

Joanna CHOJNIAK*, Grażyna PŁAZA*, Daniel WASILKOWSKI**

SYNTEZA NANOCZĄSTEK SREBRA PRZY UŻYCIU PŁYNÓW POHODOWLANÝCH SZCZEPÓW *BACILLUS* PRODUKUJĄCYCH BIOSURFAKTANTY

Nanotechnologia jest obecnie nowoczesnym, rozwijającym się działem nauki, pozwalającym na wytwarzanie struktur, które mają, co najmniej jeden wymiar wyrażany w nanometrach. Wymiary takich nanostruktur oscylują zwykle w przedziale pomiędzy 1 a 100 nm. Wykorzystanie specyficznych właściwości nanomateriałów poprzez osiągnięcie kontroli na poziomie atomowym i molekularnym stanowi główny cel nanotechnologii. Prowadzonych jest szereg badań mających opracować wydajność metod syntezy nanocząstek oraz ich szerokiego zastosowania. Nanocząstki mają specyficzne właściwości fizykochemiczne, charakterystyczne dla nano skali oraz różne cechy dodatkowe: zmiana całkowitej energii układu, stabilność termodynamiczna, przewodnictwo cieplne, magnetyczne i elektryczne oraz właściwości optyczne. Jedną z ważnych zalet nanocząstek jest ich wysoki stosunek powierzchni do objętości, jest tym większy im mniejsza jest średnica cząstek, dzięki czemu ich aktywność chemiczna wzrasta. Dobrze rozwinięta powierzchnia właściwa nanocząstek ma duży wpływ na właściwości adsorpcyjne, reaktywność materiałów oraz właściwości biologiczne. Obecnie podejmuje się szereg badań prowadzących do opracowania efektywnej syntezy nanocząstek metodami biologicznymi.

1. WSTĘP

Od niedawna przedmiotem wielu badań stały się nanocząstki metali (ang. metallic nanoparticles, Me-NPs). Najczęściej stosowanymi metodami syntezy nanocząstek metali są metody chemiczne oraz metody fizyczne, gdzie do otrzymania danego produktu używa się m.in.: mikrofałe, ultradźwięki, naświetlanie, mechaniczne rozdrabnianie, itp. Obydwie z tych metod mają wiele cech negatywnych, np. wykorzystuje się w nich toksyczne roz-

* Instytut Ekologii Terenów Przemysłowych, Mikrobiologia Środowiskowa, Kossutha 6, 40-844 Katowice, chojniak@ietu.katowice.pl.

** Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice.

puszczalniki, podczas procesów powstają niebezpieczne produkty pośrednie, procesy te są często wysokoenergochłonne [17, 23]. Alternatywą dla powyższych metod jest synteza biologiczna (biosynteza), w której wykorzystywana jest aktywność drobnoustrojów (bakterii, mikroskopowych grzybów strzępkowych, drożdży), ekstrakty roślinne, biopolimery oraz produkty metabolizmu wtórnego, np. biosurfaktanty [3- 6, 10, 11, 13, 14, 16, 25, 26, 28]. W przeglądowych pracach, Thakkar i wsp. (2010) oraz Narayanan i Sakthivel (2010) przedstawiają informacje na temat syntezy mikrobiologicznej nanocząstek różnych metali: srebra, złota, selenu, platyny, uranu, oraz stopów tych metali. Synteza nanocząstek metali w sposób mikrobiologiczny jest istotną częścią badań nanobiotechnologii łączącą zakres badań biotechnologii mikrobiologicznej z nanotechnologią. Wybrane mikroorganizmy są traktowane jako tzw. „nanofabryki” do syntezy nanocząstek metali.

Ostatnio pojawiły się prace dotyczące udziału biosurfaktantów w procesach biosyntezy nanocząstek metali [8, 12, 20, 21, 24]. Biosurfaktanty pochodzenia biologicznego wykazują wiele właściwości pozytywnych, umożliwiających ich szerokie zastosowanie. W odróżnieniu od surfaktantów syntetycznych, większość z nich szybko ulega degradacji, nie jest toksyczna oraz zachowuje aktywność w szerokim zakresie temperatury, kwasowości i zasolenia [1]. Biosurfaktanty są stosowane w wielu dziedzinach życia: przemysł spożywczy, kosmetyczny, farmaceutyczny, w technologiach remediacyjnych. Niektóre prace opisują badania dotyczące wykorzystania biosurfaktantów jako stabilizatorów i modyfikatorów w biosyntezie nanomateriałów. Singh i wsp. (2011) użyli surfaktynę produkowaną przez szczep *Bacillus amyloliquifaciens* KSU-109 w syntezie nanocząstek kadmu. Wyniki tych badań wykazały, że surfaktyna może być bardzo dobrym stabilizatorem nanocząstek Cd-NPs przez 6 miesięcy nie zmieniały swojej struktury. Reddy i wsp. (2009 a, b) opisali syntezę nanocząstek srebra i złota przy udziale komercyjnej surfaktyny jako stabilizatora. Natomiast, Kumar i Mamidyala (2011) opisali syntezę nanocząstek złota przy udziale szczepu *Pseudomonas auruginosa* BS- 161R, wytwarzającego ramnolipid. Kiran i wsp. (2010) użyli glikolipidowy biosurfaktant wydzielany przez *Brevibacterium casei* MSA 19, jako stabilizator do syntezy nanocząstek srebra.

Dotychczas nie ma dostępnych informacji na temat wpływu biosurfaktantów produkowanych przez bakterie z rodzaju *Bacillus* (surfaktyna, fengicyna i iturin) na przebieg procesu biosyntezy, właściwości fizyko-chemiczne i biologiczne nanocząstek srebra.

Niniejsza praca jest wstępnym krokiem biologicznej metody syntezy nanocząstek srebra, która jest bardziej przyjazna dla środowiska i tańsza. Nanocząstki srebra wykazują silne właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybowe, dlatego mogłyby być używane w środkach dezynfekcyjnych.

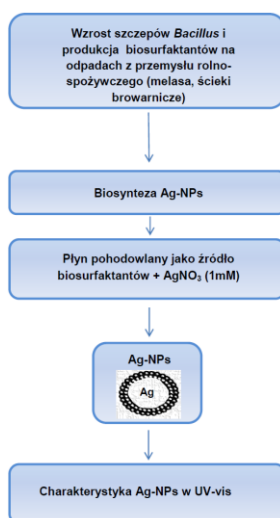
2. METODYKA BADAŃ

2.1. PROWADZENIE HODOWLI BAKTERYJNEJ

Do badań użyto 3 szczepów *Bacillus* (T-1, T'1, I'-1a) wyizolowanych z gleby zanieczyszczonej związkami ropopochodnymi [2]. Szczepy te były zidentyfikowane i scharakteryzowane we wcześniejszych badaniach [18]. Do hodowli tych szczepów użyto pożywek będących odpadami z przemysłu rolno-spożywczego, melasę i ścieki browarnicze (#4 i #6). Kontrolę stanowiły hodowle prowadzone na standardowej odżywczej pożywce mikrobiologicznej Luria-Bertani (LB). Bakterie hodowano przez 96 godz, w 30 °C, w warunkach wytrząsania. Po okresie inkubacji, hodowle odwirowano przez 10 minut przy 5000 rpm. Do syntezy nanocząstek srebra użyto płynu pochodzącego (supernatantu).

2.2. SYNTEZA NANOCZĄSTEK SREBRA

Do płynu pochodzącego dodano AgNO_3 o stężeniu końcowym 1mM, a następnie mieszaninę inkubowano przez 48 godz w następujących temperaturach: 4°C, temperaturze pokojowej i 48 °C. Obecności powstawania nanocząstek srebra monitorowano spektrofotometrem UV-VIS w długości fali 300–700 nm, po 2, 24, i 48 godzinach inkubacji. Ogólny schemat syntezy nanocząstek srebra przedstawiono na rysunku 1.

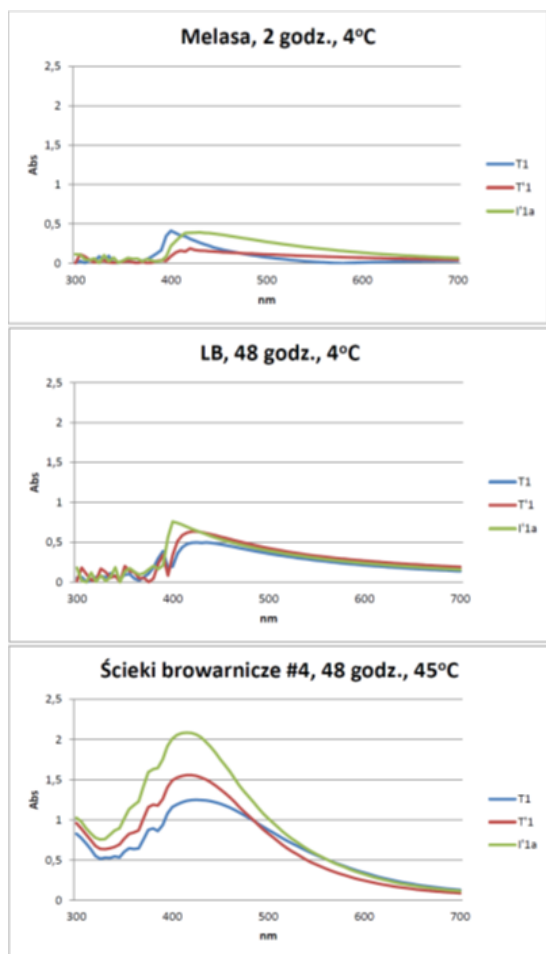


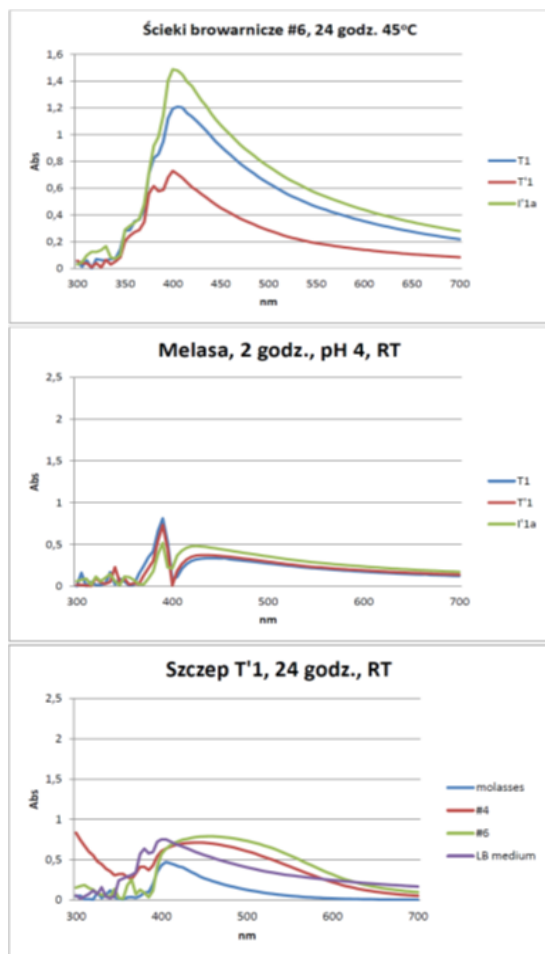
Rys. 1. Schemat syntezy nanocząstek srebra

3. WYNIKI

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, iż we wszystkich płynach pochodzących z szczepów *Bacillus* (T1, T¹-1, I¹-1a) stwierdzono obecność nanocząstek srebra. Podczas syntezy nanocząstek srebra obserwowano zmianę koloru mieszaniny reakcyjnej, co świadczyło o powstawaniu nanocząstek srebra.

Obecność nanocząstek srebra była monitorowana za pomocą spektrofotometru UV-VIS w przedziale długości fal 300–700 nm. Na rysunku 2 przedstawiono widma otrzymane w różnych warunkach inkubacji. W przypadku większości badanych próbek, zaobserwowano charakterystyczny pik w przedziale pomiędzy 380 a 450 nm, co świadczy o powstawaniu nanocząstek srebra.





Rys. 2. Absorbancja mierzona spektrofotometrycznie

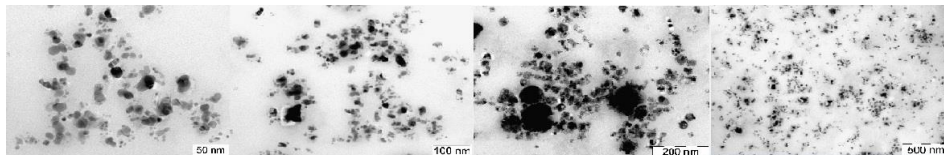
Synteza nanocząstek srebra zachodziła w każdej badanej temperaturze, jednakże najlepsze wyniki uzyskano w temperaturze pokojowej i w 45 °C.

Użyte w doświadczeniu płyny pochodowlane miały pH zbliżone do 8, co dawało środowisko zasadowe reakcji. Pomiary tworzenia nanocząstek srebra wykonano również w pH 4, obniżając pH wyjściowe do tej wartości. W zakwaszonym płynie pochodowlanym zaobserwowano również powstawanie nanocząstek srebra, ale otrzymane wyniki absorbancji były znacznie niższe niż przy pH zasadowym. Przeprowadzone badania pozwoliły ustalić optymalne warunki syntezy nanocząstek srebra w płynach pochodowlanych szczepów *Bacillus*. Stwierdzono, że najkorzystniejsze warunki reakcji syntezy Ag-NPs to: temperatura pokojowa reakcji i czas reakcji 48 godz. Badania również wykazały, że płyny pochodowlane pochodzące z hodowli szczepu *Bacillus*

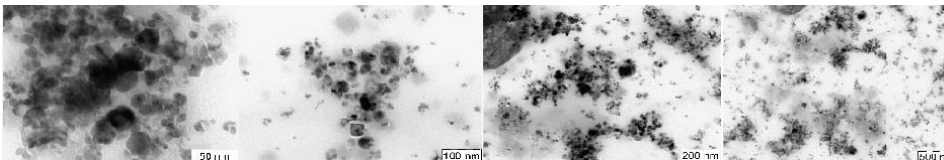
oznaczonego jako T[']-1 (*B. subtilis*) są najbardziej aktywne w biosyntezie nanocząstek srebra. Badania są dalej kontynuowane w kierunku identyfikacji i charakterystyki biosurfaktantu produkowanego przez ww. szczep *Bacillus*.

W trakcie badań wykonano również analizę mikroskopową nanocząstek srebra przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM). Na rys. 3 przedstawiono obrazy powstałych nanocząstek srebra o różnych wymiarach.

A.



B.



Rys. 3. Obraz nanocząstek srebra z transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM).

A. ścieki browarnicze (# 4); B. ścieki browarnicze (# 6).

Zdjęcia wykonane przez prof. L. Kvitik i współpracowników

*Badania są realizowane w ramach projektu nr 2013/09/B/NZ9/01759 przyznane-
go na podstawie decyzji nr 2013/09/B/NZ9/0175 przez Narodowe Centrum Nauki oraz
w ramach projektów dwustronnej współpracy pomiędzy Polską i Republiką Czeską
(nr projektów 9005/2014-2015 i 7AMB14 PL025). Specjalne podziękowania jest de-
dykowane prof. L. Kvitik i współpracownikom z Regionalnego Centrum Zaawanso-
wanych Technologii i Materiałów przy Uniwersytecie Palacký, Olomuniec, Czechy za
wykonanie i udostępnienie mikroskopowych zdjęć nanocząstek srebra.*

LITERATURA

- [1] BANAT I.M., FRANZETTI A., GANDOLFI I., MARTINOTTI M.G., FRACCHIA L., SMYTH T.J., MARCHANT R., *Microbial biosurfactants production, applications and future potential*, 2010, Appl. Microbiol. Biotechnol., 87, 427–444.
- [2] BERRY C.J., STORY S., ALTMAN D.J., UPCHURCH R., WHITMAN W., SINGLETON D., PLAZA G., BRIGMON R.L., *Biological Treatment of Petroleum and Radiological Contaminated Soil.*, 2006, In: Clayton C & Lindner A editors. Innovative Approaches for the Remediation of Sub-surface-Contaminated Hazardous Waste Sites: Bridging Flask and Field Scales. Oxford University Press. Pp. 87–104.
- [3] BHATTACHARYA D., GUPTA R.K., *Nanotechnology and potential of microorganisms*, 2005, Crit. Rev. Biotechnol. 25, 199–204.

- [4] BOZANIC D.K., DIMITRIJEVIC- BRANKOVIC S., BIBIC N., LUYT A.S., DJOKOVIC V., Silver nanoparticles encapsulated in glycogen biopolymer, 2011, Morphology, optical and antimicrobial properties. Carbohyd. Polymers, 83, 883–890.
- [5] CHANDRAN P.S., CHAUDHARY M., PASRICHA R., AHMAD A., SASTRY M., *Synthesis of nanotriangles and silver nanopartiles using Aloe vera plant extract*, 2006, Biotechnol. Prog. 22, 277–283.
- [6] GERICKE M., PINCHES A., *Biological synthesis of metal nanoparticles*, 2006, Hydrometallurgy, 83, 132–140.
- [7] JACQUES P., *Surfactin and other lipopeptides from Bacillus spp.*, 2011, W: Biosurfactants. From Genes to Applications, Soberon-Chavez G. (Ed.). Springer Heidelberg, pp.57–91.
- [8] KIRAN G.S, SABU A., SELVIN J., *Synthesis of silver nanoparticles by glicoloid biosurfactant produced from marine Brevibacterium casei MSA 19*, 2010, J. Biotechnol. 148, 221–225.
- [9] KRISHNARAJ C., RAMACHANDRAN R., MOHAN K., KALAICHELVAN P.T., *Optimization for rapie synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi*, 2012, Spectrochimica Acta A, 93, 95–99.
- [10] KUMAR G.V., GOKAVARAPU D.S., RAJESWARI A., DHAS S.T., KARTHICK V., KAPADIA Z., SHRESTHO T., BARATHY A.I., ROY A., SINNA S., *Facile green synthesis of gold nanoparticles using leaf extract of antidiabetic potent Cassia auriculata*, 2011, Colloids Surfaces B. Biointerface. 87. 159–163.
- [11] KUMAR G.G., MAMIDYALA S.K., *Extracellular synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of Pseudomonas aeruginosa*, 2011, Coll.Sur.B: Bioint. 84, 462–466.
- [12] KVITEK L., PANACEK A., SOUKUPOVA J., KOLAR M., VECEROVA R., PRUCEK R., HOLECOVA M., ZBORIL R., *Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs)*, 2008, J. Phys. Chem. C 112, 5825–5834.
- [13] LEUNG T., WONG CH.K., XIE Y., *Green synthesis of silver nanoparticles using biopolymers, carboxymethylated-curdlan and fucoidan*, 2010, Mat. Chem.Physics, 121, 402–405.
- [14] MITTAL A.K., CHISTI Y., BANERJEE U.C., *Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts*, 2013, Biotechnol. Adv. 31, 346–356.
- [15] MUBARAKIALI D., ARUNKUMAR J., NAG K.H., SHEIKSYEDLSHACK K.A., BALDEV E., PANDIARAJ D., THAJUDDIN N., *Gold nanoparticles from Pro and eukaryotic photosynthetic microorganisms-Comparative studies on synthesis and its application on biolabelling*, 2013, Coll. Sur. B: Biointerfaces 103, 166–173.
- [16] NARAYANAN K.B., SAKTHIVEL N., *Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes*, 2010, Add.Coll.Int.Sc. 156, 1–13.
- [17] PATEL K., KAPOOR S., DAVE D.P., UKHERJEE T., *Synthesis of Pt, Pd, Pt/Ag, and Pd/Ag nanoparticles by microwave-polyol method*, 2007, J. Chem. Sci. 117, 311–316.
- [18] PŁAZA G.A., PACWA-PLÓCINICZAK M., PIOTROWSKA-SEGET Z., BRIGMON R., KRÓL E., *Characterization of Bacillus strains producing biosurfactants*, 2015, In: Environmental Sustainability, Role of Green Technologies, Thangavel P. & Sridevi G. (eds), Springer Science+Business Media, pp. 173–183.
- [19] RAI M., YADAV A., GADE A., *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*, 2009, Biotechnol. Adv. 27, 76–83.
- [20] REDDY A.S., CHEN C.Y., BAKER S.C., CHEN C.C., JEAN J.C., FAN C.W., CHEN H.R., WANG J.C., *Synthesis of silver nanoparticles using surfactin: A biosurfactant as stabilizing agent*, 2009a, Mat. Letters 63, 1227–1230.
- [21] REDDY A.S., CHEN C.Y., CHEN C.C., JEAN J.S., FAN C.W., CHEN H.R., WANG J.C., NIMJE V.R., *Synthesis of gold nanoparticles via an environmentally benign route using a biosurfactant*, 2009b, J.Nanosc.Nanotech. 9, 6693–6699.

- [22] SEN R., Surfcatin: Biosynthesis, genetics and potential applications, 2010, W: Biosurfactants. Sen R. (Ed).Springer Science+Business Media, LLC, 314–323.
- [23] SILEIKAITE A., PROSYCEVAS I., PUIISO J., JURAITIS A., GUOBIENE A., *Analysis of silver nanoparticles produced by chemical reduction of silver salt solution*, 2006, Mater Sci. 12, 287–291.
- [24] SINGH B.R., DWIVEDI S., AL-KHEDHAIRY A.A., MUSARRAT J., *Synthesis of stable cadmium sulfide nanoparticles using surfactin produced by Bacillus amyloliquifaciens strain KSU-109*, 2011, Coll.Surf.B: Bioint. 85, 207–213.
- [25] SOMG Y.J., JANG K-H., KIM S.B., *Biological synthesis of gold nanoparticles using Magnolia kobus and Diopyros kaki leaf extracts*, 2009, Progress Biochemistry. 44, 1133–1138.
- [26] TAMULY C., HAZARIKA M., BORAH S.Ch., DAS M. R., BORUCH M.P., *In situ biosynthesis of Ag, Au and bimetallic nanoparticles using Piper pedicellatum C.DC: Green chemistry approach*, 2013, Coll. Sur.B: Biointerfaces 102, 627–634.
- [27] THAKKAR K., N., MHATRE S.S., PARIKH R.Y., *Biological synthesis of metallic nanoparticles*, 2010, Nanomedicine: nanotechnol.Biol.Med. 6, 257–262.
- [28] ZHANG X., YAN S., TYAGI R.D., SURAMPALLI R.Y., *Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates*, 2011, Chemosphere 82, 489–494.

SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES WITH *BACILLUS* IN POST-CULTURE LIQUIDS STRAINS PRODUCING BIOSURFACTANTS

The application of nanoscale materials and structures, ranging from 1 to 100 nm is an emerging area of nanoscience and nanotechnology. Nanomaterials provide solutions to technological and environmental challenges in diverse fields such as energy, medicine, electronics, cosmetics, coatings, packaging, and biotechnology. The research and development of nanotechnology is incomparable with other fields of science. Nanoparticles have been synthesized using various physical and chemical processes. These processes have often required expensive and complex steps, and toxic reagents. Biological methods of nanoparticles synthesis belong to new green generation processes, which are ecofriendly and alternative to chemical and physical methods. Nanobiotechnology has emerged as a result of integration between microbial biotechnology and nanotechnology. It is well known that microorganisms are used in remediation of toxic metals through reduction of metal ions, but the interest in nanoparticle synthesis using microbes has emerged quite recently. It has been reported that nanoparticles can be synthesized by biological sources such as plants, extract plants, fungi, algae, cyanobacteria, bacteria and biomolecules.