

Słowa kluczowe: nanotechnologia, nanorurki węglowe, bakterie, biosurfaktanty

Grażyna PŁAZA*, Ewa KOWALSKA**, Joanna RADOMSKA**
Elżbieta CZERWOSZ**, Kamlesh JANGID***, Katarzyna GAWIOR*,
Krzysztof ULFIG****, Katarzyna JANDA-ULFIG*****

WPLYW WIELOŚCIENNYCH NANORUREK WĘGLOWYCH NA WZROST I PRODUKCJĘ BIOSURFAKTANTÓW BAKTERII Z RODZAJU *BACILLUS*

Celem badań była ocena wzrostu oraz zdolności do produkcji biosurfaktantów 3 szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus* hodowanych w obecności wielościennych nanorurek węglowych. W wyniku badań stwierdzono, że bakterie te bardzo dobrze rosły w obecności nanorurek węglowych oraz produkowały biosurfaktanty. Wytworzone przez bakterie biosurfaktanty powodowały dyspersję nanorurek węglowych w hodowlach płynnych. Wielościenne nanorurki węglowe nie wpływały na morfologię i wzrost bakterii, stymulowały jednak tworzenie przetrwalników. Badania obejmowały również ocenę właściwości produkowanych biosurfaktantów przez bakterie rosnące w obecności nanorurek węglowych, tj. pomiarów napięcia powierzchniowego, zdolności emulgujących i pieniących. Nie stwierdzono wpływu badanych nanorurek węglowych na właściwości powierzchniowe biosurfaktantów produkowanych przez te bakterie. Biosurfaktanty te obniżały napięcie powierzchniowe, posiadały zdolności emulgujące w stosunku do wybranych substancji/mieszanin hydrofobowych oraz zdolności pieniące porównywalne z kontrolą.

1. WSTĘP

Nanomateriały, złożone z cząstek o wielkości mniejszej niż 100 nm i wyjątkowych właściwościach fizyczno-chemiczne (np. mała gęstość, duża powierzchnia właściwa, duża giętkość co sprawia, że są wyjątkowo elastyczne i sprężyste, silna i długotrwała emisja polowa) zyskują w obecnych czasach coraz większe znaczenie.

* Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych, Pracownia Mikrobiologii Środowiska, Kossutha 6, 40-844 Katowice; pla@ietu.katowice.pl

** Instytut Tele- i Radiotechniczny, Ratuszowa 11, 03-450 Warszawa; ewa.kowalska@itr.org.pl

*** Department of Microbiology, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA; jangidk@uga.edu

**** Politechnika Szczecińska, Instytut Polimerów, Zakład Biomateriałów i Technologii Mikrobiologicznych, Pułaskiego 10, 70-322 Szczecin; k_ulfig@ps.pl

***** Akademia Rolnicza w Szczecinie, Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Słowackiego 17, 71-434 Szczecin; kjanda@agro.ar.szczecin.pl

Obserwuje się ich rozliczne zastosowania w wielu dziedzinach nauki, techniki i życia codziennego. Przewiduje się, że w wyniku szybkiego wzrostu zapotrzebowania na nanomateriały, wartość nowych produktów wytworzonych na ich bazie wzrośnie pod koniec bieżącego dziesięciolecia do kilkunastu miliardów dolarów (w 2007 roku wartość ta wynosiła przeszło 1 mld USD). Niezwykle interesującymi materiałami są nanomateriały węglowe, do których zaliczamy: fulereny, nanorurki, nanowłókna, nanopianki, czy cebulki.

Wielu naukowców przestrzega jednak, że rozwój nanotechnologii – mimo związanych z nią nadziei jako źródła tańszych i lepszych materiałów – nie jest wolny od ryzyka, zarówno zdrowotnego jak i ekologicznego. Na obecnym etapie badań, niewiele jest prac oceniających oddziaływanie nanomateriałów na organizmy żywe, w tym mikroorganizmy. Wśród mikroorganizmów, szczególne znaczenie mają bakterie produkujące biosurfaktanty oraz ich ewentualne wykorzystanie w dyspersji nanomateriałów. Udowodniono, że surfaktanty powodują dyspersję nanomateriałów [8,11], natomiast rola biosurfaktantów lub mikroorganizmów produkujących biosurfaktantów w tym procesie jest nieznaną.

Celem niniejszych badań była ocena wzrostu i zdolności do produkcji biosurfaktantów bakterii z rodzaju *Bacillus* rosnących w obecności wielościennych nanorurek węglowych.

2. MATERIAŁY I METODY

2.1. IZOLACJA I IDENTYFIKACJA BAKTERII PRODUKUJĄCYCH BIOSURFAKTANTY

Szczepy bakteryjne wykorzystane w badaniach izolowano z gruntów zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi z terenu rafinerii Czechowice-Dziedzice jak opisano przez [2] oraz oceniano ich zdolności do produkcji biosurfaktantów i degradacji węglowodorów alifatycznych i aromatycznych [7].

Wyizolowane szczepy bakterii przechowywano na skosach agarowych (SMA, bioMerieux) w temperaturze 4°C.

Ekstrakcję DNA bakteryjnego wykonano wg metody opisanej przez [5]. Czystość wyizolowanego DNA sprawdzano na 1% żelu agarozowym. Następnie, oczyszczony DNA wykorzystano w łańcuchowej reakcji polimeryzacji - PCR (ang. polymerase chain reaction) [9]. W reakcji zastosowano zestaw do amplifikacji firmy Amersham Biosciences (ang. puReTaq™ Ready-To-Go™). Przeprowadzono 30 cykli amplifikacji fragmentu 16S rDNA. Warunki amplifikacji: denaturacja – 94°C przez 5 min, reasocjacja – 72°C przez 2 min, elongacja – 61°C przez 1 min. Reakcje przeprowadzono w aparacie „Mastercycles® gradient machine” firmy Eppendorf. Zastosowano następujące startery: 27f (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3') i 1492 universal (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3') [5]. Powielone fragmenty DNA oczyszczono wykorzystując zestaw Qiagen-PCR według instrukcji producenta,

a następnie zsekwencjonowano. Otrzymane sekwencje genu 16S rRNA analizowano wykorzystując program CLUSTALW v1.83. Bakterie zidentyfikowano do gatunku/szczepu na podstawie podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA wykorzystując bazę danych RDP. Charakterystykę morfologiczną i biochemiczną wybranych szczepów bakterii wykonano według tradycyjnych metod mikrobiologicznych.

2.2. SYNTEZA WIELOŚCIENNYCH NANORUREK WĘGLOWYCH

Nanorurki wielościenne, zsyntezowano termiczną metodą CVD (z ang. Chemical Vapor Deposition), opisaną przez [6]. Ksylen (C_8H_{10}) użyto jako źródło węgla, zaś ferrocen ($Fe(C_5H_5)_2$) zastosowano jako prekursor katalizatora. Proces CVD prowadzono w poziomym rurowym reaktorze kwarcowym, umieszczonym w piecu elektrycznym o dwóch strefach grzania, stosując roztwór ferrocenu w ksylenie (10% ferrocenu w ksylenie) i argon jako gaz nośny. Roztwór był wstrzykiwany do reaktora kwarcowego z szybkością 0.1 ml/min. W pierwszej strefie pieca ($200^{\circ}C$) roztwór odparowywał, następnie jego pary były przenoszone przez argon do strefy drugiej (680°), w której dochodziło do rozkładu par roztworu. W wyniku rozkładu na ścianach reaktora osadzał się węglowy produkt.

2.3. WZROST BAKTERII Z RODZAJU *BACILLUS* NA PODŁOŻU STAŁYM I PŁYNNYM W OBECNOŚCI WIELOŚCIENNYCH NANORUREK WĘGLOWYCH

Bakterie hodowano na podłożach stałych i płynnych o składzie wg [1] z dawkami nanorurek węglowych w zakresie od 0,001 do 0,01 g. Hodowle bakterii inkubowano w temperaturze $45^{\circ}C$. W przypadku hodowli stałych odczyty wzrostu bakterii robiono po 24 i 48 godz. W przypadku hodowli płynnych, pobierano po 1 ml hodowli od 0 do 144 godz, a następnie metodą płytek lanych obliczano liczbę wyrosłych kolonii bakterii (CFU/ml) i wyznaczono krzywe wzrostu. Otrzymane krzywe wzrostowe porównano z kontrolą (hodowle bakterii bez nanorurek węglowych).

2.4. BADANIE WŁAŚCIWOŚCI BIOSURFAKTANTÓW PRODUKOWANYCH PRZEZ BAKTERIE Z RODZAJU *BACILLUS* ROSNĄCYCH W OBECNOŚCI NANORUREK WĘGLOWYCH

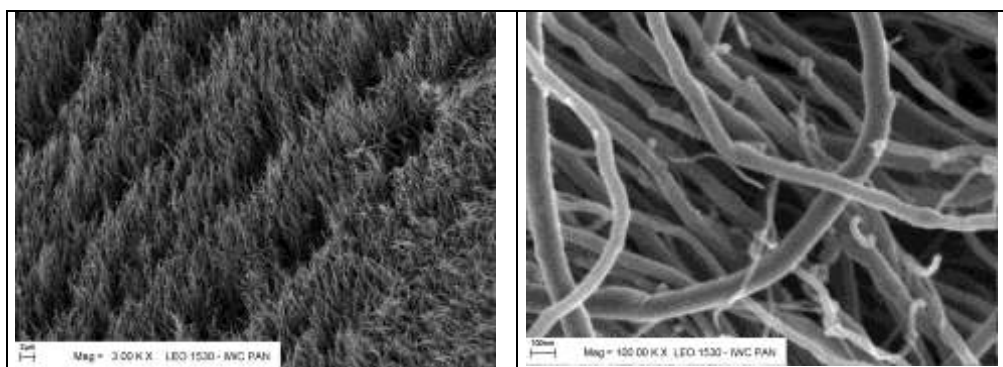
Hodowle płynne poszczególnych szczepów *Bacillus* inkubowano w $45^{\circ}C$ przez 7 dni, a następnie odwirowano (10.000 rpm; 20 min). Otrzymane supernatanty wykorzystano do oceny właściwości powierzchniowych biosurfaktantów produkowanych przez dane szczepy bakterii. Pomiar napięcia powierzchniowego wykonano metodą pierścieniową (du Nouy'a) na tensytmetrze K12 firmy Kruss w temperaturze $25^{\circ}C$, przy odchyleniu 0,09mN/m. Zdolności emulgowania badano wg metody opisanej przez [3,10]. Do 5 ml supernatanu dodawano 2 ml różnych substancji hydrofobowych. Po 24 godz oceniano wysokość warstwy emulgującej i obliczano wskaźnik emulgacji EI24 wg [3]. Jeżeli wskaźnik EI24 był większy niż 40% to

oceniano emulsję jako stabilną. Współczynnik pienienia (FV) oceniano wg metody opisanej przez [4]. Do cylindra szklanego wiano 25 ml supernatantu, przez który następnie przepuszczano strumień powietrza (50 ml/min) przez 5 min. Współczynnik pienienia oznaczony jako FV (ang. foam volume) obliczano na podstawie różnicy pomiędzy objętością warstwy pniącej a pozostałością supernatantu.

3. WYNIKI

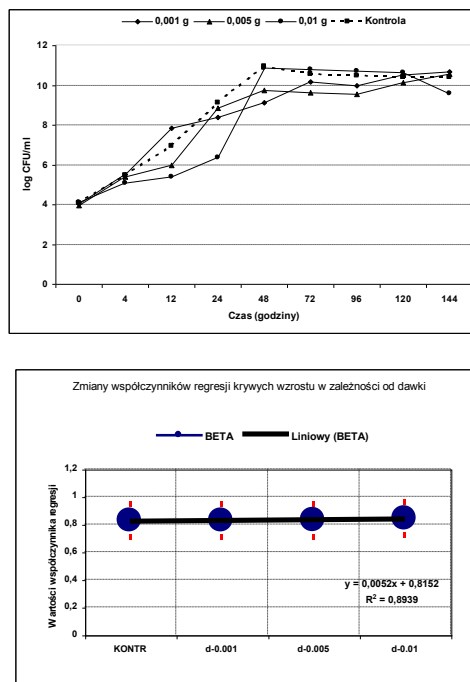
W badaniach wykorzystano 3 szczepy bakterii zidentyfikowane jako: *Bacillus subtilis* (T-1a), *Bacillus* sp. (T-1), *Bacillus* sp. (T'-1). Analiza sekwencyjna genu 16S rRNA wykazała, że w przypadku dwóch szczepów, t.j. T-1 i T'-1 trudno było jednoznacznie określić przynależność taksonomiczną, do gatunku. Zarówno szczep oznaczony jako T-1, jak i T'-1 wykazywały >99 % podobieństwa sekwencyjnego do dwóch różnych gatunków; w przypadku T-1 do *B. subtilis* i *B. licheniformis*, a w przypadku T'-1 do *B. subtilis* i *B. amyloliquefaciens*. Wyizolowane szczepy *Bacillus* należą do grupy halofilnych i termotolerancyjnych bakterii o kształcie pałeczek, czasami tworzących formy łańcuszkowe. Rosły w temperaturach od 37 do 70°C, przy czym optimum ich wzrostu wynosiło 45°C oraz tolerowały różne stężenia NaCl, od 2 do 12%.

Wielościennie nanorurki węglowe otrzymane metodą CVD posiadały długość rzędu kilku mikrometrów i zewnętrzne średnice w zakresie 20-80 nm (fot. 1). W badaniach wykorzystano nanorurki, które nie były wstępnie oczyszczane i zawierały cząstki katalizatora.



Fot. 1. Obrazy SEM zsyntezowanych wielościennych nanorurek węglowych

Na rys. 1 przedstawiono krzywe wzrostu badanych szczepów bakterii wyznaczone przy różnych dawkach nanorurek węglowych. Różnice pomiędzy tymi krzywymi występowały ale nie były istotne statystycznie. Różne dawki nanorurek nie wpływały na wzrost szczepów bakterii. Szybkość wzrostu bakterii była taka sama niezależnie od dawek nanorurek.



Rys. 1. Wzrost szczepów *Bacillus* w pożywce płynnej z różnymi dawkami wielościennych nanorurek węglowych

Zastosowane dawki nanorurek węglowych nie powodowały również zmian morfologicznych, natomiast stymulowały do tworzenia przetrwalników. W hodowlach z nanorurkami udział komórek bakteryjnych tworzących endospory mieścił się w zakresie od 93% do 97%; porównując z hodowlami kontrolnymi (bez nanorurek), gdzie udział ten wynosił 28%. Syntetyzowane przez bakterie biosurfaktanty powodowały dyspersję nanorurek węglowych oraz wykazywały właściwości powierzchniowe porównywalne z kontrolą (hodowla bakterii bez nanorurek węglowych), t.j. obniżały napięcie powierzchniowe (tabela 1), charakteryzowały się silnymi zdolnościami emulgowania w stosunku do zastosowanych substancji/mieszanin hydrofobowych (tabela 2) oraz wykazywały zdolności pienienia.

Tab. 1. Zmiany napięcia powierzchniowego szczepów *Bacillus* hodowanych w obecności wielościennych nanorurek węglowych

Szczepy	Wartości napięcia powierzchniowego (Nm/m) ± Odch.Stand.	
	Hodowle z nanorurkami	Hodowle bez nanorurek
T-1	30,5±0,08	30,44±0,15
T'-1	36,55±0,16	33,42±0,25
I'-1a	50,47±0,27	45,88±0,06

Woda – 72,2 mN/m ± 0,4; pożywka – 68 mN/m ± 0,08-2,31

Tab. 2. Zdolności emulgujące biosurfaktantów produkowanych przez szczepy *Bacillus* w obecności wielościennych nanorurek węglowych

Substancje/mieszaniny hydrofobowe	EI24 (%)					
	T-1/N	T-1/K	T'-1/N	T'-1/K	I'-1a/N	I'-1a/K
heksadekan	76	9	2	2	4	11
olej mineralny	100	100	100	100	100	100
izooktan	13	12	5	2	16	28
toluen	72	69	70	69	93	94
ksylen	74	72	71	72	89	90
squalen	100	94	21	16	18	16
olej napędowy	71	67	71	70	70	72
benzyna	72	71	71	69	71	69
Fracje destylacji ropy naftowej:						
frakcja - A3	42	29	35	27	28	28
frakcja - A5	100	100	24	29	30	37
frakcja - P1	100	100	100	100	100	100
frakcja - P2	100	100	31	30	100	100
Olej zużyty (ze smażenia frytek)	100	100	100	100	100	100

N- hodowle w obecności nanorurek węglowych; K- kontrola-hodowle bez nanorurek węglowych; Odch.Stand. ± 0,5 - 5%

4. PODSUMOWANIE

W pracy dokonano oceny wzrostu i produkcji biosurfaktantów 3 szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*. Nanorurki węglowe nie powodowały zahamowania wzrostu bakterii oraz zmian morfologicznych, natomiast stymulowały produkcję endospor. Produkowane przez badane szczepy biosurfaktanty powodowały dyspersję nanorurek węglowych w roztworach wodnych, obniżały napięcie powierzchniowe oraz charakteryzowały się silnymi zdolnościami emulgowania wybranych substancji/mieszanin hydrofobowych. Z praktycznego punktu widzenia istotne jest wykazanie w pracy, że zarówno biosurfaktanty, jak i mikroorganizmy produkujące biosurfaktanty powodują dyspersję wielościennych nanorurek węglowych.

LITERATURA

- [1] Abu-Ruwaida A.S., Banat I.M., Haditirto S., Salem A., Kadri M. 1991. *Isolation of biosurfactant-producing bacteria. Product characterization and evaluation*. Acta Biotechnol., 11: 315-324.
- [2] Berry C.J., Story S., Altman D.J., Upchurch R., Whitman W., Singleton D., Plaza G., Brigmon R.L. 2006. *Biological treatment of petroleum in radiologically contaminated soil*. W: Remediation of hazardous waste in the subsurface. Bridging flask and field, pod red. Clayton J. Clark II & Angela Stephenson Lindner, American Chemical Society, Washington, DC, 87-93.
- [3] Bosch M.P., Robert M., Mercade M.E., Espuny M.J., Parra J.L., Guinea J. 1988. *Surface-active compounds on microbial cultures*. Tenside Surf. Deterg., 25: 208-212.
- [4] Das M., Das S.K., Mukherjee R.K. 1998. *Surface active properties of the culture filtrates of a Micrococcus species grown on n-alkanes and sugars*. Biores.Technol., 63: 231-235.
- [5] Furlong M.A., Singleton D.R., Coleman D.C., Whitman W.B. 2002. *Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm Lumbricus rubellus*. Appl.Environ.Microbiol., 68: 1265-1274.
- [6] Kowalska E., Radomska J., Byszewski P., Kowalczyk P., Antonova K., Diduszko R., Lange H., Dłużewski P. 2003. *Morphology and electronic properties of carbon nanotubes grown with Fe catalyst*. J.Mater.Res., 18: 2451- 2458.
- [7] Plaza G., Zjawiony I., Banat I.M. 2006. *Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils*. J.Petrol.Sc.Eng., 50: 71-77.
- [8] Salzmann C.G., Chu B.T.T., Tobias G., Llewellyn S.A., Green M.L.H. 2007. *Quantitative assessment of carbon nanotube dispersions by Raman spectroscopy*. Carbon, 45: 907-912.
- [9] Stefan R.J., Atlas R.M. 1991. *Polymerase chain reaction: Applications in Environmental Microbiology*. Annu.Rev.Microbiol., 45: 137-152.
- [10] Willumsen P.A., Karlson U. 1997. *Screening of bacteria isolated from PAH-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers*. Biodegradation, 7: 415-423.
- [11] Vaisman L., Wagner H.D., Marom G. 2006. *The role of surfactants in dispersion of carbon nanotubes*. Ad.Coll.Interface Sc. 128-130: 37-46.

EFFECT OF MULTIWALLED CARBON NANOTUBES ON GROWTH AND BIOSURFACTANT- PRODUCTION OF *BACILLUS* STRAINS

The aim of the study was to investigate the effect of multiwalled carbon nanotubes on growth and biosurfactant-production by three *Bacillus* strains identified as *B. subtilis* (I⁻-1a), *Bacillus* sp. (T-1), and *Bacillus* sp. (T'-1). 16S rRNA gene sequencing could not clearly assign isolates T-1 and T'-1 to any species in the genus *Bacillus* as both these isolates showed >99% similarity to two distinct species of the genus (*B. subtilis* and *B. licheniformis* for T-1, and *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* for T'-1). Isolated strains grew very well in liquid and solid medium with different concentrations of multiwalled carbon nanotubes. Although, no change in growth and morphological properties of isolates with the multiwalled carbon nanotubes was noted, stimulation of endospore production was observed. Biosurfactants were produced by *Bacillus* strains in liquid medium with carbon nanotubes. Dispersion of carbon nanotubes was observed. The surface active properties of produced biosurfactants such as, surface tension, emulsification and foamability of cell-free supernatants were evaluated. The reduction of surface tensions, emulsification index (EI₂₄) and foam inducer (FV) were compared with the control without carbon nanotubes.