



Otwarte seminaria 2016

- Instytut Ekologii Terenów
Upemysłowionych w Katowicach

- Właściwości biologiczne nanocząstek srebra
syntetyzowanych przez szczepy
Bacillus subtilis

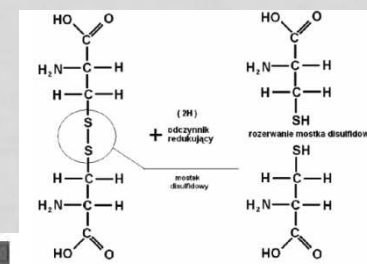
- mgr Joanna Chojniak

- Instytut Ekologii Terenów Upemysłowionych

NANOCZĄSTKI SREBRA- ODDZIAŁYWANIE NA ORGANIZMY ŻYWE



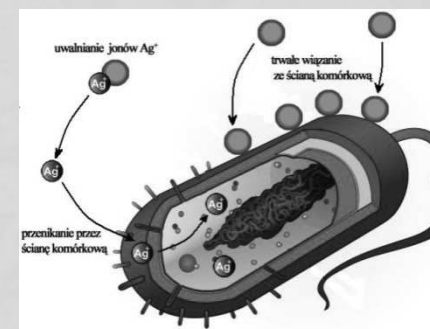
- zmiana normalnego cyklu procesów komórkowych bakterii
- blokada procesu syntezy ściany komórkowej oraz oddychania komórkowego
- wnikanie do komórki i wiązanie się z DNA blokując syntezę kolejnych nici DNA
- zaburzenia gospodarki wodnej grzybów
- katalityczny rozkład otoczki lipidowo-białkowej wirusów



Proces denaturacji białek



Obraz z mikroskopu elektronowego po traktowaniu szczepu *E.coli* nanocząstkami srebra przez 1 godzinę



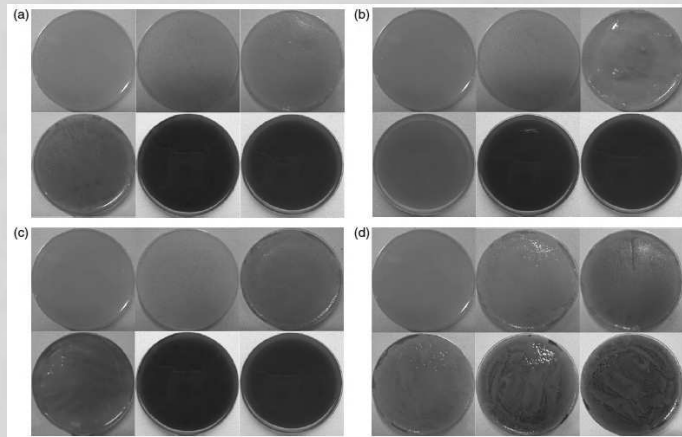
Mechanizm oddziaływania Ag-NPs na komórkę bakteryjną

Ryan J.M., Silver Antimicrobial Nanotech: An Alternative to Antibiotic Use, Longmont, CO: Ionic Fusion Corp., 2005.

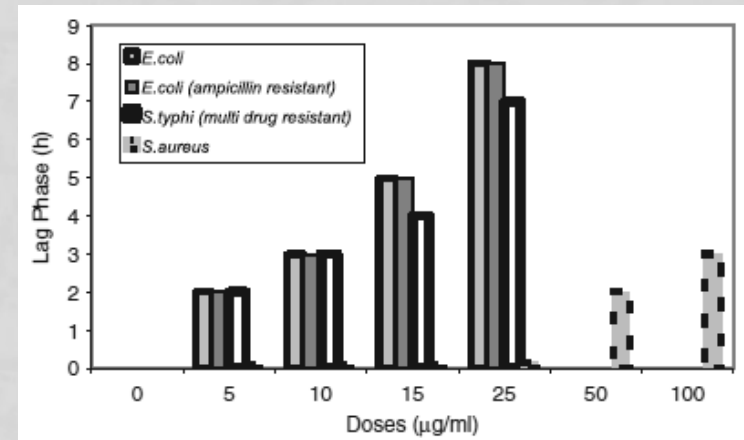
Cho K.-H., Park J.-E., Osaka T., Park S.-G., The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient, *Electrochimica Acta*, 51 (5), 2005, 956-960.

Song H.Y., Ko K.K, Oh I.H, Lee B.T., Fabrication of Silver Nanoparticles and Their Antimicrobial Mechanisms, *European Cells and Materials*, Vol. 11, Suppl. 1, 2006, 58.

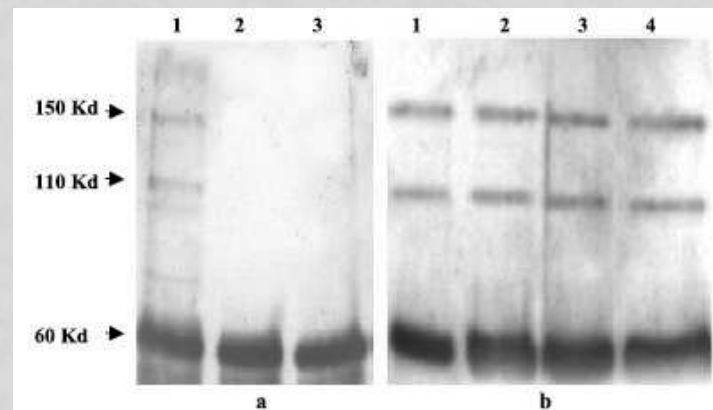
WŁAŚCIWOŚCI ANTYBAKTERYJNE NANOCZĄSTEK SREBRA



Hodowle bakteryjne: a) *E.coli*, b) *E.coli* oporna na ampicylinę, c) *S. typhi*, d) *S. aureus* na podłożach z nanocząstkami srebra w stężeniach 0- 35 mg/ml



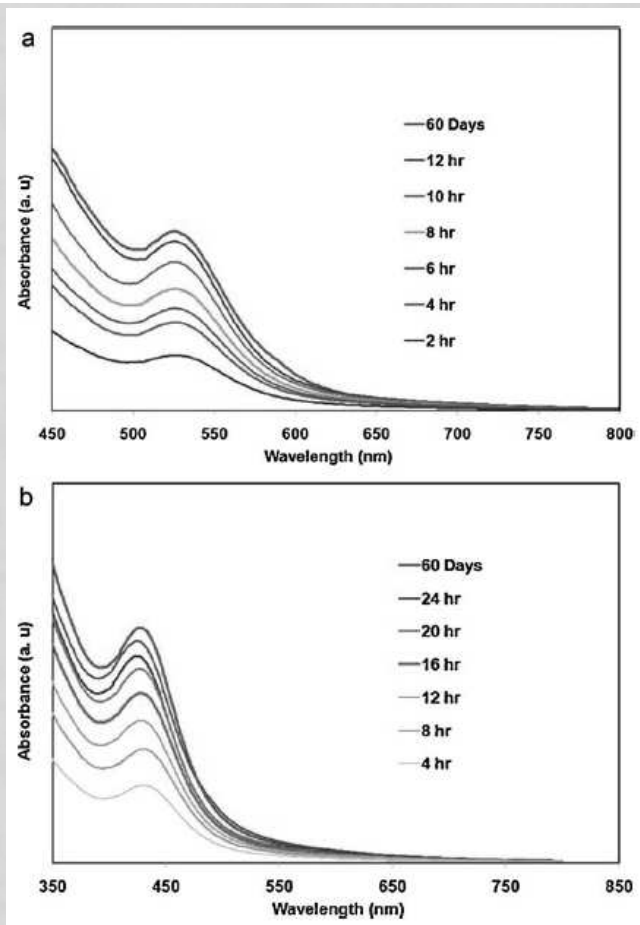
Wykres przedstawiający wzrost bakterii przy różnych stężeniach nanocząstek srebra



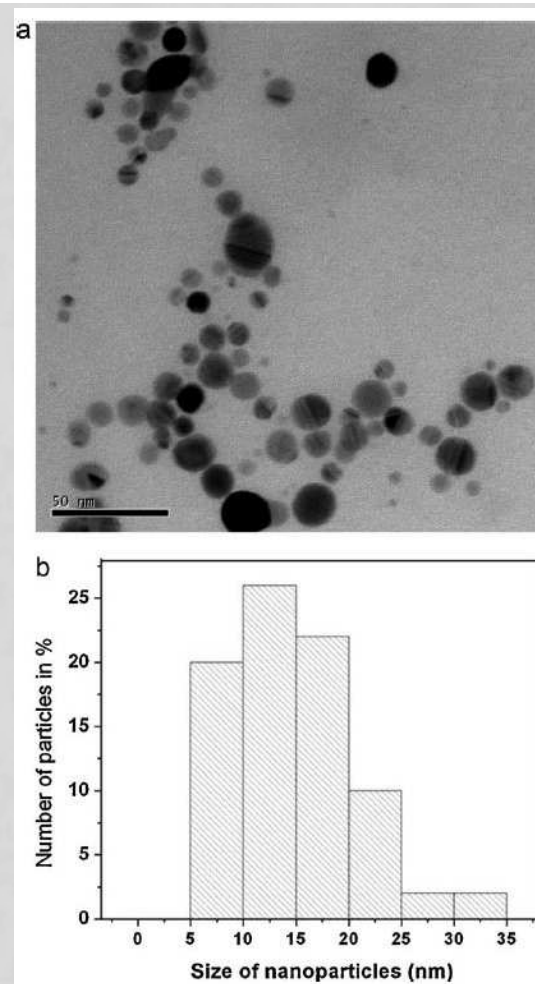
Profile tyrozyny z a) *E.coli*, b) *S. aureus* z różnymi stężeniami nanocząstek: 1. bez nanocząstek, 2. $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, 3. $25 \mu\text{g ml}^{-1}$, 4. $50 \mu\text{g ml}^{-1}$

Shrivastava S., Bera T., Roy A., Singh G., Ramachandrarao P., Dash D.: Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles, *Nanotechnology* 18 (2007) 225103 (9pp)

BIOSYNTETA NANOCZĄSTEK SREBRA I ZŁOTA PRZY UDZIALE BAKTERII



Widma UV-Vis roztworu ekstraktu z *Geobacillus stearotherophilus* wolnego od komórek z 1mM: a) HAuCl₄; b) AgNO₃



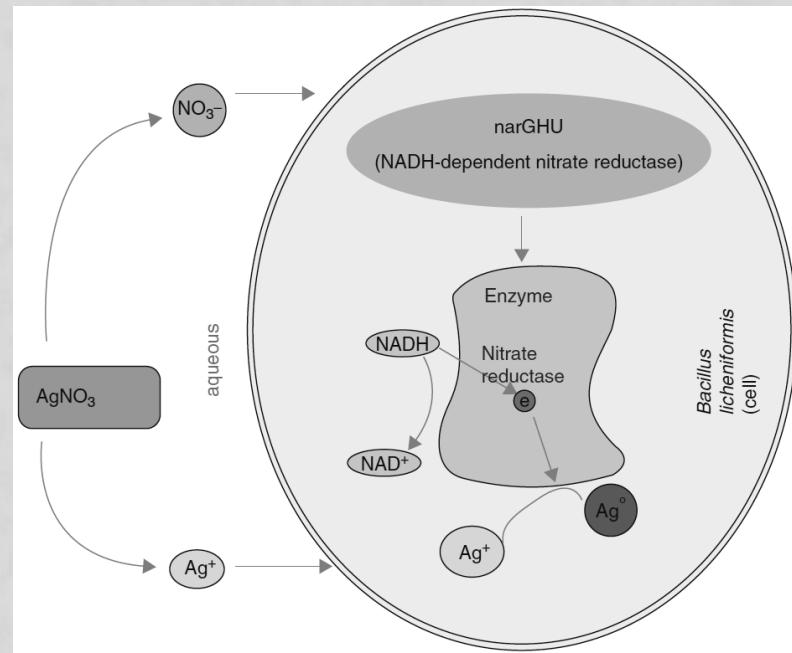
Zdjęcie wykonane pod mikroskopem TEM (a) oraz rozkład rozmiaru nanocząstek srebra w próbce (b)

Fayaza A.M., Girilal M., Rahman M., Venkatesan R., Kalaichelvana P.T.:
Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using thermophilic bacterium
Geobacillus stearotherophilus; Process Biochemistry 46 (2011) 1958–1962

MECHANIZM BIOSYNTETY NANOCZĄSTEK SREBRA

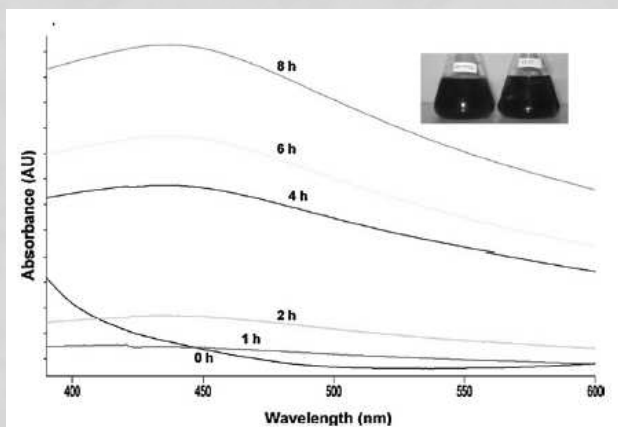


- Biosynteza zewnątrzkomórkowa (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*)
- Biosynteza wewnątrzkomórkowa (*Pseudomonas stutzeri* AG259, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus*)

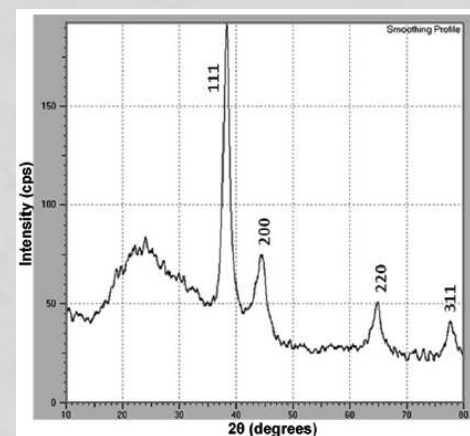


Schemat przedstawiający jony srebra redukowane do atomów srebra przez reduktazę azotanową (Kalimuthu et al. 2008)

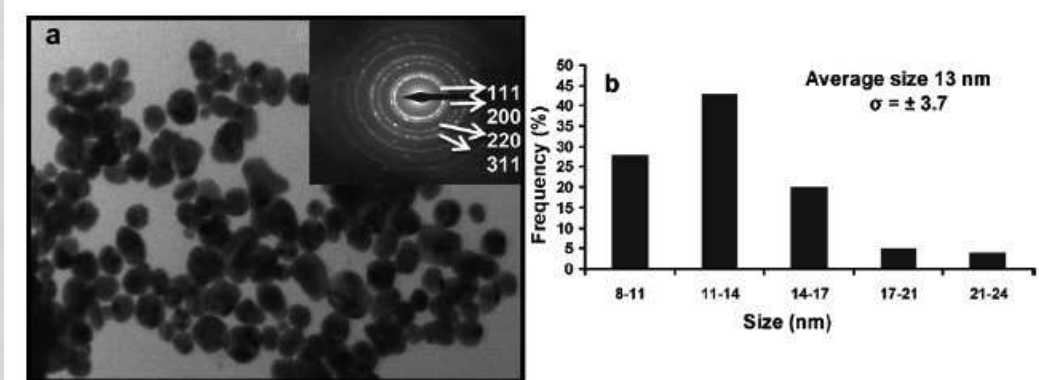
SYNTEZA NANOCZĄSTEK SREBRA W PŁYNACH POHODOWLANYCH



Widma UV-Vis supernatantu po dodaniu azotanu srebra, powyżej zmiana zabarwienia roztworów

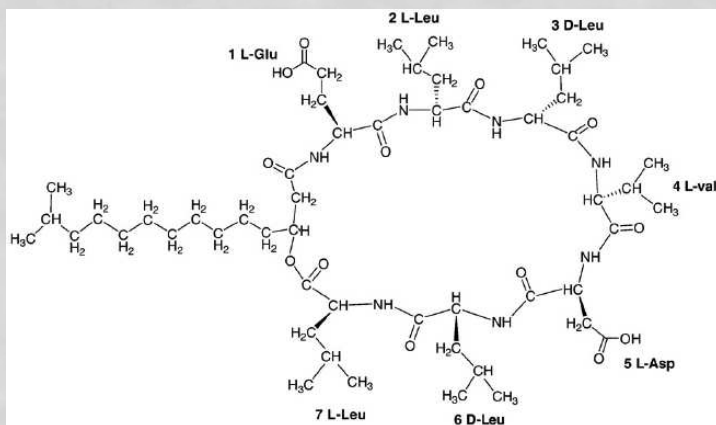


Widmo nanocząstek srebra z supernatantu w promieniowaniu rentgenowskim

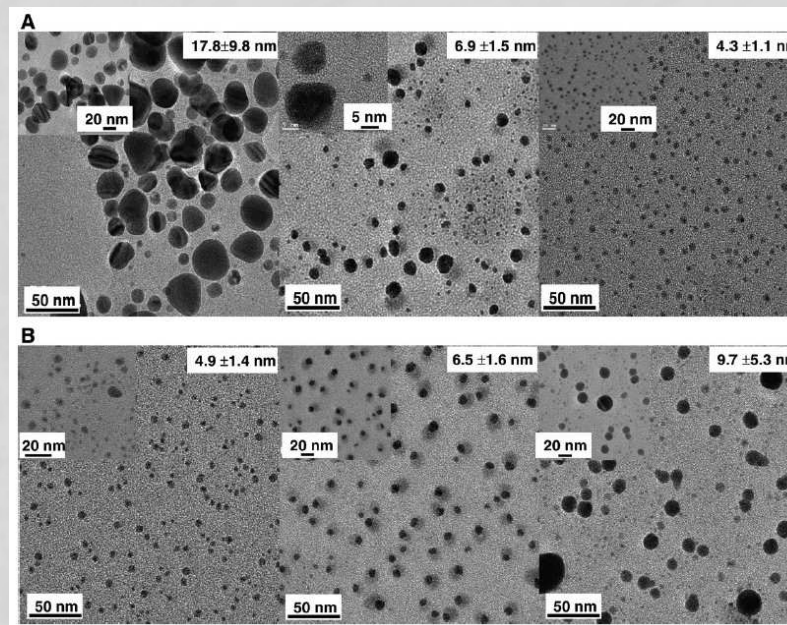


Zdjęcie nanocząstek srebra w supernatancie wykonane mikroskopem TEM (a), rozkład rozmiarów nanocząstek srebra (b)

SYNTEZA NANOCZĄSTEK SREBRA STABILIZOWANYCH BIOSURFAKTANTAMI



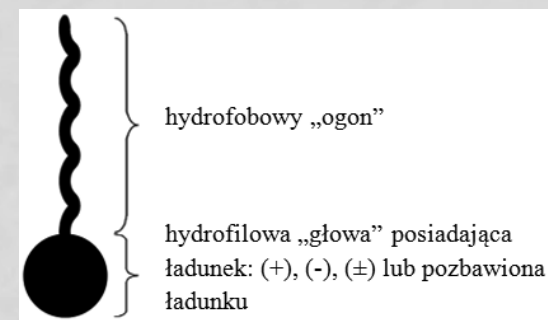
Chemiczna struktura pierścienia surfaktyny



Zdjęcia nanocząstek srebra wykonanych za pomocą TEM: a) nanocząstki syntetyzowane w 4 °C; b) syntetyzowane w temperaturze pokojowej w obecności surfaktyny

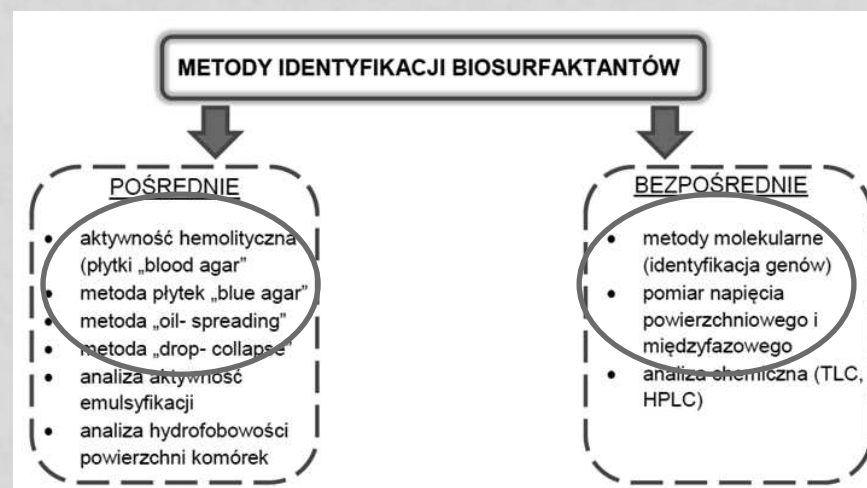
BIOSURFAKTANTY

- syntetyzowane są przez liczne gatunki bakterii, drożdży i grzybów
- są biodegradowalne i nietoksyczne
- posiadają dużą kompatybilność środowiskową
- utrzymują aktywność powierzchniową w ekstremalnych warunkach (temperatura, pH, zasolenie)
- grupa związków chemicznych bardzo zróżnicowana pod względem struktury i właściwości
- odznaczają się większą specyficznością niż surfaktanty



Schemat budowy biosurfaktantu

Paraszkiewicz K., Długoński J., 2007, *Wykorzystanie drobnoustrojowych surfaktantów do usuwania metali ciężkich z gleby*, *Biotechnologia*, 2 (77), s. 81-94.



CEL GŁÓWNY:

Ocena oddziaływania nanocząstek srebra syntetyzowanych biologicznie na organizmy żywe

CELE SZCZEGÓŁOWE:

- 1. Ocena przydatności odpadów z przemysłu rolno-spożywczego do wzrostu mikroorganizmów produkujących biosurfaktanty**
- 2. Zastosowanie płynów pochodzących do biosyntezy nanocząstek srebra**

IDENTYFIKACJA I CHARAKTERYSTYKA SZCZEPÓW *BACILLUS* PRODUKUJĄCYCH BIOSURFAKTANTY



<i>Bacillus</i> species	Identyfikacja szczepów <i>Bacillus</i>		
	BIOLOG™ system	16S rRNA	FAME
T-1	<i>B. subtilis/atrophaeus</i>	<i>B. subtilis</i> & <i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>
T'-1	<i>B. subtilis</i> ss <i>spizizenii</i>	<i>B. subtilis</i> & <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
I'-1a	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>

Ocena wzrostu bakterii na odpadach z przemysłu rolno-spożywczego

Warunki hodowli:

- temperatura: 30 °C
- pH: zasadowe (ok. 8.0, bez zmiany pH pożywek)
- podłoża: melasa (2,5%), 1. ściek browarniczy (Tychy), 2. ściek browarniczy (Żywiec), kontrolnie pożywka Luria- Bertani (LB)

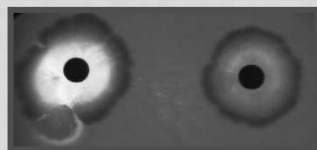


Pożywki stosowane w badaniach

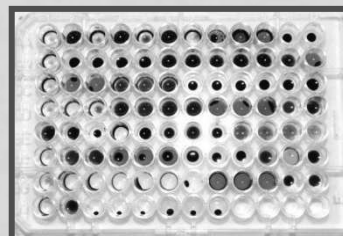
CHARAKTERYSTYKA PRODUKCJI BIOSURFAKTANTÓW



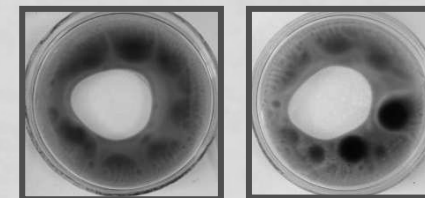
Ścieki/ odpady	Szczep	Napięcie powierzchniowe (mN/m)	„Drop- collapse”	„Oil spread”(mm)	Blood Agar
1. ściek browarniczy (Tychy)	T1	52,8 ± 0,61	+	4,67	+
	T'1	47,75 ± 0,61	-	17,67	+
	I'1a	42,5 ± 1,41	+	6	+
	7 KP	33,89 ± 0,23	brak	brak	brak
2. ściek browarniczy (Żywiec)	T1	46,72 ± 0,88	+	4,33	+
	T'1	43,52 ± 1,42	-	4	+
	I'1a	36,06 ± 0,83	+	10	+
	7 KP	46,18 ± 0,21	brak	brak	brak
melasa	T1	43,27 ± 0,42	+	28,33	+
	T'1	38,94 ± 1,09	+	40	+
	I'1a	34,23 ± 0,31	+	40	+
	7 KP	27,26 ± 0,01	brak	brak	brak
LB	T1	49,54 ± 0,64	brak	brak	brak
	T'1	46,21 ± 0,89	brak	brak	brak
	I'1a	39,41 ± 0,96	brak	brak	brak
	7 KP	28,42 ± 0,14	brak	brak	brak
	E. coli	53,84 ± 0,18	brak	brak	brak



Ocena wzrostu na podłożu stałym- „blood
agar”



Metoda „drop- collapse”

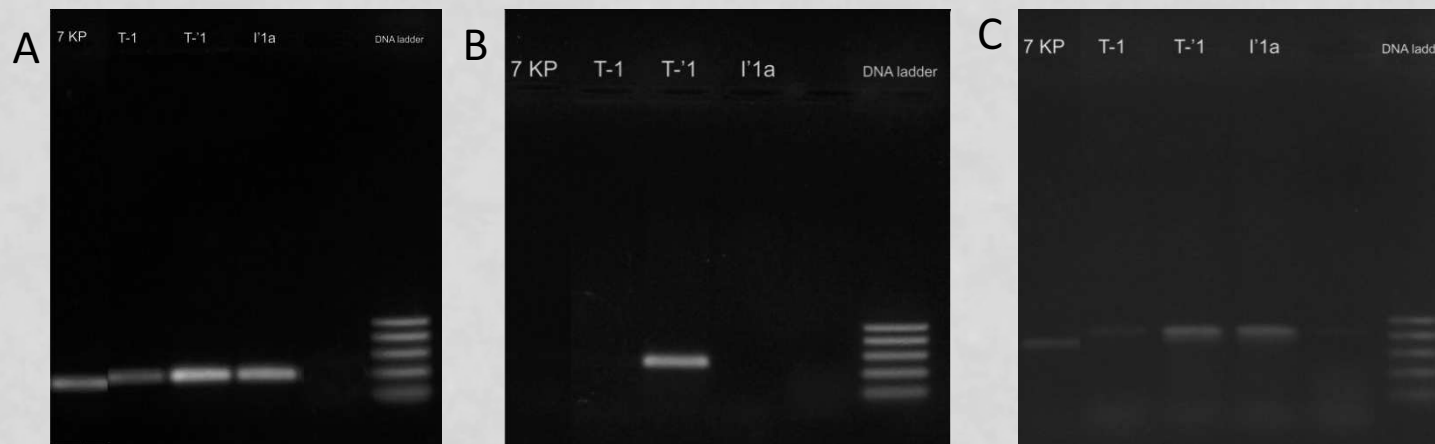


Metoda „oil-spreading”

BADANIA MOLEKULARNE- OBECNOŚĆ GENÓW WARUNKUJĄCYCH PRODUKCJĘ BIOSURFAKTANTÓW

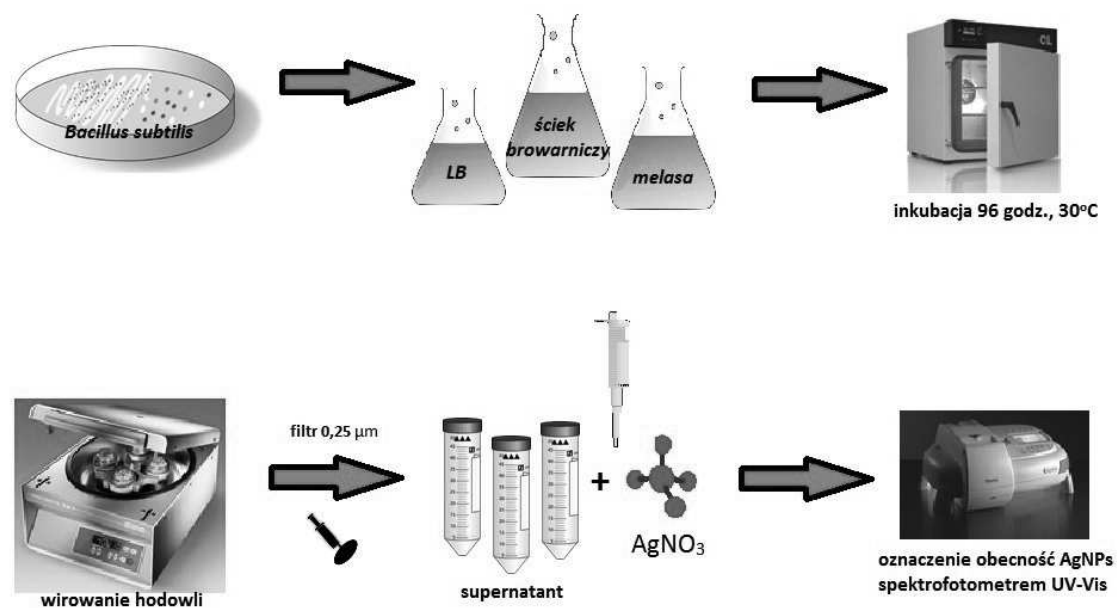


Biosurfaktant	Gen	Sekwencja	PCR product (bp)	Temperatur a topnienia
Surfaktyna	<i>srfAA</i>	F-5' TCGGGACAGGAAGACATCAT 3' R-5' CCACTCAAACGGATAATCCTGA 3'	201	58-60 °C
Fengicyna	<i>fenD</i>	F-5' GGCCCGTTCTCTAAATCCAT 3' R-5' GTCATGCTGACGAGAGCAAA 3'	269	58 °C
Iturin	<i>ituC</i>	F-5'GGCTGCTGCAGATGCTTTAT 3' R-5' TCGCAGATAATCGCAGTGAG 3'	423	58 °C



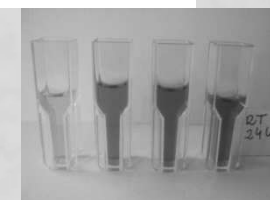
- A. surfaktyna *srfAA*
- B. fengicyna *fenD*
- C. iturin *ituC*

BIOLOGICZNA SYNTEZA NANOCZĄSTEK SREBRA



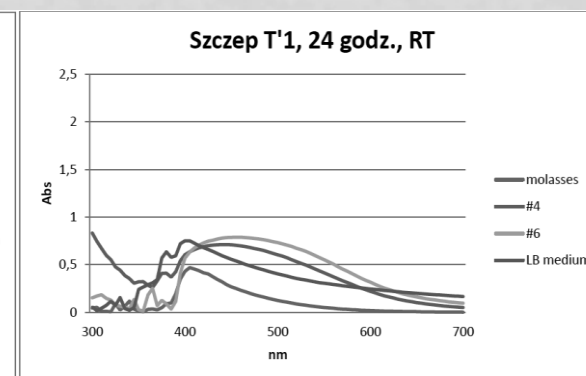
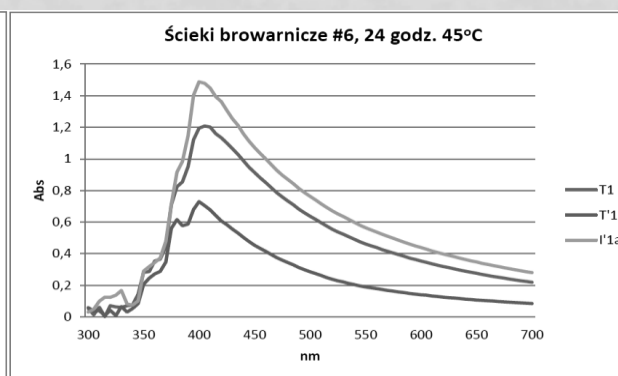
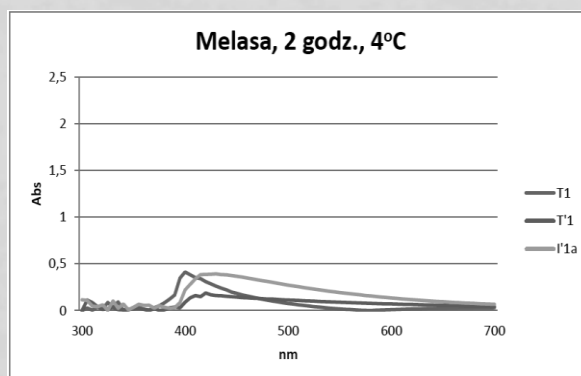
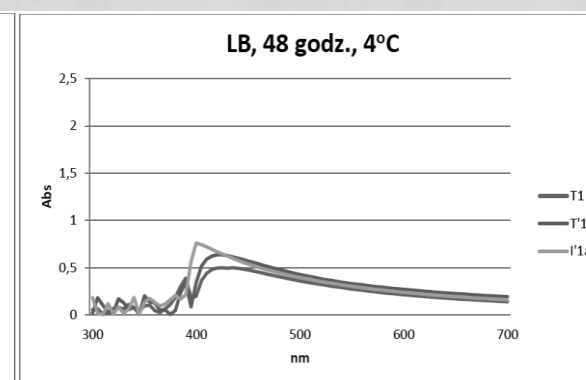
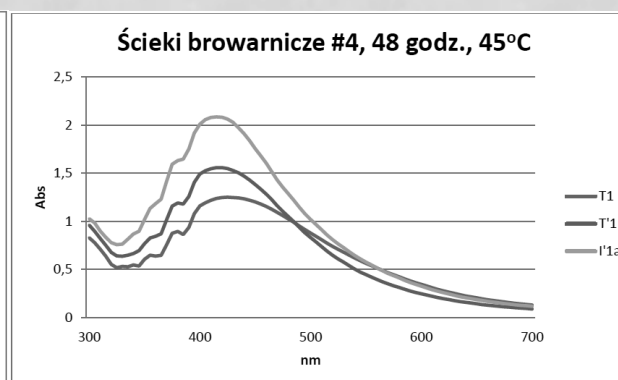
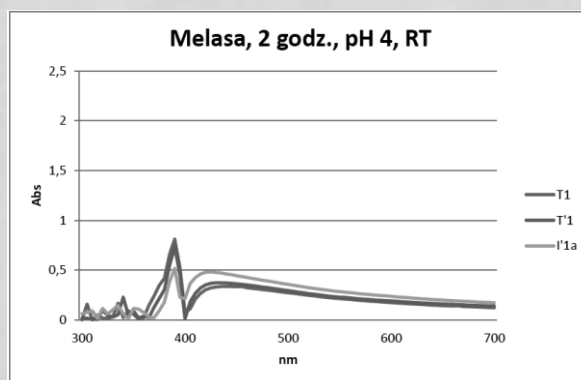
Monitorowanie powstawania nanocząstek srebra:

- (1) zmiana koloru mieszaniny reakcyjnej,
- (2) pomiary widma w zakresie 300-700 nm na UV-Vis

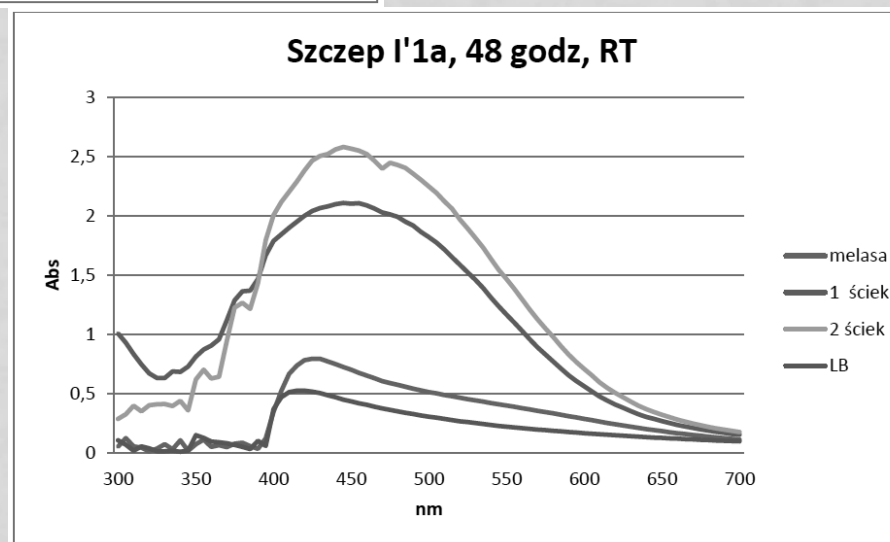
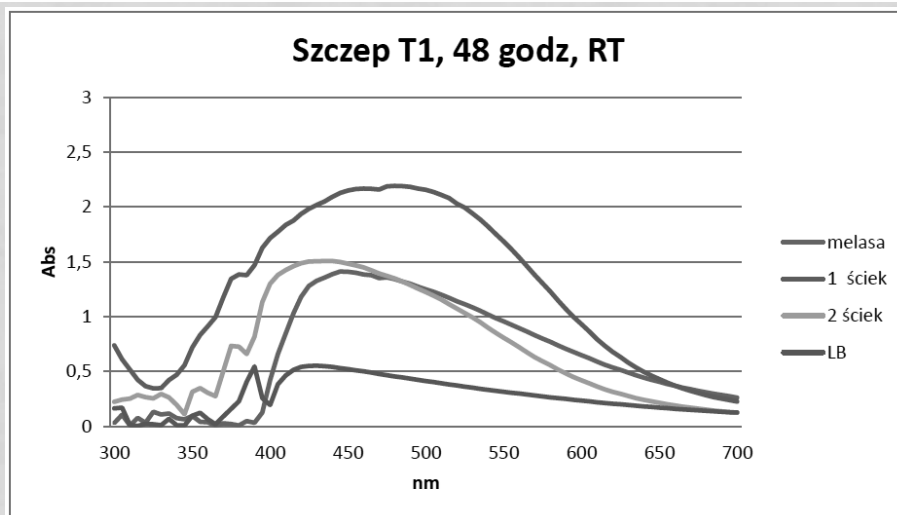


Przykład zmiany koloru mieszaniny w próbie z 2. ściekiem browarniczym (Żywiec)

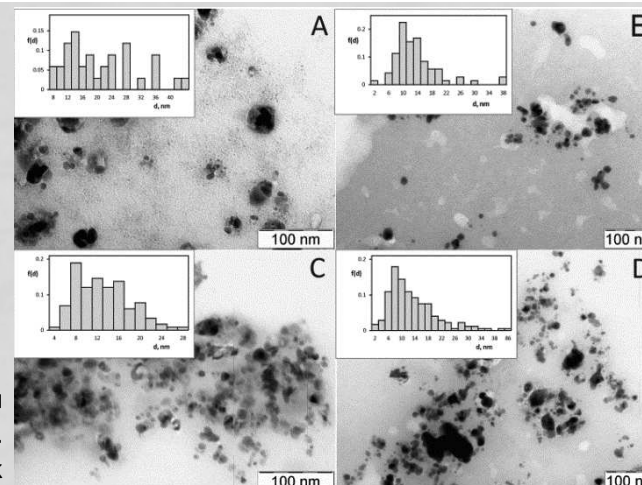
WIDMA UV-VIS OTRZYMANYCH NANOCZĄSTEK SREBRA



WIDMA UV-VIS OTRZYMANYCH NANOCZĄSTEK SREBRA



WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNE NANOCZĄSTEK SREBRA



Zdjęcia TEM nanocząstek srebra z płynu
pohodowlanego szczepu T1: A. LB; B. melasa; C.
1 ściek; D. 2 ściek

Płyn pochodzący z szczepu T1 na:	D_h [nm]		Zeta potential [mV]
LB	55 (350)*	0.24	-23
Melasa	36 (280)	0.23	-13.4
1. ściek browarniczy	4 (106)	0.27	-28.9
2. ściek browarniczy	5 (52)	0.34	-40.3

Średnica hydrodynamiczna, dyspersja
cząstek i wielkości potencjału zeta Ag-
NPs uzyskanych z pomiarów DLS

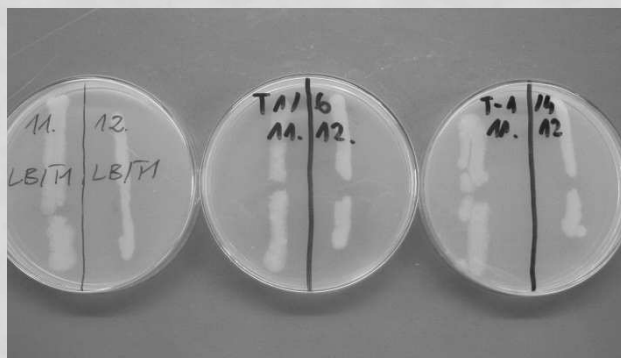
* liczby w nawiasie odpowiadają frakcji nanocząstek o większych rozmiarach

WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWBAKTERYJNE NANOCZĄSTEK SREBRA



Dwa rodzaje metod: kreskowa
Nanocząstki syntetyzowane biologicznie
Warunki:

- pożywka: LB (zestalona)
- temperatura: 30 °C
- inkubacja: max 48 godz.; odczyt po 24 i 48 godz.



Nanocząstki syntetyzowane w płynie
pohodowlanym szczepu T1 testowane na
szczepach:

11. *E.coli* ATCC 25922
12. *Pseudomonas fluorescens*



Nanocząstki syntetyzowane w
płynie pohodowlanym szczepu T'1
testowane na szczepach:

15. *Mycrobacterium flavescens*
16. *Acinetobacter johnsonii*



Nanocząstki syntetyzowane w
płynie pohodowlanym szczepu I'1a
testowane na szczepach:

13. *Pseudomonas fluorescens*
14. *Ralstonia picketti*

WYNIKI



Lp	Nazwa szczepu	T1			T'1			F'1a		
		1. ściek	2. ściek	LB	1. ściek	2. ściek	LB	1. ściek	2. ściek	LB
1.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotyp G	-	+	+	+	+	+	-	-	-
2.	<i>Micrococcus luteus</i> B	-	-	+	+	+	+	-	-	-
3.	<i>Paenibacillus bercinonensis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-
4.	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-
5.	<i>Micrococcus luteus</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-
6.	<i>Microbacterium testaceum</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-
7.	<i>Bordetella petrii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.	<i>Microbacterium testaceum</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-
9.	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	+	+	+	+	+	-	-	-
10.	<i>E.coli</i> JM 109	-	-	-	-	-	-	+	+	+
11.	<i>E.coli</i> ATCC 25922	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+
13.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	+
14.	<i>Ralstonia picketti</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-
15.	<i>Mycobacterium flavescens</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	-
16.	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-
17.	<i>Paenibacillus castaneae</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-

INTERAKCJE NANOCZĄSTEK SREBRA Z DNA

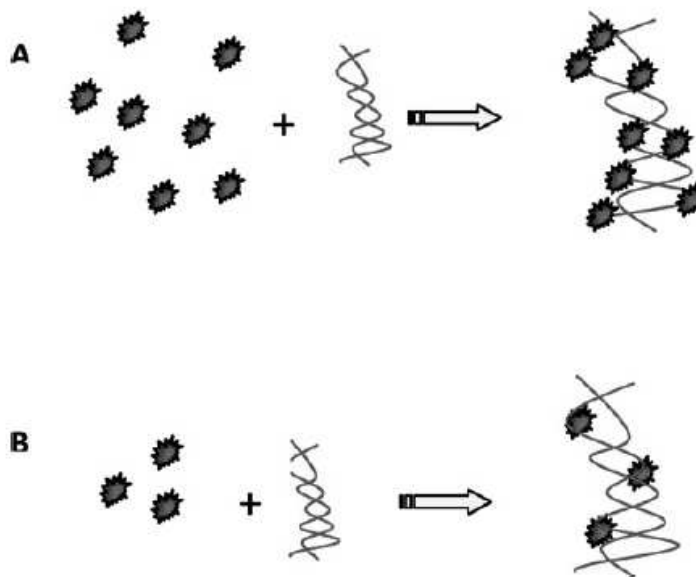
Metodyka:

I etap: izolacja DNA (kit Roche)

II etap: reakcja z DNA – warunki reakcji:

mieszanina 2 μ l DNA (bakteryjne)+ różne objętości roztworu z nanocząstkami srebra (2, 4, 6, 10 μ l)

III etap: rozdział na żelu agarozowym: 1 godz 15 min., 500 mA, 70 V

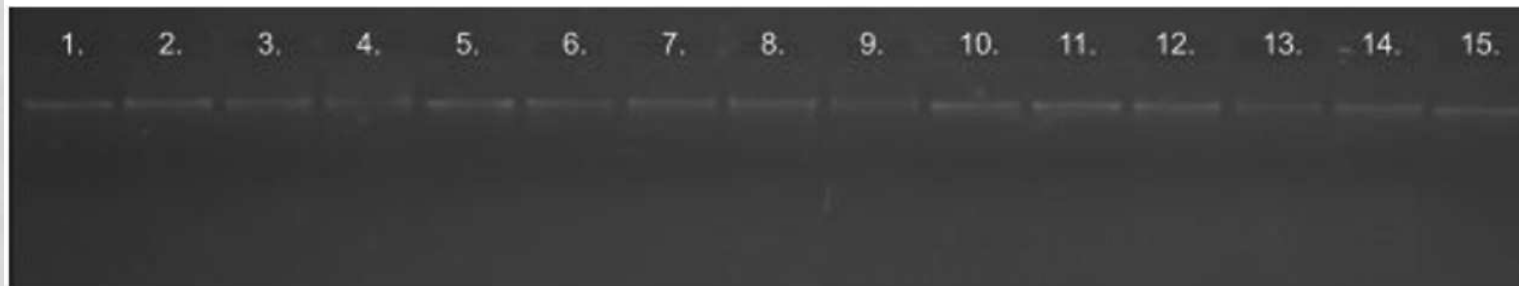


Interakcje nanocząstek srebra z DNA (MubarakAli et al. 2013)

WYNIKI



A.

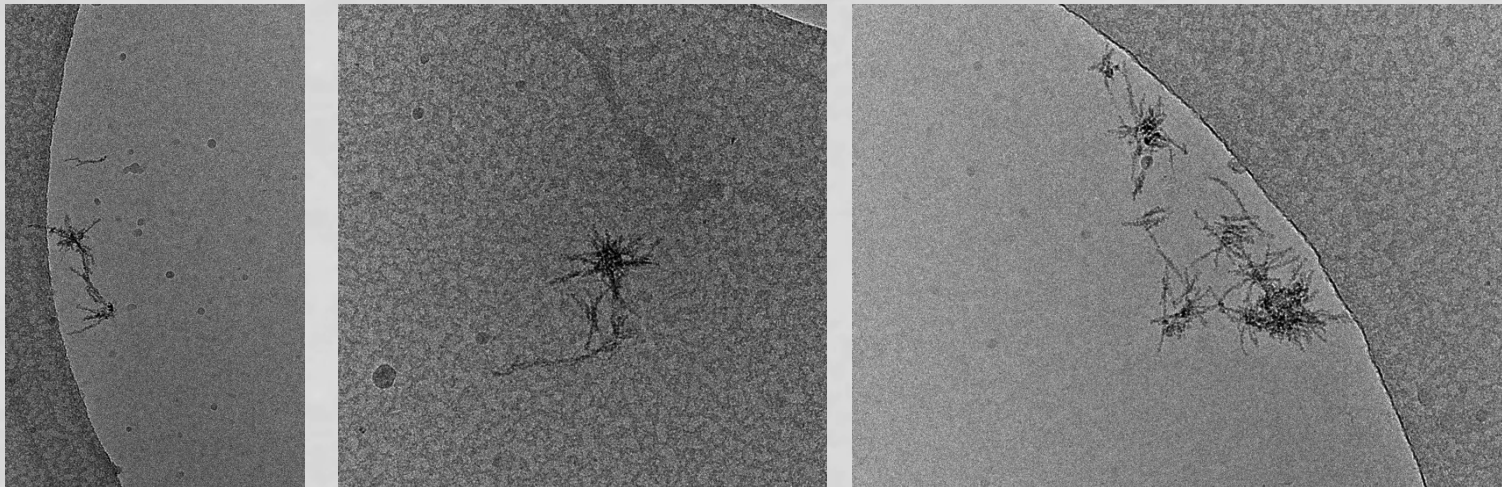


B.



Żel agarozowy z mieszaniną DNA *E.coli* (A) i *B.subtilis* (B) oraz nanocząstkami srebra o różnej objętość (2 μ l, 4 μ l, 6 μ l, 10 μ l)
1-4 1 ściek browarniczy; 6-9 2 ściek browarniczy; 11-14 melasa
5, 10, 15 kontrola

WYNIKI



Zdjęcia wykonane przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM), metodą szokowego zamrażania (cryo-TEM).

Mieszanka nanocząstek srebra syntetyzowanych przez szczep *Bacillus subtilis* l'1a na pożywce LB oraz roztwór DNA bakteryjnego.

WNIOSKI Z DOTYCHCZASOWYCH BADAŃ:



- ✓ Odpady rolno-spożywcze mogą być użyte jako podłoża do hodowli bakterii *Bacillus subtilis* i produkcji biosurfaktantów.
- ✓ Płyny pochodzące z hodowli szczepów *Bacillus subtilis* mogą być użyte do syntezy nanocząstek srebra.
- ✓ Badania wykazały, że nanocząstki srebra syntetyzowane biologicznie mają właściwości przeciwbakteryjne.
- ✓ Nanocząstki srebra wykazują tendencje do wiązania się z DNA bakteryjnym.

LITERATURA



1. Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J. J., Hofmann M. C. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol. Sci.* 2005, 2, 412-419.
2. Hussain S. M., Hess K. L., Gearhart J. M., Geiss K. T., Schlager J. J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL3A rat liver cells. *Toxicol. in Vitro* 2005, 19, 975-983.
3. Luoma S. N. Silver nanotechnologies and the environment: old problems or new challenges? PEN 15, september 2008 (report by Project on Emerging Nanotechnologies; <http://www.nanotechproject.org/publications/>).
4. Miura N., Shinohara Y. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009, 390, 733-737.
5. Santoro C. M., Duchsherer N. L., Grainger D. W. Minimal in vitro antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles. *Nanobiotechnol.* 2007, 3, 55-65.
6. Shin S. H., Ye M. K., Kim H. S., Kang H. S. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *Int. Immunopharmacol.* 2007, 7, 1813-1818.
7. Yen H. J., Hsu S. H., Tsai C. L. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small* 2009, 5, 1553-1561.
8. Farkas J., Christian P., Gallego Urea J. A., Roos N., Hassellöv M., Tollefsen K. E., Thomas K. V. Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 2010, 96, 44-52.
9. Lubick N. Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both? *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42, 8617.
10. Kiran G.S., SSabu A., Selvin J.: Synthesis of silver nanoparticles by glycolid biosurfactant produced from marine *Brevibacterium casei* MSA 19, 2010, *J. Biotechnol.* 148, 221-225.
11. Kvitěk L., Panacek A., Soukupova J., Kolar M., Vecerova R., Pucek 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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. Nanosci. Nanotech.* 9, 6693-6699.
15. Sileikaite A., Prosycevas I., Pieso J., Juraitis A., Guobiene A. Analysis of silver nanoparticles produced by chemical reduction of silver salt solution, 2006, *Mater. Sci.* 12, 287-291.
16. Singh B.R., Dwivedi S., Al-Khedhairi A.A., Musarrat J. Synthesis of stable cadmium sulfide nanoparticles using surfactin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* strain KSU-109, 2011, *Coll. Surf. B: Bioint.* 85, 207-213.
17. Slezakova K., Morais S., Maria do Carmo Pereira: Atmospheric Nanoparticles and Their Impacts on Public Health. Dr Alfonso Rodrigues-Morales (ed.), 2013. ISBN: 978-953-51-1121-4, DOI: 10.5772/54775.
18. Nowack B., Bucheli T.D.: Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollution* 2007; 150: 5-12.
19. Snopczyński T., Góralczyk K., Czaja K. i wsp.: Nanotechnologia – możliwości zagrożenia. *Roczn. PZH* 2009; 60(2): 101-111.
20. Arora S., Jain J., Rajwade J. M., Paknikar K. M. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009, 236, 310-318.
21. Hsin Y. H., Chen C. F., Huang S., Shih T. S., Lai P. S., Chueh P. J. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol. Lett.* 2008, 179, 130-139.
22. Hussain S. M., Hess K. L., Gearhart J. M., Geiss K. T., Schlager J. J.: In vitro toxicity of nanoparticles in BRL3A rat liver cells. *Toxicol. in Vitro* 2005, 19, 975-983.
23. Bogacka A., Kucharska E.: Wpływ hemodializy na produkcję wolnych rodników i nasilenie stresu oksydacyjnego. *Immunologia kliniczna: wybrane aspekty.* EDYCJA s.c., Olsztyn 2010, 193-202.
24. Langauer-Lewowicka H., Pawlas K. Nanocząstki, nanotechnologia- potencjalne zagrożenia środowiskowe i zawodowe. *Medycyna Środowiskowa- Environmental Medicine* 2014, Vol. 17, No. 2, 7-14.
25. Małaczewska J. Cytotoksyczność nanocząstek srebra. *Medycyna Wet.* 2010, 66 (12)



Dziękuję za uwagę

Joanna Chojniak

e-mail: chojniak@ietu.katowice.pl



Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych

ul. Kossutha 6, 40-844 Katowice

instytut badawczy KRS 0000058172 NIP 634-012-55-19
tel.: 32 254-60-31, faks: 32 254-17-17, e-mail: ietu@ietu.katowice.pl.

www.ietu.katowice.pl