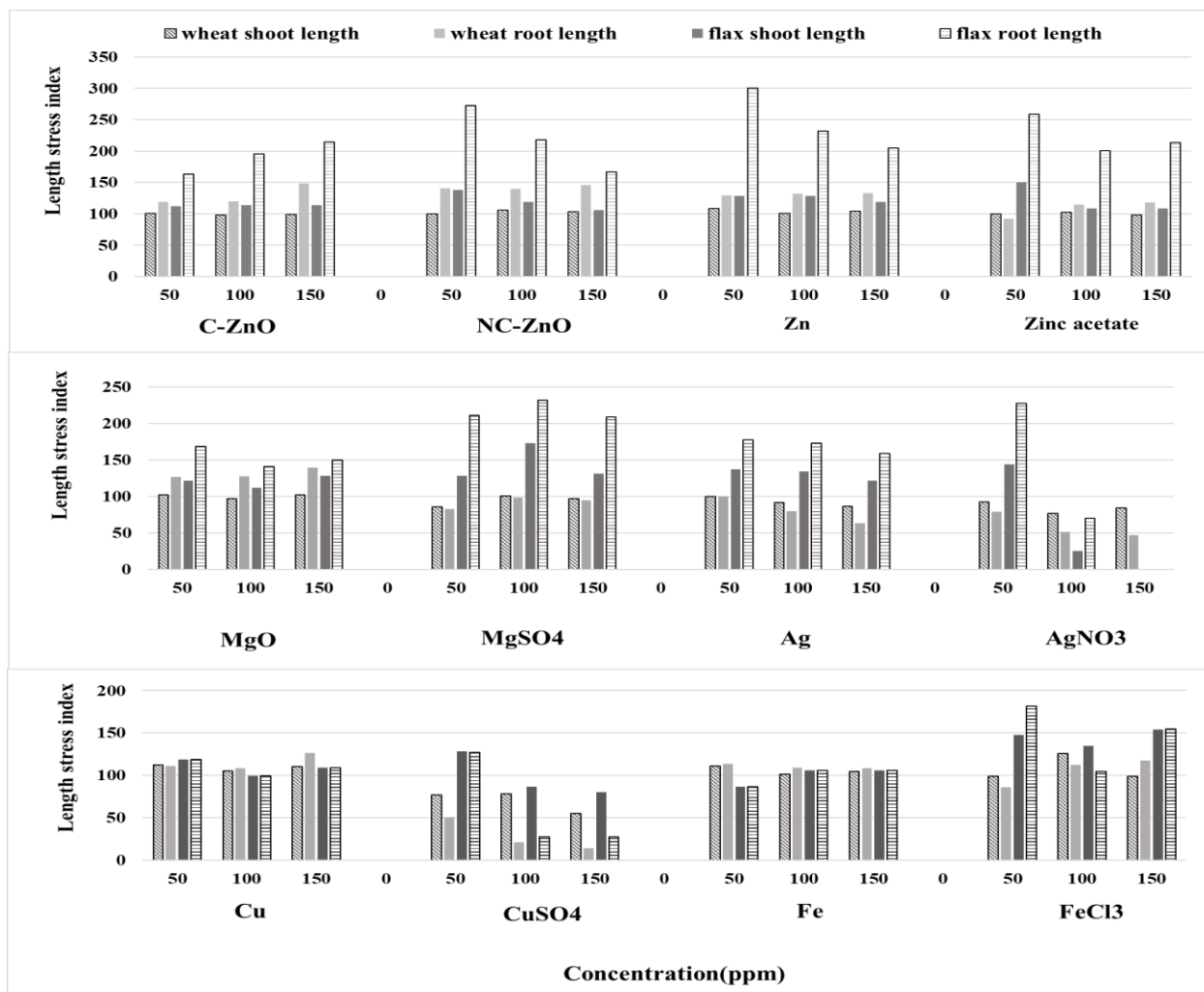
The positive effect was in correlation with the concentration of NPs, the duration of their application, the growing environment of the culture and the type of plant. Among the measured parameters, root length was found to be more sensitive than shoot length. Flax root length is more

sensitive to NPs and salt treatment, while wheat shoot length is less sensitive. Although the factors affecting the elongation of roots and shoots after exposure to NPs are not yet clear, it can be assumed that the polymeric network of flax seed mucus traps NPs or metal ions, their digestibility for flax seeds differed from that of wheat during the period of our studies.

Figure 4 presents a comparative analysis of changes in seed germination depending on the concentrations of NPs and salts used. In most cases, wheat seeds had more G% than flax seeds. A 150 ppm AgNO<sub>3</sub> solution was toxic to flax seeds and did not germinate with this treatment. Similarly, metal-based NPs have been reported to have a dual effect on seed germination. The positive effects of treatment with metal-based NPs have been demonstrated in various plants.



**Figure 4.** Dose response effect of NPs and their correspondent metal salts on germination percentage of wheat and flax seeds at 7<sup>th</sup> day of the experiment.



**Figure 5.** Dose response effect of NPs and their correspondent metal salts on shoot and root stress tolerance index (SLSI and RLSI, respectively) of wheat and flax seeds at 7<sup>th</sup> day of the experiment.

## CONCLUSIONS

Based on a conducted study in which the characteristics of biosynthesized nanoparticles were studied using UV-Visible Spectroscopy, Transmission Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM) in combination with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS), Photon Cross-correlation Spectroscopy (PCCS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and X-ray diffraction spectroscopy (XRD), the following conclusions can be drawn:

1. An aqueous extract of strawberry leaves can be used in the green synthesis method as a reducing agent and stabilizing agent in an environmentally friendly production of metal NPs (C-ZnO, NC-ZnO, Zn, MgO, Ag, Cu, Fe)

2. Based on the results of FESEM, particles with a size of 40 nm for C-ZnO, 25 nm for NC-ZnO, 100×25 nm for Zn, 65 nm for MgO, 50 nm for Ag, 180×30 nm for Cu, 130×20 nm were obtained for Fe nanoparticles. EDS confirms the chemical composition of nanoparticles. According to the results of PCCS, C-ZnO nanoparticles had high polydispersity, NC-ZnO and Zn had good monodispersity, MgO had medium monodispersity, Ag, Cu and Fe had good monodispersity. The obtained FT-IR spectra confirmed the interaction of biomolecules with the synthesized nanoparticles. XRD showed that C-ZnO, NC-ZnO, MgO and Ag were crystalline, while Zn, Cu and Fe were amorphous.
3. Both positive and toxic effects of synthesized NPs in comparison with their counterpart metal salts ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ ) on wheat and flax seed germination and seedling growth have been established. According to the obtained results, the plants response to the metal-based nanoparticles and metal salts mainly depends on the type of metal, plant species, concentration of NP suspension or saline solution, exposure conditions, and growth stage.

On wheat seedlings, C-ZnO, NC-ZnO and Zn nanoparticles showed an increase in root length by 27%, 41% and 31%, respectively, MgO nanoparticle treatments led to a 30% increase in root length, Cu nanoparticles had a positive effect on root length and shoots (an increase of 14% and 9%, respectively), while Ag nanoparticles had a toxic effect on both the formation of roots and seedlings of wheat.

On flax seedlings, C-ZnO, NC-ZnO and Zn NPs had a positive effect on the increase in root length by an average of 90%, 118% and 145%, respectively, compared with the control, and also demonstrated an increase in shoot length by an average of 13%, 20% and 24% respectively. Ag NPs had a positive effect on both root length and shoot length (an increase of 69% and 30%, respectively), Cu NPs had a positive effect on both root length and shoot length (an increase of 37% and 8%, respectively), while Fe NPs had a toxic effect on root formation by flax plants.

4. Antibacterial activity and significant suppression of the growth of colonies of the phytopathogen *Pseudomonas* by synthesized NPs, including C-ZnO, NC-ZnO, Ag and Cu, were established. For Ag NPs, the calculated effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) was 4 ppm, and the minimum bactericidal concentration (MBC) was 10 ppm. For Cu NPs, the

calculated EC<sub>50</sub> was 2.2 mg/mL, and MBC was 5 mg/mL. For C-ZnO NPs, the calculated EC<sub>50</sub> was 42 mg/mL, and the MBC was 200 mg/mL. For NC-ZnO NPs, EC<sub>50</sub> was 26 mg/mL, and MBC was 150 mg/mL.

5. The antifungal activity of the synthesized NPs for pathogenic fungi *Botrytis cinerea*, *Pilidium concavum* was noted, while against *Pestalotia sp.* no significant effect was observed. Ag NPs had the most significant effect on the suppression of *B. cinerea* and *P. concavum* colonies. 65.36%. Germination of *B. cinerea* spores was completely inhibited at 100 ppm Ag NPs.

### **List of published works on the topic of the dissertation**

#### *Articles in publications indexed by Scopus and Web of Science*

1. Bayat, M.; Zargar, M.; Murtazova, K.S; Nakhaev, M.R.; Shkurkin, S.I. Ameliorating Seed Germination and Seedling of Nano-Primed Wheat and Flax Seeds Using Seven Biogenic Metal-Based Nanoparticles, *Agronomy* **2022**, *12*, 811, 18.
2. Bayat, M.; Zargar, M.; Astarkhanova, T.; Pakina, E.; Ladan, S.; Lyashko, M.; Shkurkin, S.I. Facile Biogenic Synthesis and Characterization of Seven Metal-Based Nanoparticles Conjugated with Phytochemical Bioactives Using *Fragaria ananassa* Leaf Extract. *Molecules* **2021**, *26*, 10, 3025-3049, 24.
3. Bayat, M.; Zargar, M.; Chudinova, E.; Astarkhanova, T.; Pakina, E. In Vitro Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activity of Biogenic Silver and Copper Nanoparticles: The First Report of Applying Biogenic Nanoparticles against *Pilidium concavum* and *Pestalotia sp.* Fungi. *Molecules* **2021**, *26*, 5402-5413, 11.
4. Bayat, M.; Chudinova, E.; Zargar, M.; Lyashko, M.; Louis, K.; Adenew, K. Phyto-assisted green synthesis of zinc oxide nanoparticles and its antibacterial and antifungal activity. *Research on Crops* **2019**, *20*, 4, 725-730.
5. Bayat, M.; Pakina, E.; Astarkhanova, T.; Nasirsediqi, A.; Zargar, M.; Vvedenskiy, V. Review on agro-nanotechnology for ameliorating strawberry cultivation. *Research on Crops* **2019**, *20*, 4, 731-736.

#### *Articles published in VAK*

1. Bayat, M. Biosynthesis and characterization of magnesium hydroxide nanoparticles. *ПРОБЛЕМЫ РАЗВИТИЯ АПК РЕГИОНА* **2021**, 1 (45) 66-70.
2. Bayat, M.; Lakzian. A. The role of nanotechnology for improving crop production. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries* **2019**, 14, 4, 297-305.
3. Astarkhanova I.R., Astakhanova T.S., Alibalayev D.A., Magomedov A.Z., Bayat M., The Spread of San Jose Scale (*Quadraspidiotus Perniciosus*) and phytosanitary measures to combat it. *ПРОБЛЕМЫ РАЗВИТИЯ АПК РЕГИОНА*. **2020**, 2, 42, 14-21.
4. Bayat, M.; Pakina, E.; Astarkhanova, T.; Zargar M. Positive and negative effects of different nanomaterials on seed germination and seedling growth of wheat. *ПРОБЛЕМЫ РАЗВИТИЯ АПК РЕГИОНА* **2022**, 4 (54). 66–69

*Scientific conferances*

1. Bayat, M.; Astarkhanova, T. ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ. Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию Дагестанского государственного аграрного университета имени М. М. Джембулатова. 21–27 сентябрь **2017**.
2. Bayat, M. Effects of three production and input management strategies on the yield components and economics of spring wheat varieties. «Инновационные процессы в сельском хозяйстве». 25-27 апреля 2019, М.: РУДН. 39-46.



## SUMMARY

### BIOSYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NANOPARTICLES AND EVALUATING THEIR PROSPECTIVE BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

Nanoparticles based on Zn, Mg, Fe, Cu (trace elements) and Ag were synthesized in an environmentally friendly way (green synthesis), their physical and chemical properties were studied using various characterization methods. The characteristics of biosynthesized nanoparticles were studied using UV-Visible Spectroscopy, Transmission Electron Microscopy (FESEM) in combination with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS), Photon Cross-correlation Spectroscopy (PCCS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and X-ray diffraction spectroscopy (XRD). The obtained in this research results show that aqueous extract of strawberry leaves can be used in the green synthesis method as a reducing agent and stabilizing agent in an environmentally friendly production of metal NPs (C-ZnO, NC-ZnO, Zn, MgO, Ag, Cu, Fe)

These nanoparticles were tested and investigated for their antimicrobial activities against different pathogens (*Pseudomonas aeruginosa*; *Botrytis cinerea*; *Pilidium concavum* (Desm.) Höhn. and *Pestalotia* sp.) and on seed germination and germination growth of wheat (*triticum aestivum*) and flax (*Linum usitatissimum*). Antibacterial activity and significant suppression of the growth of colonies of the phytopathogen *Pseudomonas* by synthesized NPs, including C-ZnO, NC-ZnO, Ag and Cu, were established.

## АННОТАЦИЯ

### БИОСИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОЧАСТИЦ И ОЦЕНКА ИХ ПЕРСПЕКТИВНОГО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Наночастицы на основе Zn, Mg, Fe, Cu (микроэлементы) и Ag синтезированы экологически безопасным способом (зеленый синтез), изучены их физические и химические свойства с использованием различных методов характеристики. Характеристики биосинтезированных наночастиц изучали с помощью УФ-видимой спектроскопии, трансмиссионной эмиссионной сканирующей электронной микроскопии (FESEM) в сочетании с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией (EDS), фотонной кросс-корреляционной спектроскопией (PCCS), инфракрасной спектроскопией с преобразованием Фурье (FT-ИК) и рентгеновской дифракционной спектроскопией (РСА). Полученные в данном исследовании результаты показывают, что водный экстракт листьев земляники может быть использован в методе зеленого синтеза в качестве восстановителя и стабилизатора в экологически чистом производстве НЧ металлов (C-ZnO, NC-ZnO, Zn, MgO, Ag, медь, железо)

Эти наночастицы были протестированы и исследованы на предмет их антимикробной активности в отношении различных патогенов (*Pseudomonas aeruginosa*, *Botrytis cinerea*, *Pilidium concavum* (Desm.) Höhn. и *Pestalotia* sp.), а также в отношении прорастания семян и роста всходов пшеницы (*triticum aestivum*) и льна (*Linum usitatissimum*). Установлена антибактериальная активность и значительное подавление роста колоний фитопатогена *Pseudomonas* синтезированными НЧ, в том числе C-ZnO, NC-ZnO, Ag и Cu.

**БАЯТ МАРЬЯМ**

**БИОСИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОЧАСТИЦ И ОЦЕНКА ИХ  
ПЕРСПЕКТИВНОГО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

Специальности

4.1.3 Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений

1.5.6 Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Аграрно-технологическом институте Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

**Научные руководители:**

доктор сельскохозяйственных наук, доцент  
профессор агробиотехнологического департамента  
АТИ РУДН

**Астарханова Тамара Саржановна**

**Официальные оппоненты:**

доктор сельскохозяйственных наук  
профессор, ведущий научный сотрудник  
ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский  
институт фитопатологии

**Филипчук Ольга Дмитриевна**

кандидат биологических наук,  
руководитель испытательной лаборатории  
ЦИНАО ФГБНУ «Всероссийский  
научно-исследовательский институт  
агрохимии имени Д.Н. Прянишникова»

**Любунь Елена Валентиновна**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г.Лорха»

Защита диссертации состоится «30» ноября 2022 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 2021.002 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН) по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.8, корп.2 в аудитории 423.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке в УНИБЦ (Научной библиотеке) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН) по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета ПДС 2021.002  
кандидат сельскохозяйственных наук

**Введенский Валентин Валентинович**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Выращивание сельскохозяйственных культур сопряжено с высоким риском бактериальных и грибных заболеваний. Заражение различными фитопатогенами значительно снижает качество культур в агросистемах. Патогены растений накапливаются в латентной форме в течение нескольких поколений, что вызывает серьезные потери урожая. Применение большого количества химических средств защиты растений ведет не только к загрязнению окружающей среды, но и к возникновению резистентных форм фитопатогенов. Новая стратегия производства средств защиты использует возможности нанотехнологии для синтеза современных препаратов.

Синтез наночастиц металлов в основном происходит путем использования физических или химических методов. Физические методы требуют дорогостоящего оборудования, больших энергозатрат и выделения большой площади под оборудование.

Для химических методов требуются дорогостоящие и токсичные химические вещества, которые могут оставаться в синтезированных наночастицах (НЧ) и ограничивать их применение из-за токсичности вредных остатков. Для решения проблемы дорогостоящего оборудования и токсичных химикатов, были разработаны экологически чистые, простые и рентабельные методы биосинтеза НЧ, так называемый зеленый синтез.

Части растений, содержащие эксклюзивные фитохимические вещества, могут участвовать в процессе восстановления при биосинтезе НЧ и растения являются наиболее предпочтительной для использования биосистемой. Скорость биосинтеза НЧ в растениях выше, чем у микроорганизмов, получаемые НЧ более стабильны и разнообразны по форме и размеру. Исходя из этого, мы использовали листья земляники, в качестве экономичного материала из агроотходов, чтобы подготовить водный экстракт и использовать его для зеленого синтеза различных наночастиц. В литературных источниках нет данных об использовании листьев земляники в процессе зеленого синтеза и после биосинтеза НЧ мы исследовали их физические и химические свойства. Для определения положительного или отрицательного влияния биосинтезированных наночастиц на растения, нами были выбраны две культуры с семенным типом размножения: пшеница – как наиболее востребованная продовольственная культура и лен – основная техническая культура. Также в задачу наших исследований входила оценка антимикробной активности биосинтезированных наночастиц для последующего использования в качестве нехимических средств защиты растений при экологизации сельскохозяйственного производства.

**Степень разработанности темы.** Растительные экстракты широко применяются в зеленом синтезе металлических наночастиц благодаря их экономической эффективности для массового производства, экологичности, а также ускоренному циклу производства. Путем изменения условий производства и получения мы можем менять характеристики синтезируемых НЧ (цвет, размер, форма и связывание органических лигандов с поверхностью синтезированных НЧ). Эти особенности влияют на потенциальную область применения и воспроизводимость производства НЧ. После синтеза НЧ необходимо исследовать их химический состав и кристаллическую структуру. Известны многочисленные экспериментальные методы для оценки различных физических и химических характеристик биосинтезированных образцов наночастиц, таких как размер, форма, морфология, кристаллическая структура, а также элементный состав (Агарвал и др., 2013; Мурдикудис и др., 2018; Крутяков и др., 2017; Крутяков и др., 2022).

**Цель и задачи работы.** Целью настоящей работы является биосинтез и характеристика семи НЧ на основе солей цинка, магния, серебра, меди и железа, оценка

возможности биотехнологического применения синтезированных наночастиц в качестве основы для новых регуляторов роста и средств защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов.

В задачи исследований входило:

1. Исследовать экстракты листьев земляники для извлечения фитокомпонентов и разработки экономически эффективного и экологически безопасного компонента новых средств защиты растений.
2. Разработать метод синтеза НЧ с высокой эффективностью производства без использования высокого давления, энергии, температуры и токсичных химических веществ для дальнейшего внедрения в промышленный синтез.
3. Определить возможность синтеза НЧ на основе металлов Zn, Mg, Fe, Cu (микроэлементов) и Ag с применением зеленого метода.
4. Охарактеризовать биосинтезированные НЧ с использованием высокотехнологичных аналитических приборов.
5. Оценить эффективность биотехнологического применения синтезированных НЧ для улучшения роста и устойчивости сельскохозяйственных культур.
6. Оценить антибактериальную и антигрибную активность синтезированных НЧ.

**Научная новизна.** В рамках диссертационной работы впервые:

- изучена эффективность наночастиц металлов для применения их в качестве антибактериальных, антигрибных и рост-стимулирующих агентов.

- предложены бифункциональные НЧ (в качестве регуляторов роста и пестицидов) использовать в качестве бактерицидных добавок к средствам защиты растений.

- применены экстракты листьев земляники в зеленом синтезе НЧ (методе получения металлических наночастиц из солей металлов с использованием в качестве восстанавливающих и стабилизирующих агентов экстракты растений).

**Теоретическая и практическая значимость.** Разработан и испытан новый экологически чистый метод биосинтеза металлических наночастиц, которые более биосовместимы, чем химически синтезированные, и более экологичны, чем физически синтезированные наночастицы. Наночастицы протестированы и исследованы на их антимикробную активность против различных патогенов (*Pseudomonas aeruginosa*, *Botrytis cinerea*, *Pilidium concavum* (Desm.) Höhn, и *Pestalotia* sp.), а также на прорастание семян и рост всходов пшеницы (*triticum aestivum*) и льна (*Linum usitatissimum*).

Результаты исследований были внедрены в учебный процесс агробиотехнологического департамента АТИ РУДН и могут быть рекомендованы в промышленном производстве.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Синтез наночастиц на основе Zn, Mg, Fe, Cu (микроэлементы) и Ag экологически безопасным способом (зеленый синтез).
2. Характеристика синтезированных НЧ
3. Оценка влияния синтезированных наночастиц на различные патогены растений *Pseudomonas aeruginosa*, *Botrytis cinerea*, *Pilidium concavum* (Desm.) Höhn. и *Pestalotia* sp. для решения проблемы устойчивости к химическим пестицидам
4. Оценка эффективности синтезированных наночастиц на прорастание семян и рост всходов пшеницы (*triticum aestivum*) и льна (*Linum usitatissimum*).

**Апробация работы.** Результаты, полученные в рамках работы над диссертацией, были представлены и обсуждены на Международной научной конференции «Инновационные процессы в сельском хозяйстве» в РУДН (Москва, май 2019 г.).

**Публикация результатов исследования.** По результатам диссертационного исследования опубликовано 10 работ, из них 5 статьи в научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, 3 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, и 2 тезисов конференций.

**Личный вклад автора.** Соискатель участвовал в постановке цели и задач исследования, провёл сбор и анализ полученного материала, обработку и интерпретацию данных, а также подготовил в соавторстве публикации.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 170 страницах компьютерного текста, содержит 22 таблицы, 83 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов и предложений производству. Список литературы включает 124 автора.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Введение.** Обоснована актуальность и научная новизна исследования, сформулированы цель и задачи, а также положения, выносимые на защиту.

**Глава 1. Обзор литературы.** В этой главе рассматриваются биосинтез и характеристика семи НЧ на основе солей цинка, магния, серебра, меди и железа, оценивается биотехнологическое применение синтезированных наночастиц и их использование в качестве современного подхода к защите растений от различных патогенов растений; а также их эффективность на прорастание семян и рост всходов пшеницы и льна.

### Глава 2. Материалы и методы.

**Подготовка экстракта.** Для приготовления растительного экстракта, 20 г порошка листьев смешали с 200 мл дистиллированной воды в колбе, кипятили и перемешивали в течение 1 ч. Смесь охлаждалась при комнатной температуре, затем была профильтрована с помощью тканевого фильтра и центрифугирована в течение 20 мин при 10000 об/мин. Надосадочная жидкость была профильтрована через бумажный фильтр для удаления всех твердых частиц.

**Биосинтез наночастиц.** Наночастицы получали путем смешивания определенного количества экстракта и 0,01 М раствора соли. В некоторых случаях синтез шел в щелочной среде с последующим прокаливанием.

**Характеристика биосинтезированных наночастиц.** После успешного биосинтеза НЧ их физические и химические свойства изучались с использованием различных методов определения характеристик. В первую очередь образование наночастиц подтверждается UV-Vis спектроскопией. После этого размер, форма, морфология, неоднородность и агрегация наночастиц изучались методом FESEM (просвечивающая эмиссионная сканирующая электронная микроскопия). За FESEM последовала EDS (энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия) для получения информации о химическом составе биосинтезированных наночастиц, которая дала нам некоторые данные о химическом составе НЧ. Фотонная кросс-корреляционная спектроскопия (PCCS) применялась для измерения гидродинамического размера, распределения по размерам и обнаружения агрегатов наночастиц в водной среде. Метод FT-IR (инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием), использовался для распознавания

функциональных органических групп, неорганических остатков и остатков биомолекул наряду с образованием наночастиц, которые могут попадать через восстановитель на поверхность синтезированных НЧ, образующихся при взаимодействии НЧ с покрывающими агентами. Синтезированные наночастицы подвергались рентгеноструктурным (XRD) исследованиям, чтобы подтвердить наличие НЧ, получить кристалличность или аморфную природу и обнаружить возможные примеси, рассчитать средний размер кристаллитов НЧ (Таблица 1).

**Таблица 1.** Краткое описание применяемых методов определения характеристик наночастиц

Технология	Основная полученная информация
<b>XRD (группа: методы, основанные на рентгене)</b>	Кристаллическая структура, состав, размер кристаллических зерен
<b>FT-IR</b>	Состав поверхности, связывание лиганда
<b>UV-Vis</b>	Оптические свойства, размер, концентрация, состояние агломерации, намеки на форму наночастиц
<b>FESEM-EDS</b>	Морфология, дисперсия наночастиц в клетках и других матрицах/носителях, точность, элементный анализ
<b>PCCS</b>	Гидродинамический размер, распределение по размерам, обнаружение агломератов

**Оценка антибактериальной активности биогенных наночастиц in vitro.** Для оценки антибактериальной активности наночастиц применялся метод серийного разведения в бульоне. Для этого использовали бактерию *Pseudomonas aeruginosa*, выделенную из клубней картофеля из Московской области.

Затем использовали культивирование на чашках Петри. Антибактериальную активность и эффективные концентрации для каждого НЧ изучали путем подсчета числа выросших колоний.

**Оценка антигрибной активности биогенных наночастиц.** В данном исследовании использовались патогенные грибы *Botrytis cinerea* Pers., *Pilidium concavum* (Desm.) Höhn. и *Pestalotia sp. B. cinerea* (штамм 19MFrR1) был выделен из корней клубники, выращенной в Московской области, и идентифицирован по культуральным и морфологическим признакам и методом ПЦР с последующим секвенированием. *Pilidium concavum* (Desm.) Höhn. (штамм 19FrPil1) и *Pestalotia sp.* (штамм 19FrPest1)- предоставлены Юлией Иветковой (ФГБУ "Всероссийский центр карантина растений", ФГБУ "ВНИИКР").

Для изучения антигрибных свойств NPs использовали два метода:

(I) Метод агарового разведения с небольшой модификацией применялся с использованием среды овсяного агара. Соответствующие количества суспензий НЧ с различной концентрацией добавляли к расплавленному агару под ламинарным колпаком, перемешивали, разливали в чашки Петри и давали остыть и затвердеть; эксперимент проводился в трех повторностях.

Штаммы *B. cinerea*, *P. concavum* и *Pestalotia sp.* были размножены и выращены в питательной среде перед использованием в эксперименте. Агаровые диски с мицелием диаметром 1 см, вырезанные из культур грибов семидневного возраста, помещали в центр каждой чашки Петри и инкубировали при комнатной температуре. Диаметр каждой колонии измеряли каждые три дня.

(II) Для определения способности прорастания спор *B. cinerea* использовали овсяную агаровую среду с добавлением различных концентраций наночастиц серебра.

#### **Влияние наночастиц на прорастание семян и рост рассады культурных растений**

**Приготовление первичных растворов:** Различные концентрации (50, 100, 150 ppm) NPs (C-ZnO, NC-ZnO, Zn, MgO, Ag, Cu и Fe), а также солей металлов ( $Zn(CH_2COO)_2$ ,  $MgSO_4$ ,  $AgNO_3$ ,  $CuSO_4$  и  $FeCl_3$ ) готовили в дистиллированной воде и диспергировали NPs с помощью ультразвуковых колебаний в течение 20 минут.

**Подготовка семян:** В данном эксперименте использовались семена пшеницы (*Triticum aestivum L.*) сорта Firuza 40 и льна (*Linum usitatissimum*) сорта Semi Lini. Каждая обработка состояла из 30 случайно отобранных семян в трех повторностях. Семена замачивали в приготовленной суспензии NPs или растворах солей металлов в течение примерно 12 часов.

**Проращивание семян in vitro.** Один лист фильтровальной бумаги помещали в чашку Петри и для смачивания бумаги добавляли 5 мл дистиллированной воды. Затем на каждую лист переносили по 30 наноразмерных семян. Чашки Петри инкубировались при комнатной температуре в течение 7 дней.

**Измерение физиологических показателей:** процент прорастания, длина побегов, длина корней, длина проростков, соотношение корня и побегов, индекс жизнеспособности всходов (SVI), индекс устойчивости к стрессу длины побега (SLSI) и индекс устойчивости к стрессу длины корня (RLSI) были рассчитаны на 2-м и 7-м днях. Средние значения и стандартные отклонения были получены из измерений в трех повторностях для обработки и контроля.

### **Глава 3. Результаты и обсуждение**

**Биосинтез наночастиц.** Исследования проводились с экстрактом листьев *Fragaria ananassa* (земляники), использованного в качестве источника природного восстанавливающего или стабилизирующего агента для разработки экологически чистого, экономически эффективного и безопасного процесса биосинтеза наночастиц на основе металлов, включая кальцинированный и некальцинированный оксид цинка, оксид магния, наночастицы серебра, меди и железа.

#### **Исследования методом УФ- спектроскопии биосинтезированных наночастиц показали следующие результаты:**

**Экстракт.** УФ-видимый спектр водного экстракта листьев земляники показывает максимум пика при 250 нм из-за  $\pi/\pi^*$  переходов, подтверждающих присутствие ароматических соединений внутри растительного экстракта [5].

**C-ZnO.** UV-Vis спектры наночастиц C-ZnO показали полосу поглощения при 355 нм, которая находится в характерном диапазоне длин волн наночастиц оксида цинка.

**NC-ZnO.** Спектры демонстрировали сильную полосу поглощения при 345 нм, что обусловлено поверхностным плазменным резонансом.

**Zn.** В диапазоне 200–800 нм наблюдается два пика UV-Vis спектра. Максимальный пик наблюдался при 270 нм, что связано с наночастиц Zn.

**MgO.** Различные пики наблюдались в ультрафиолетовой области, примерно от 200 до 300 нм.

**Ag.** Измерения UV-Vis показали, что наночастиц Ag демонстрируют один пик в области UV-Vis с центром в 457 нм.

**Cu.** Спектры поглощения Cu наночастиц в UV-Vis диапазоне показали полосу поглощения от 270 до 370 нм.



**Fe.** UV-Vis спектры наночастиц Fe показали заметный максимум поглощения при 270 нм и еще один низкоинтенсивный пик при 318 нм, тем самым подтверждая образование наночастиц Fe.

Все полученные данные подтверждают наличие исследуемых наночастиц.

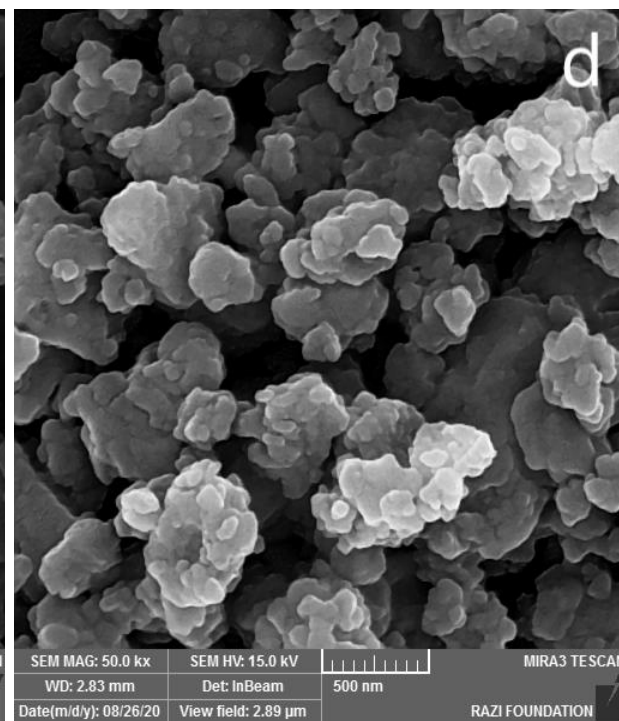
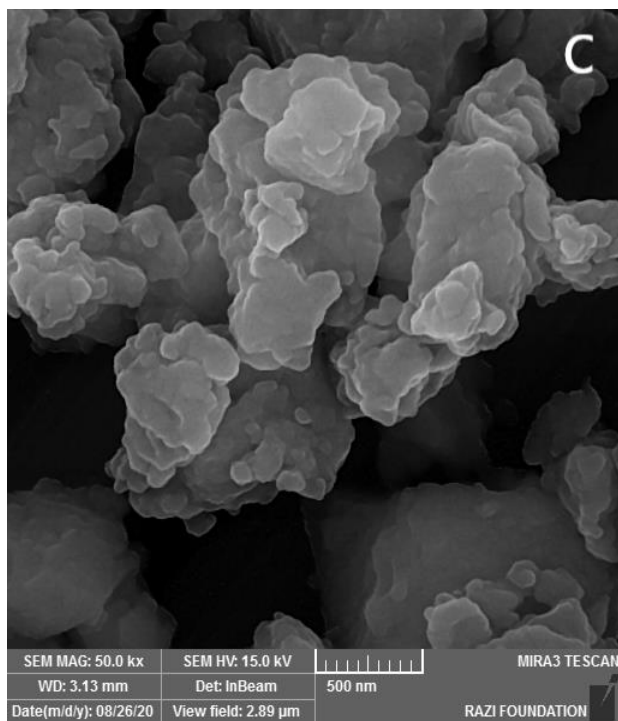
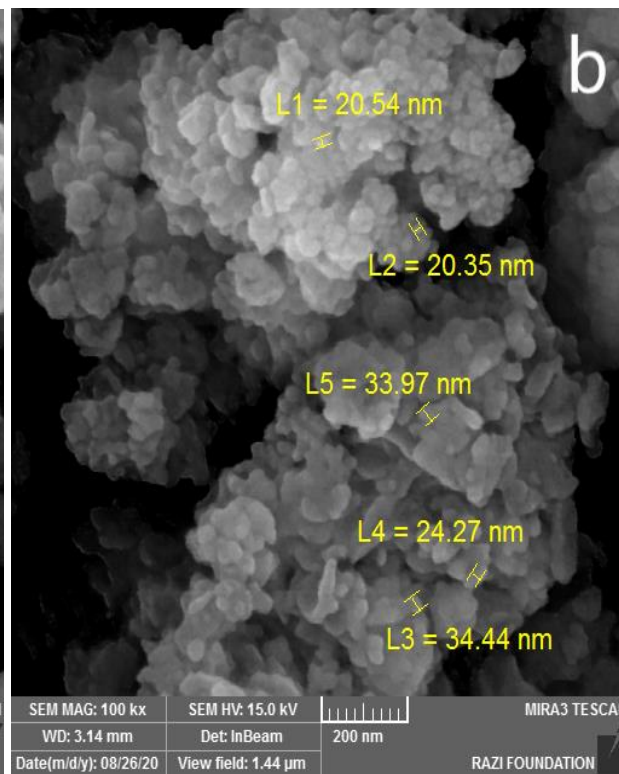
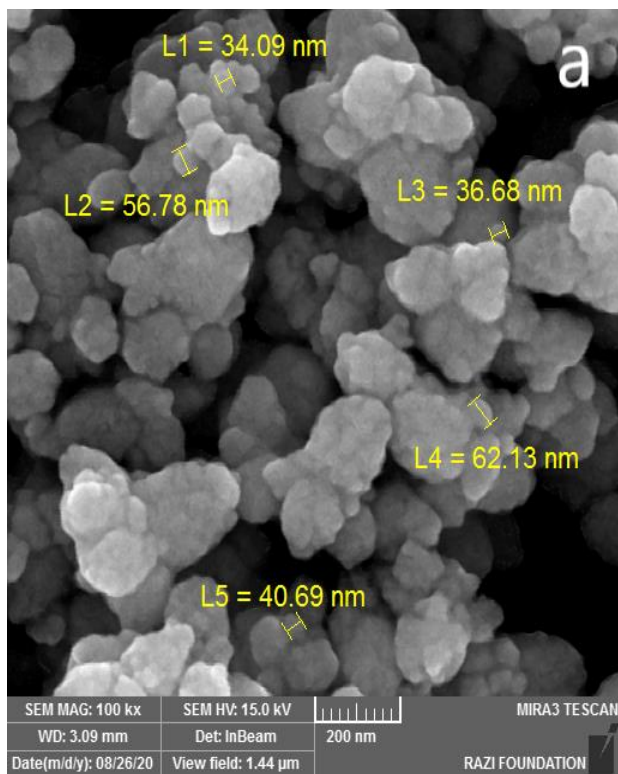
**Просвечивающая эмиссионная сканирующая электронная микроскопия (FESEM). Анализ изображений.**

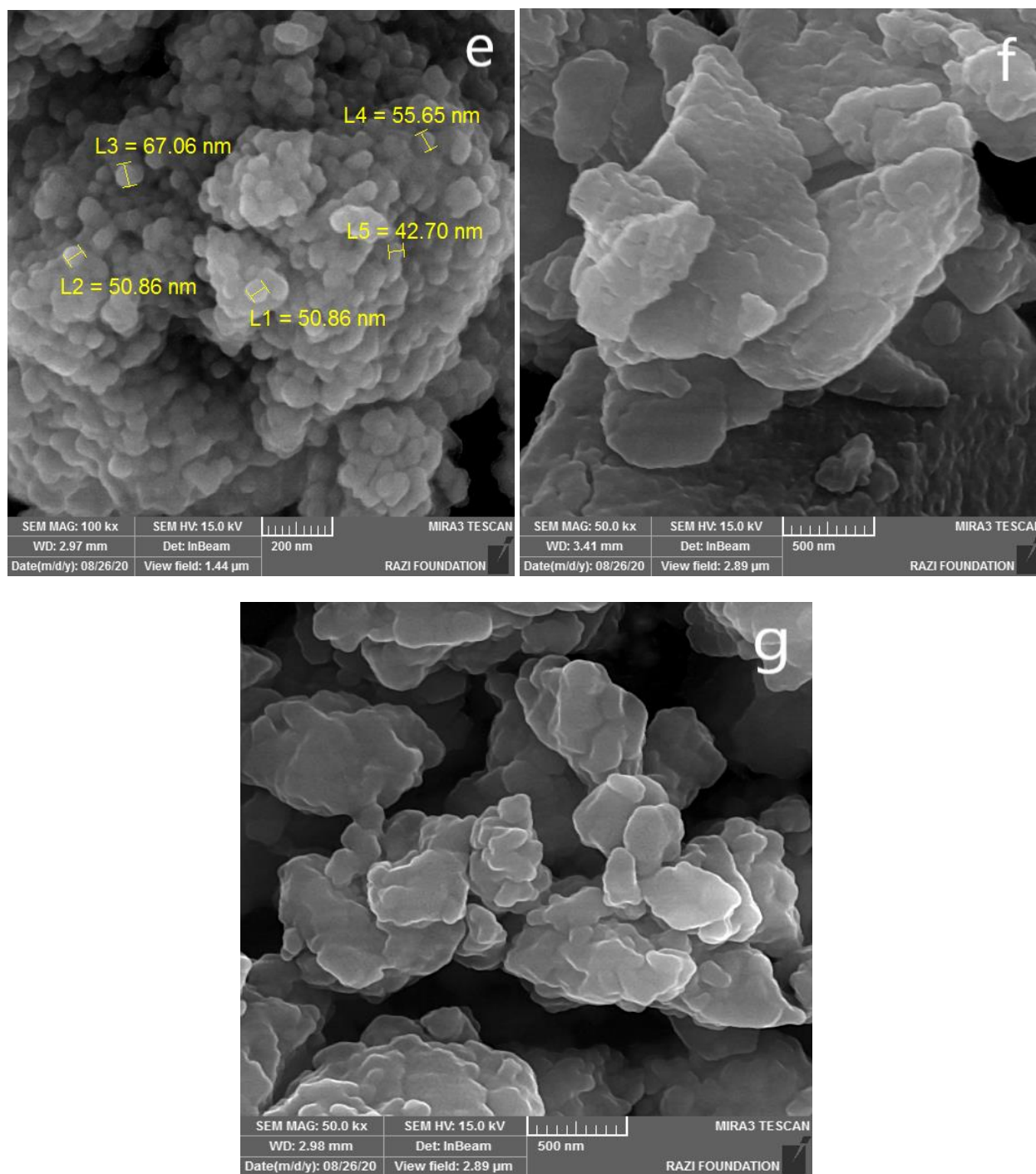
После подтверждения биосинтеза наночастиц сначала изменением цвета, а затем УФ-видимой спектроскопией, FESEM исследовали морфологию наночастиц, которая дает информацию о структурных свойствах, таких как размер, распределение по размерам, форма, неоднородность формы и агрегация НЧ.

Все биосинтезированные НЧ имели размеры в нанометровом диапазоне, при этом некоторые из них имели почти однородную структуру (C-ZnO, NC-ZnO, MgO, Ag НЧ), а другие имели гетерогенные структуры (Zn, Cu, Fe НЧ) (таблица 2 и рис. 1). Некоторые наночастицы были хорошо отделены друг от друга, в то время как большинство из них присутствовали в агломерированной форме. Поскольку наночастица определяется как частица, по крайней мере с одним размером в диапазоне нанометров, результаты FESEM подтвердили наноструктуру синтезированных частиц.

**Таблица 2.** Средний размер и форма синтезированных наночастиц.

Наночастицы	C-ZnO	NC-ZnO	Zn	MgO	Ag	Cu	Fe
Форма	Сферические	Сферические	Слабо листовые	Полусферические	Сферические	Листовые	Слабо листовые
Диаметр (нм)	40	25	100	65	50	180	130
Толщина	-	-	25	-	-	30	20
Стандартное отклонение	9	5	24	36	4	51	29
Однородность	+	+	-	+	+	-	-





**Рисунок 1.** Изображения FESEM биосинтезированных (a) C-ZnO NPs, (b) NC-ZnO NPs, (c) Zn NPs, (d) MgO NPs, (e) Ag NPs, (f) Cu NPs, (g) Fe NPs.

**Анализ фотонной кросс-корреляционной спектроскопии (PCCS).**

Среднее распределение гидратированных частиц по размерам наночастиц, синтезированных с использованием настоящей новой зеленой стратегии приведено в таблице 3. Наблюдаемые результаты показали, что размер, полученный из PCCS, не коррелировал с наблюдениями электронной микроскопии, поскольку эти результаты

связаны с гидратированными скоплениями наночастиц, а не с одиночными. Биосинтезированные наночастицы существовали в виде агломерации мелких отдельных наноразмерных частиц, поскольку существует значительная тенденция к образованию неоднородных по размеру и форме агломератов.

Индекс полидисперсности (PDI) указывает на неоднородность образца по размеру и может возникать из-за распределения размеров в образце или агломерации образца. По результатам PCCS C-ZnO имел высокую полидисперсность, NC-ZnO и Zn имели хорошую монодисперсность, MgO имели среднюю монодисперсность, Ag, Cu и Fe имели хорошую монодисперсность.

**Таблица 3.** Средний размер гидратированных частиц биосинтезированных наночастиц и размер частиц, полученных из электронной микроскопии, стандартное отклонение, средний гидродинамический диаметр частиц агломератов, индекс полидисперсности, полимодальное распределение наночастиц.

Наночастицы	C-ZnO	NC-ZnO	Zn	MgO	Ag	Cu	Fe
Размер частиц (нм)	995	210	525	1551	133	795	559
Размер частиц микроскопе (нм)	$V_{40}$	25	100	65	50	30×180	20×130
Стандартное отклонение	1026	15.16	37.84	278.9	4.47	59.50	31.53
Индекс полидисперсности	1.06	0.005	0.005	0.32	0.001	0.005	0.003
Полимодальное распределение	Высокая полидисперсность	Хорошая монодисперсность	Хорошая монодисперсность	Монодисперсность среднего диапазона	Хорошая монодисперсность	Хорошая монодисперсность	Хорошая монодисперсность

### Инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием (FTIR).

Полученные спектры FTIR подтвердили взаимодействие биомолекул с синтезированными наночастицами. Алифатические и ароматические структуры содержат широкий спектр функциональных групп, например, циано (–CN), меркапто (–SH), карбоновую кислоту (–COOH) и amino (–NH<sub>2</sub>). Они обладают высоким сродством к функционализации наночастиц благородных металлов и, следовательно, полезны в качестве функциональных групп, защищающих поверхность. В таблице 4 приведены полосы поглощения всех спектров, полученных из экстракта и наночастиц.

**Таблица 4.** Пики поглощения экстракта и синтезированных НЧ, полученные на ИК-Фурье спектрофотометре, и их соответствующие функциональные группы.

Absorption Peak Position (cm <sup>-1</sup> )								Functional Group
Extr act	C-ZnO	NC-ZnO	Zn	MgO	Ag	Cu	Fe	

3539	3553	3553	3553	3554	3552	3553	3523	
-	3480	3475	3479	3482	3479	3479	3479	O-H alcohol and phenol
-	3415	3411	3416	3417	3416	3416	3416	N-H primary amine
3392	-	-	-	-	-	-	-	N-H aliphatic primary amine
-	3238	3237	3239	3233	3239	3239	3239	C-H alkene
-	-	-	-	-	-	2923	2922	aliphatic C-H/ secondary amine/ amine salt
-	-	-	-	2362	-	-	-	CO <sub>2</sub>
2028	2030	2028	2039	1996	2090	2039	2039	C-H aromatic
1624	1621	1620	1622	1621	1622	1622	1622	C=O/C=C aromatic ring
-	1513	-	-	1549	-	-	-	N-O nitro/C=C
-	1424	-	-	-	-	-	-	N-H aromatic amine
-	-	1395	-	-	-	-	-	Sulphate S=O
-	-	-	-	-	-	1327	-	
1084	1079	1069	1148	1078	1151	1151	1144	C-O/ C-N amine/C-OH bending
-	-	-	-	871	-	-	-	C-H Alkane/ alkene/aromatics/
770	-	-	-	-	-	-	-	C-S thiol or thioether
621	623	623	621	626	621	621	622	C-H alkyne/O-H alcohol (out of plane bend)
474	481	482	480	486	479	479	480	Organometalics/
423	418	418	418	-	418	-	418	S-S sulphides (stretch)

### **Рентгеноструктурный анализ (XRD)**

**C-ZnO.** Число брэгговских отражений для биосинтезированных кальцинированных НЧ ZnO появляется при  $2\theta = 31,77^\circ$  (100),  $34,44^\circ$  (002),  $36,26^\circ$  (101),  $47,55^\circ$  (102),  $56,61^\circ$  (110),  $62,89^\circ$  (103),  $66,39^\circ$  (200),  $67,97^\circ$  (112),  $69,10^\circ$  (201),  $72,61^\circ$  (004),  $76,99^\circ$  (202),  $81,43^\circ$  (104) и  $88,65^\circ$  (203).

Используя уравнение Шеррера, рассчитанный средний размер частиц биосинтезированных НЧ составляет 25,3 нм для НЧ C-ZnO, что соответствует среднему диаметру частиц, определенному FESEM.

**NC-ZnO.** Пики для биосинтезированных некальцинированных НЧ ZnO появляются при  $2\theta = 31,73^\circ$  (100),  $34,38^\circ$  (002),  $36,21^\circ$  (101),  $47,48^\circ$  (102),  $56,53^\circ$  (110),  $62,77^\circ$  (103),  $66,30^\circ$  (200),  $67,86^\circ$  (112),  $69,00^\circ$  (201),  $72,46^\circ$  (004),  $76,86^\circ$  (202),  $81,27^\circ$  (104) и  $89,49^\circ$  (203) соответственно.

Для НЧ NC-ZnO рассчитанный средний размер частиц с использованием уравнения Шеррера составлял 27,46 нм. Эти результаты очень близки к размерам частиц, полученным с помощью анализа FESEM.

**Zn.** На диаграмме не видно характерных дифракционных пиков, что свидетельствует о том, что синтезированные наночастицы цинка имеют в основном аморфную природу, а не кристаллическую, или размер отдельных наночастиц меньше, чем предел обнаружения XRD. Также можно было предположить, что количество кристаллов было ниже, чем уровень обнаружения XRD.

**MgO.** Широкоугольная дифрактограмма указывает на присутствие кубической структуры НЧ MgO, определяемой по дифракционным пикам при значениях  $2\theta$ :  $37,04^\circ$  (111),  $43,04^\circ$  (200),  $62,49^\circ$  (220),  $47,93^\circ$  (311) и  $78,89^\circ$  (222).). На рентгенограмме наночастиц MgO не было обнаружено никаких последующих пиков Mg (OH)<sub>2</sub>, Mg или других примесей, что свидетельствует о высокой чистоте синтезированных нанокристаллов. Средний размер зерна 69,6 нм был рассчитан с использованием уравнения



Шеррера, которое близко согласуется с размером 65 нм, полученным из FESEM. Широкие пики указывают на уменьшение кристалличности, что внутренне указывает на образование частиц меньшего размера.

**Ag.** XRD наночастиц серебра между значениями  $2\theta$  от  $20^\circ$  до  $90^\circ$  демонстрирует кристаллическую природу и согласуется с ранее опубликованными данными, показывающими пики наночастиц серебра [48]. Пики дифракции Брэгга для биосинтезированных НЧ Ag наблюдаются при  $2\theta = 38,11^\circ$  (111),  $44,30^\circ$  (200),  $64,45^\circ$  (220),  $77,40^\circ$  (311) и  $81,55^\circ$  (222). Острые дифракционные пики подтверждают кристаллическую природу образца. Пики дифракции других примесей не наблюдались, что свидетельствует о том, что эти пики принадлежали чистым НЧ Ag.

Средний размер зерен НЧ Ag, рассчитанный по формуле Шеррера, составлял 40,9 нм, что близко к полученному размеру 50 нм, полученному в результате анализа FESEM.

**Cu.** Рентгенограмма наночастиц Cu, на которой не показаны пики, относящиеся к кристаллической структуре. Согласно результатам, биосинтезированные НЧ Cu аморфны и / или размер частиц слишком мал. Более того, можно было сделать вывод, что количество нанокристаллов было ниже, чем уровень обнаружения XRD.

Можно видеть, что дифрактограммы состоят из пика небольшой формы между углами дифракции  $20^\circ$  и  $30^\circ$ , что может указывать на некоторую кристаллическую фазу, смешанную с первичными аморфными структурами. Картина XRD согласуется с предыдущими сообщениями, но с небольшими отличиями.

**Fe.** На диаграмме нет заметного дифракционного пика, соответствующего кристаллической природе НЧ Fe. Результаты относятся к аморфным частицам и не показывают образования кристаллических фаз. Это также может быть связано с тем, что процент аморфных частиц преобладает над количеством кристаллических частиц. Другая вероятность состоит в том, что размер НЧ невелик и не может быть обнаружен методом XRD.

#### **Оценка антибактериальной активности биогенных наночастиц Ag и Cu in vitro.**

Эксперименты *in vitro*, проведенные для оценки антимикробной активности биосинтезированных НЧ в отношении бактерий *P. aeruginosa*, показали, что ингибирующий эффект НЧ Ag возрастал с увеличением их концентрации. Эффективная концентрация ( $EC_{50}$ ) составляла 4 ppm, а минимальная бактерицидная концентрация (МБК) составляла 10 ppm.

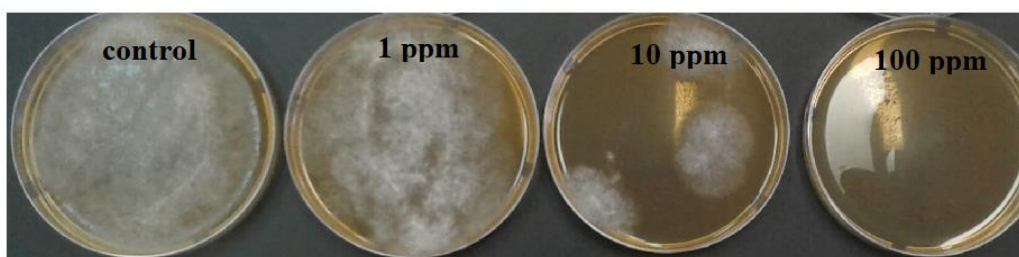
Полученные методом зеленого синтеза наночастицы меди также продемонстрировали антибактериальную активность в отношении грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa*. Ингибирующее действие НЧ Cu усиливается с увеличением их концентрации. Эффективная концентрация ( $EC_{50}$ ) составляла 2,2 мг/мл, а минимальная бактерицидная концентрация (МБК) составляла 5 мг/мл. Однако МБК наночастиц Cu оказалась больше, чем МБК наночастиц Ag, что указывает на более высокую антибактериальную активность наночастиц Ag, по сравнению с наночастицами Cu.

#### **Оценка антигрибной активности синтезированных наночастиц Ag in vitro**

Исследования, проведенные по методике разбавления агара показали, что биосинтезированные НЧ Ag проявляют антигрибную активность в отношении *B. cinerea* и *P. conspvum* и способны подавлять рост колоний на 28 и 65,36% по сравнению с контролем, соответственно (табл. 5 и 6). Согласно результатам, представленным в таблицах 5 и 6, процент ингибирования снижался со временем к концу эксперимента, а также процент

ингибирования увеличивался с возрастанием дозы НЧ. Вероятно, это связано с высокой плотностью НЧ Ag, при которой среда была способна насыщаться и соединяться с грибными гифами, что дезактивировало фитопатогена. Для *B. cinerea* самый низкий процент ингибирования составлял 5,7% для концентрации НЧ 1 ppm на 9-й день по сравнению с 28%, полученными при 100 ppm в тот же день. Для *P. concavum* самый низкий процент ингибирования составил 6,5%, для концентрации 1 ppm на 9-й день по сравнению с 65,36% ингибирования, достигнутыми при концентрации 100 ppm. Согласно значениям процентного ингибирования, приведенным в таблицах 5 и 6, можно сделать вывод, что присутствие НЧ Ag в культурах влияло на рост *P. concavum* больше, чем *B. cinerea*. Для обоих грибов получен более высокий ингибирующий эффект при концентрации наночастиц Ag 100 ppm по сравнению с другими концентрациями.

**Подавление прорастания спор.** Прорастание спор полностью ингибировалось при 100 ppm НЧ Ag (рис. 3).



**Рисунок 3.** Ингибирование прорастания спор *B. cinerea* НЧ Ag с концентрациями 0 (в качестве контроля), 1, 10 и 100 ppm, диспергированных в агаризованной среде.

**Таблица 5.** Рост *B. cinerea* (диаметр колонии, мм), обработанный различными концентрациями биогенных НЧ Ag, в течение 9 дней. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение для трех повторов.

Концентрация (ppm)	6-й день колонии (мм)	Диаметр 9-й день колонии (мм)	Диаметр	Подавление роста% (9 день)
Контроль	27,5 $\pm$ 0,25	70,5 $\pm$ 1,0		-
1	27,3 $\pm$ 0,25	66,3 $\pm$ 2,2		5,7 $\pm$ 1,8%
10	11,9 $\pm$ 1,6	60,5 $\pm$ 3,2		14,25 $\pm$ 2,9%
100	5,0 $\pm$ 0,1	50,3 $\pm$ 4,9		28 $\pm$ 4,1%

**Таблица 6.** Рост *P. concavum* (диаметр колонии, мм), обработанный различными концентрациями биогенных НЧ Ag, в течение 9 дней. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение для трех повторов.

Концентрация (ppm)	6-й день колонии (мм)	Диаметр 9-й день колонии (мм)	Диаметр	Подавление роста% (9 день)
Контроль	3,5 $\pm$ 0,25	46,2 $\pm$ 6,5		-
1	1,5 $\pm$ 0,5	43,2 $\pm$ 4,2		6,5 $\pm$ 1,7%
10	1,5 $\pm$ 0,1	41,6 $\pm$ 3,2		10 $\pm$ 2,4%
100	0,5 $\pm$ 0,1	16 $\pm$ 1,0		65,36 $\pm$ 2,1%

**Оценка in vitro антигрибной активности биогенных наночастиц Cu.** Грибы *B. cinerea* использовали для исследования антигрибной активности НЧ Cu методом разведения в агаровой среде.

Полученные результаты показали, что не наблюдается значительного ингибирования роста *B. cinerea* в контроле, при 1 ppm и 10 ppm, но было  $25 \pm 0,3\%$  ингибирования роста для образцов, обработанных концентрацией 100 ppm. Увеличение концентрации биосинтезированных НЧ Cu до 100 ppm приводило к уменьшению радиуса колонии и процента ингибирования роста *B. Cinerea* (Таблица 7).

Таблица 7. Рост *B. cinerea* (диаметр колонии, мм), обработанный различными концентрациями биогенных НЧ Cu, в течение 9 дней. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение для трех повторов.

Концентрация (ppm)	9-й день Диаметр колонии (мм)	Подавление роста% (9 день)
Контроль	80	-
1	72	10%
10	64	20%
100	60	25%

**Сравнительный анализ влияния биогенных НЧ и их солей-аналогов на физиологические характеристики проростков пшеницы и льна.**

Биосинтезированные нами наночастицы в различных концентрациях неодинаково влияли на рост и развитие растений пшеницы и льна. Наблюдались как эффекты «стимуляции», так и «фитотоксичности», а в некоторых случаях не отмечалось значительного влияния НЧ и их солей-аналогов на прорастание семян и развитие проростков. (Рис.4 и 5).

На 7-й день эксперимента при сравнительном анализе влияния биосинтезированных НЧ в применяемых концентрациях наиболее эффективными в развитии побегов и корней были НЧ Zn, а менее эффективными для пшеницы оказались НЧ Ag и для семян льна – НЧ Fe.

#### **Результаты обработки семян пшеницы наночастицами и их аналогами солями:**

В среднем по результатам опытов на проростках пшеницы наночастицы C- ZnO, NC-ZnO и Zn показали увеличение длины корня на 27%, 41% и 31% соответственно, в то время как у растений, обработанных ацетатом цинка, длина корня увеличилась лишь на 7% по сравнению с контролем.

При этом вышеперечисленные наночастицы не оказали существенного влияния на длину побега проростков пшеницы.

Обработки наночастицами MgO привели к увеличению длины корня на 30%, а MgSO<sub>4</sub> – к уменьшению длины корня на 9% по сравнению с контролем. НЧ MgO не оказали существенного влияния на длину побегов, в то время как применение MgSO<sub>4</sub> показало снижение длины корня на 6%.

Наночастицы Ag и соль AgNO<sub>3</sub> отрицательно влияли как на длину корней пшеницы (уменьшение на 20% и 41% соответственно по сравнению с контролем), так и на длину побегов (уменьшение на 20% и 41% соответственно).



Наночастицы Cu оказали положительное влияние на длину корней и побегов (увеличение на 14% и 9% соответственно), а обработки CuSO<sub>4</sub> отрицательно повлияли на длину корней и побегов (уменьшение на 73% и 30% соответственно).

Наночастицы Fe и соль FeCl<sub>3</sub> оказали незначительное положительное влияние как на длину корней, так и на длину побегов (увеличение от 5 до 9%).

Таким образом, следует отметить, что все исследованные наночастицы, за исключением НЧ Ag, лучше воздействовали на семена пшеницы, чем их соли-аналоги.

#### **Результаты обработки семян льна наночастицами и их аналогами солями:**

- Сравнивая результаты использования различных концентраций наночастиц C-ZnO, NC-ZnO и Zn следует отметить, что все они повлияли на увеличение длины корня в среднем на 90%, 118% и 145% соответственно по сравнению с контролем, в то время как при обработке ацетатом цинка длина корня в среднем увеличилась на 124%.

Кроме того, наночастицы C-ZnO, NC-ZnO и Zn продемонстрировали увеличение длины побегов в среднем на 13%, 20% и 24% соответственно по сравнению с контролем. При этом, у растений, обработанных ацетатом цинка, длина корня увеличилась на 22%.

- Наночастицы MgO и соль MgSO<sub>4</sub> показали увеличение длины корня на 52% и 117% соответственно. Кроме того, обработки наночастицами MgO и солью MgSO<sub>4</sub> привели к увеличению длины побегов на 21% и 44% соответственно, что свидетельствует о более слабом стимулирующем эффекте наночастиц MgO по сравнению с обработками аналогичной солью.

- Наночастицы Ag положительно влияли как на длину корня, так и на длину побега (увеличение на 69% и 30% соответственно), но обработки солью AgNO<sub>3</sub> отрицательно повлияли на длину побега (уменьшение на 44% по сравнению с контролем) и не оказали существенного влияния на длину корня.

- Наночастицы Cu оказали положительное влияние как на длину корня, так и на длину побега (увеличение на 37% и 8% соответственно), но обработки солью CuSO<sub>4</sub> отрицательно повлияли на длину корня (уменьшение на 40% по сравнению с контролем) и не оказали существенного влияния на длину побега.

- Наночастицы Fe отрицательно влияли на длину корня (уменьшение на 10% по сравнению с контролем) и не оказывали существенного влияния на длину побега, в то время как обработки солью FeCl<sub>3</sub> показали увеличение длины корней и побегов на 46% и 44% соответственно.

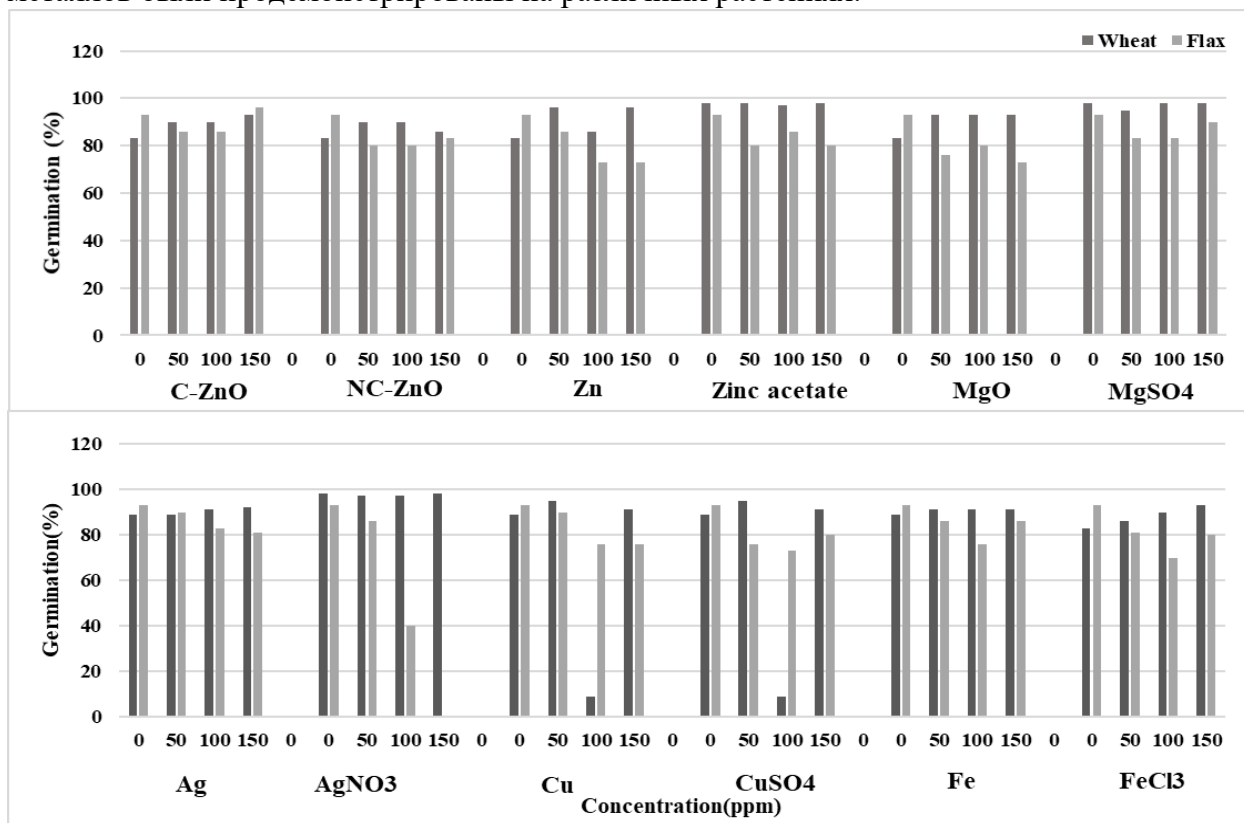
В целом, следует отметить, что на семена льна наночастицы Zn, Ag и Cu оказали существенно лучшее влияние, чем их аналоги соли.

Результаты опытов показали, что применяемые концентрации НЧ Ag являются токсичными для пшеницы, но стимулирующими для льна. Поскольку все условия опыта одинаковы для всех образцов, можно сделать вывод, что различия связаны с типом семян. Среди испытанных солей металлов наибольшее стимулирующее действие оказывал ацетат цинка, а CuO<sub>4</sub> — наиболее токсичное как для льна, так и для пшеницы.

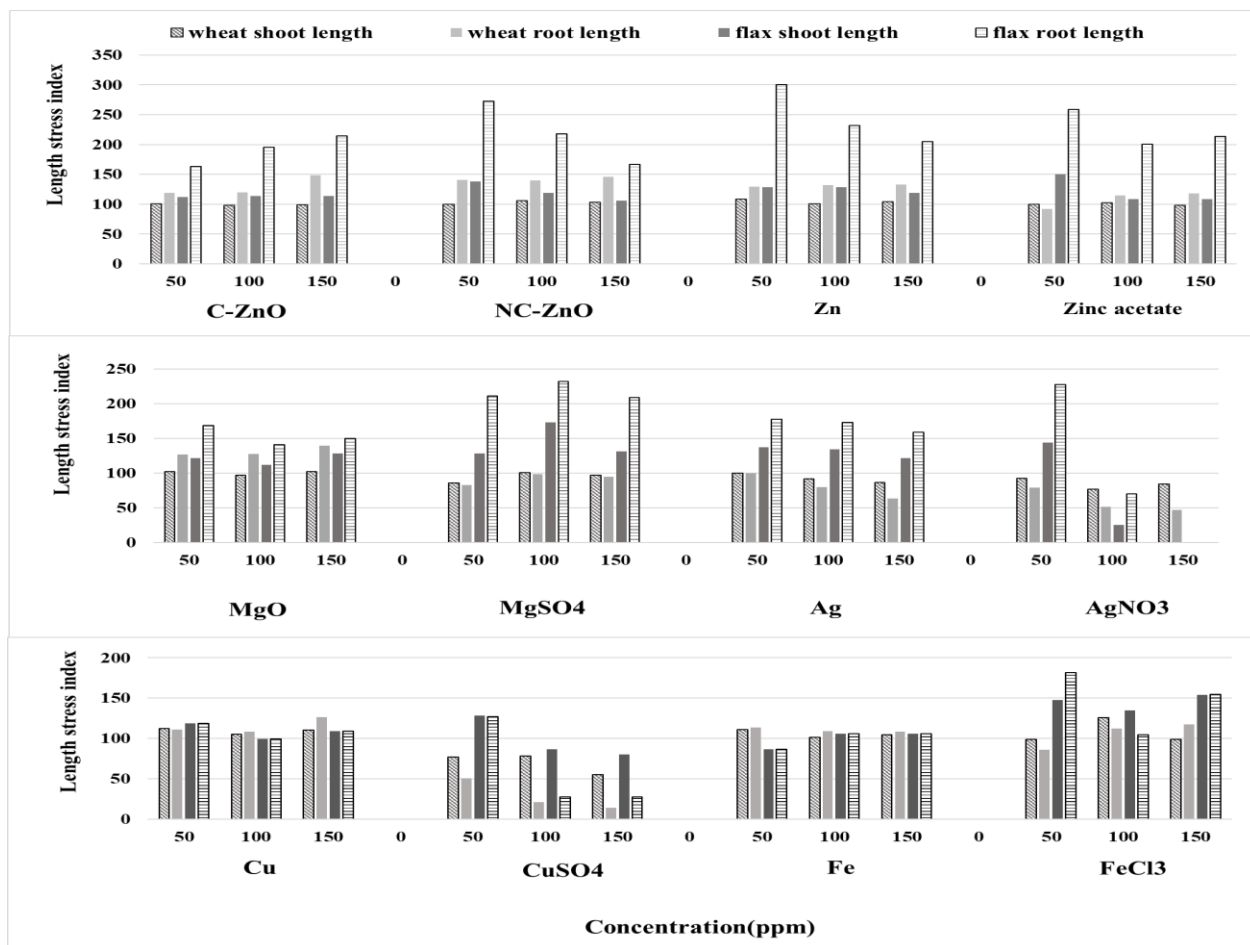
Положительный эффект находился в корреляции с концентрацией НЧ, продолжительностью их применения, средой произрастания культуры и видом растения. Среди измеряемых параметров длина корня оказалась более чувствительной, чем длина побега. Длина корня льна более чувствительна к обработке НЧ и солью, а длина побега пшеницы менее чувствительна. Хотя факторы, влияющие на удлинение корней и побегов после воздействия НЧ, еще не ясны, можно предположить, что полимерная сеть слизи семян

льна улавливает НЧ или ионы металлов, усваиваемость их для семян льна отличалась от пшеницы в период наших исследований.

На рисунке 4 представлен сравнительный анализ изменения всхожести семян в зависимости от концентраций, используемых НЧ и солей. В большинстве случаев в семенах пшеницы было больше G%, чем в семенах льна. 150 ppm раствора  $AgNO_3$  оказало токсическое действие на семена льна, при этой обработке отсутствовало прорастание. Аналогичным образом, сообщалось, что НЧ на основе металлов оказывают двойное воздействие на прорастание семян. Положительные эффекты обработки НЧ на основе металлов были продемонстрированы на различных растениях.



**Рисунок 4:** Влияние дозы НЧ и соответствующих им солей металлов на процент всхожести семян пшеницы и льна на 7-й день эксперимента.



**Рисунок 5:** Влияние дозы НЧ и соответствующих им солей металлов на индекс стрессоустойчивости побегов и корней (LI и RLI соответственно) семян пшеницы и льна на 7-й день эксперимента.

### Заключение

На основании проведенного исследования где характеристики биосинтезированных наночастиц были изучены с использованием УФ-видимой спектроскопии, просвечивающей эмиссионной сканирующей электронной микроскопии (FESEM) в сочетании с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией (EDS), фотонной кросс-корреляционной спектроскопией (PCCS), инфракрасной спектроскопией с преобразованием Фурье (FT-IR) и рентгеновской дифракционной спектроскопией (XRD) можно сделать следующие выводы:

- 1) Водный экстракт листьев земляники можно использовать в зеленом методе синтеза в качестве восстановителя и стабилизирующего агента в экологически чистом производстве металлических НЧ (C-ZnO, NC-ZnO, Zn, MgO, Ag, Cu, Fe)
- 2) По результатам FESEM получены частицы размером 40 нм для C-ZnO, 25 нм для NC-ZnO, 100×25 нм для Zn, 65 нм для MgO, 50 нм для Ag, 180×30 нм для Cu, 130×20 нм для наночастиц Fe. EDS подтверждает химический состав наночастиц. По результатам наночастицы PCCS C-ZnO имели высокую полидисперсность, NC-ZnO и Zn имели хорошую монодисперсность, MgO имели среднюю монодисперсность, Ag, Cu и Fe имели хорошую монодисперсность. Полученные ИК-Фурье спектры

подтвердили взаимодействие биомолекул с синтезированными наночастицами. XRD показал, что C-ZnO, NC-ZnO, MgO и Ag были кристаллическими, а Zn, Cu и Fe были аморфными.

- 3) Установлено как положительное, так и токсичное влияние синтезированных НЧ с солями металлов (Zn (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>) на проростки пшеницы и льна. Согласно полученным результатам, реакция растений на металлосодержащие наночастицы и соли металлов в основном зависит от типа металла, вида растений, концентрации суспензии НЧ или солевого раствора, условий воздействия и стадии роста.

На проростках пшеницы наночастицы C-ZnO, NC-ZnO и Zn показали увеличение длины корня на 27%, 41% и 31% соответственно, Обработки наночастицами MgO привели к увеличению длины корня на 30%, Наночастицы Cu оказали положительное влияние на длину корней и побегов (увеличение на 14% и 9% соответственно), при этом наночастицы Ag оказали токсичное влияние как на формирование корней, так и проростков пшеницы.

На проростках льна наночастицы C-ZnO, NC-ZnO и Zn оказали положительное влияние на увеличение длины корня в среднем на 90%, 118% и 145% соответственно по сравнению с контролем, а также продемонстрировали увеличение длины побегов в среднем на 13%, 20% и 24% соответственно. Наночастицы Ag положительно влияли как на длину корня, так и на длину побега (увеличение на 69% и 30% соответственно), Наночастицы Cu оказали положительное влияние как на длину корня, так и на длину побега (увеличение на 37% и 8% соответственно), при этом наночастицы Fe оказали токсичное влияние на формирование корня растениями льна.

- 4) Установлена антибактериальная активность и значительное подавление роста колоний фитопатогена *Pseudomonas* синтезированными НЧ, включающие C-ZnO, NC-ZnO, Ag и Cu. Для НЧ Ag расчетная эффективная концентрация (EC<sub>50</sub>) составила 4 ppm, а минимальная бактерицидная концентрация (МБК) – 10 ppm. Для НЧ Cu расчетная EC<sub>50</sub> составила 2,2 мг/мл, а МБК – 5 мг/мл. Для НЧ C-ZnO расчетная EC<sub>50</sub> составила 42 мг/мл, а МБК – 200 мг/мл. Для НЧ NC-ZnO EC<sub>50</sub> составила 26 мг/мл, а МБК – 150 мг/мл.
- 5) Отмечена антигрибная активность синтезированных НЧ для патогенных грибов *Botrytis cinerea*, *Pilidium concavum*, в отношении же *Petalotia* sp. существенного эффекта не наблюдалось. Наиболее существенный эффект на подавление колоний *B. cinerea* и *P. concavum* оказали НЧ Ag., подавляющие на 9-й день в концентрации 0,1 мг/мл колонии *B. cinerea* в среднем на 28%, колонии *P. concavum* – в среднем на 65,36%. Прорастание спор *B. cinerea* полностью ингибировалось при 100 ppm НЧ Ag.

### Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи в изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science

1. Bayat, M.; Zargar, M.; Murtazova, K.S; Nakhaev, M.R.; Shkurkin, S.I. Ameliorating Seed Germination and Seedling of Nano-Primed Wheat and Flax Seeds Using Seven Biogenic Metal-Based Nanoparticles, *Agronomy* **2022**, *12*, 811, 18.
2. Bayat, M.; Zargar, M.; Astarkhanova, T.; Pakina, E.; Ladan, S.; Lyashko, M.; Shkurkin, S.I. Facile Biogenic Synthesis and Characterization of Seven Metal-Based Nanoparticles Conjugated

with Phytochemical Bioactives Using *Fragaria ananassa* Leaf Extract. *Molecules* **2021**, 26, 10, 3025-3049, 24.

3. Bayat, M.; Zargar, M.; Chudinova, E.; Astarkhanova, T.; Pakina, E. In Vitro Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activity of Biogenic Silver and Copper Nanoparticles: The First Report of Applying Biogenic Nanoparticles against *Pilidium concavum* and *Pestalotia* sp. Fungi. *Molecules* **2021**, 26, 5402-5413, 11.

4. Bayat, M.; Chudinova, E.; Zargar, M.; Lyashko, M.; Louis, K.; Adenew, K. Phyto-assisted green synthesis of zinc oxide nanoparticles and its antibacterial and antifungal activity. *Research on Crops* **2019**, 20, 4, 725-730.

5. Bayat, M.; Pakina, E.; Astarkhanova, T.; Nasirsediqi, A.; Zargar, M.; Vvedenskiy, V. Review on agro-nanotechnology for ameliorating strawberry cultivation. *Research on Crops* **2019**, 20, 4, 731-736.

#### *Статьи в изданиях из списка ВАК*

1. Bayat, M. Biosynthesis and characterization of magnesium hydroxide nanoparticles. *ПРОБЛЕМЫ РАЗВИТИЯ АПК РЕГИОНА* **2021**, 1 (45) 66–70.

2. Bayat, M.; Lakzian, A. The role of nanotechnology for improving crop production. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries* **2019**, 14, 4, 297-305.

3. Astarkhanova I.R., Astakhanova T.S., Alibalayev D.A., Magomedov A.Z., Bayat M., The Spread of San Jose Scale (*Quadraspidiotus Perniciosus*) and phytosanitary measures to combat it. *ПРОБЛЕМЫ РАЗВИТИЯ АПК РЕГИОНА*. **2020**, 2, 42, 14-21.

4. Bayat, M.; Pakina, E.; Astarkhanova, T.; Zargar M. Positive and negative effects of different nanomaterials on seed germination and seedling growth of wheat. *ПРОБЛЕМЫ РАЗВИТИЯ АПК РЕГИОНА* **2022**, 4 (54). 66–69.

#### *Материалы научных конференций*

1. Bayat, M.; Astarkhanova, T. ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ. Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию Дагестанского государственного аграрного университета имени М. М. Джембулатова. 21–27 сентябрь **2017**.

2. Bayat, M. Effects of three production and input management strategies on the yield components and economics of spring wheat varieties. «Инновационные процессы в сельском хозяйстве». 25-27 апреля 2019, М.: РУДН. 39-46.

## АННОТАЦИЯ

### БИОСИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОЧАСТИЦ И ОЦЕНКА ИХ ПЕРСПЕКТИВНОГО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Наночастицы на основе Zn, Mg, Fe, Cu (микроэлементы) и Ag синтезированы экологически безопасным способом (зеленый синтез), изучены их физические и химические свойства с использованием различных методов характеристики. Характеристики биосинтезированных наночастиц изучали с помощью УФ-видимой спектроскопии, трансмиссионной эмиссионной сканирующей электронной микроскопии (FESEM) в сочетании с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией (EDS), фотонной кросс-корреляционной спектроскопией (PCCS), инфракрасной спектроскопией с преобразованием Фурье (FT-ИК) и рентгеновской дифракционной спектроскопии (РСА). Полученные в данном исследовании результаты показывают, что водный экстракт листьев земляники может быть использован в методе зеленого синтеза в качестве восстановителя и стабилизатора в экологически чистом производстве НЧ металлов (С-ZnO, NC-ZnO, Zn, MgO, Ag, медь, железо)

Эти наночастицы были протестированы и исследованы на предмет их антимикробной активности в отношении различных патогенов (*Pseudomonas aeruginosa*, *Botrytis cinerea*, *Pilidium concavum* (Desm.) Höhn. и *Pestalotia* sp.), а также в отношении прорастания семян и роста всходов пшеницы (*triticum aestivum*) и льна (*Linum usitatissimum*). Установлена антибактериальная активность и значительное подавление роста колоний фитопатогена *Pseudomonas* синтезированными НЧ, в том числе С-ZnO, NC-ZnO, Ag и Cu.

## SUMMARY

### BIOSYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NANOPARTICLES AND EVALUATING THEIR PROSPECTIVE BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

Nanoparticles based on Zn, Mg, Fe, Cu (trace elements) and Ag were synthesized in an environmentally friendly way (green synthesis), their physical and chemical properties were studied using various characterization methods. The characteristics of biosynthesized nanoparticles were studied using UV-Visible Spectroscopy, Transmission Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM) in combination with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS), Photon Cross-correlation Spectroscopy (PCCS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and X-ray diffraction spectroscopy (XRD). The obtained in this research results show that aqueous extract of strawberry leaves can be used in the green synthesis method as a reducing agent and stabilizing agent in an environmentally friendly production of metal NPs (C-ZnO, NC-ZnO, Zn, MgO, Ag, Cu, Fe)

These nanoparticles were tested and investigated for their antimicrobial activities against different pathogens (*Pseudomonas aeruginosa*; *Botrytis cinerea*; *Pilidium concavum* (Desm.) Höhn. and *Pestalotia* sp.) and on seed germination and germination growth of wheat (*triticum aestivum*) and flax (*Linum usitatissimum*). Antibacterial activity and significant suppression of the growth of colonies of the phytopathogen *Pseudomonas* by synthesized NPs, including C-ZnO, NC-ZnO, Ag and Cu, were established.