

AGNIESZKA GAŚCZAK, ELŻBIETA SZCZYRBA, ANNA SZCZOTKA,
HANNA KOLARCZYK, ELŻBIETA SOŁTYS, BOŻENA JANUS

JAKI WPŁYW MAJĄ NANOCZĄSTKI TLENKU NIKLU NA WZROST SZCZEPU *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* KB2 W OBECNOŚCI FENOLU?

Instytut Inżynierii Chemicznej Polskiej Akademii Nauk, ul. Bałtycka 5, 44-100 Gliwice

Wprowadzenie do hodowli szczepu *St. maltophilia* KB2 nanocząstek tlenku niklu nie zahamowało procesu biodegradacji fenolu, a reakcja populacji bakterii była uzależniona od stężenia nanocząstek i użytego surfaktantu. Opracowano metodykę przygotowania stabilnej dyspersji badanych nanocząstek oraz oceniono wpływ wybranych surfaktantów na wzrost komórek szczepu *St. maltophilia* KB2.

Słowa kluczowe: biodegradacja, fenol, nanocząstki tlenku niklu,

The introduction of nickel oxide nanoparticles into the *St. maltophilia* KB2 cultures did not inhibit the phenol biodegradation process, and the reactions of the bacterial population were depended on the nanoparticles concentrations and the surfactant used. The methodology for the preparation of the tested nanoparticles stable dispersion was developed and the influence of selected surfactants on the growth of *St. maltophilia* KB2 cells was assessed.

Keywords: biodegradation, phenol, nickel oxide nanoparticles

1. WPROWADZENIE

Coraz więcej producentów jest zainteresowanych wykorzystaniem nanotechnologii w swoich wyrobach, a konsumenci wiążą z nią nadzieję na nowe leki, źródła energii i innowacyjne produkty codziennego użytku. Wzrostowi zapotrzebowania na nanomateriały, a w konsekwencji zwiększaniu ich produkcji, towarzyszy wzrost emisji nanocząstek do środowiska.

Zainteresowanie nanocząstkami wynika z ich szczególnych właściwości optycznych, fizycznych i chemicznych istotnie różnych od właściwości cząstek tego samego materiału, lecz o większych rozmiarach. Nanocząstki to struktury pośrednie pomiędzy atomami a obiektami mikroskopowymi; wg definicji przynajmniej jeden z wymiarów nie może przekraczać 100 nm. Większość nanocząstek składa się tylko z kilkuset atomów (atomy mają wielkość od 0,03 do 0,3 nanometra). W takich strukturach inicjowane są nowe zjawiska nietypowe ani dla konwencjonalnej formy

substancji ani dla atomów, z których jest ona zbudowana. Wzrost stosunku powierzchni do objętości i dostępności atomów powierzchniowych skutkuje zwiększoną reaktywnością i zdolnością adsorpcji, niestety jednocześnie te same cechy powodują zwiększoną podatność na kontaminację [1].

Nanocząstki są dostępne w otaczającym nas środowisku od setek lat, gdyż powstają nie tylko, jako materiały antropogeniczne (projektowane bądź uwalniane, jako niezamierzone produkty uboczne), lecz również w sposób naturalny. Korzyści płynące z nanotechnologii są szeroko nagłaśniane, jednakże dyskusja na temat potencjalnych skutków ich szerokiego zastosowania w produktach konsumpcyjnych i przemysłowych dopiero zaczyna się rozwijać. Do tej pory nie wyjaśniono jednoznacznie, w jakim stopniu nanocząstki oddziałują na organizmy żywe. Ze względu na różnice we właściwościach fizykochemicznych nie ma możliwości ekstrapolowania dla nanocząstek parametrów toksykologicznych wyznaczonych dla związków o tym samym składzie chemicznym, w skali mikro czy makro.

Nanocząstki zbudowane z białek i lipidów (np. biopolimery), czyli ze składników podobnych tym obecnym w komórkach, są uważane za biodegradowalne. Natomiast nanorurki węglowe, nanocząstki krzemionki i nanocząstki magnetyczne są nie biodegradowalne. Systematyczne ich uwalnianie do różnych ekosystemów, w szczególności do gleby, może stanowić zagrożenie dla bytujących tam mikroorganizmów, a w konsekwencji dla przebiegających w glebie procesów jej samooczyszczania. Mimo prowadzenia od kilku lat badań eksperymentalnych dotyczących ryzyka stwarzanego przez nanomateriały wciąż zbyt mało wiadomo o ich wpływie na środowisko naturalne.

Wytypowano 4 główne mechanizmy szkodliwego działania nanocząstek na komórki [2–5]:

- uwalnianie z powierzchni nanocząstki fragmentów jej struktury np. jonów – mechanizm charakterystyczny dla nanomateriałów metalicznych. Wewnątrz komórki jony metali bezpośrednio oddziałują z funkcjonalnymi grupami merkapto-, amino- i karboksylowymi białek i kwasów nukleinowych, uszkodzają enzymy, zmieniają strukturę komórki i ostatecznie hamują jej aktywność;
- blokowanie centrów aktywnych makrocząstek - czynnik steryczny;
- zaburzanie naturalnej homeostazy komórki (następuje przesunięcie równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w kierunku reakcji utleniania; stres oksydacyjny, wywołany przez reaktywne formy tlenu (rodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, rodnik peroksydowy, rodnik hydroperoksydowy, nadtlenek wodoru i tlen singletowy)
- wprowadzanie innych, toksycznych substancji. Zanieczyszczenia nanomateriałów są trudne do oznaczenia, a mogą być uwalniane po wnikięciu do komórki – efekt konia trojańskiego.

Ekspozycja drobnoustrojów na nieorganiczne nanocząstki może skutkować powstawaniem znacznie większej, niż są naturalnie wytwarzane w układach biologicznych, ilości reaktywnych form tlenu (RFT): rodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, rodnik peroksydowy, rodnik hydroperoksydowy, nadtlenek wodoru i tlen singletowy. Zawierają w swojej strukturze albo atomy tlenu z niesparowanym elektronem albo wiązania chemiczne O-O. Nadmiar reaktywnych form tlenu w komórkach bakterii może prowadzić do inaktywacji i trwałego uszkodzenia białek, w tym antyoksydantów, poprzez ich interakcje z resztami aminokwasowymi. Każdy rodzaj RFT charakteryzuje się specyficzną reaktywnością, np. tlen singletowy może zaburzać integralność błony poprzez utlenianie jej składników i inicjację peroksydacji lipidów. Rodnik ponadtlenkowy może nie być silnym utleniaczem; jest jednak substratem do tworzenia nadtlenu wodoru lub rodnika hydroksylowego. Mikrobiologiczny system obrony przed szkodliwym działaniem NP i RFT składa się z katalazy (CAT), peroksydazy (PER) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) wraz z niekatalitycznym, zredukowanym glutationem (GSH). CAT, PER i GSH neutralizują nadtlenek wodoru, a SOD obniża poziom rodnika ponadtlenkowego [6,7].

Aktywność biologiczna, mechanizm i kinetyka przenikania nanocząstek do wnętrza komórki i ich oddziaływanie na poszczególne organelle, zależą od kilku parametrów morfologicznych: wielkości i skłonności do aglomeracji, kształtu i stanu powierzchni. Formy nanometrowe mają znacznie bardziej rozwiniętą powierzchnię właściwą i są zdecydowanie bardziej aktywne od ich klasycznych odpowiedników. Zjawisko to można wykorzystać w celowanym dostarczaniu leków do miejsc zmienionych chorobowo. Może jednak także stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi i równowagi w środowisku naturalnym, przy czym największego zagrożenia wcale nie muszą stanowić najmniejsze nanocząstki. Wpływ aglomeratów i agregatów na toksyczność nie jest oczywisty, gdyż jest silnie uzależniony od rodzaju badanych komórek oraz ośrodka, w którym nanocząstki się znajdują. Potencjalnie aglomeraty są mniej szkodliwe niż ta sama masa wolnych nanocząstek. Formy sferyczne o współczynniku kształtu bliskim jedności znacznie łatwiej przenikają do wnętrza komórki niż np. nanopręty. Dla stopnia toksyczności nanomateriałów istotne są również: rozpuszczalność w koloidzie wypełniającym wnętrze komórki, czystość i rodzaj prekursorów syntezy, sposoby preparatyki, warunki przechowywania [1,8].

Nanocząstki tlenku niklu (NiO-NP) charakteryzują się wysoką wytrzymałością mechaniczną i stabilnością chemiczną. Są półprzewodnikami o szczególnych właściwościach magnetycznych (ferromagnetycznych), w przeciwieństwie do konwencjonalnego NiO, który jest izolatorem antyferromagnetycznym. Ze względu na swoje właściwości optyczne, magnetyczne, elektryczne i katalityczne znajdują szerokie zastosowanie w różnych sektorach przemysłu, nauce i medycynie np.: w katalizie, w syntezie stylbenów, uwodornianiu olefin, redukcji aldehydów i ketonów, w aktywnych filtrach optycznych, czujnikach temperatury i gazu (CO, H₂), ceramice, lotnictwie, elektronice. W biomedycynie nanocząstki tlenku niklu są szeroko stosowane ze względu na ich właściwości przeciwzapalne i przeciwbakteryjne oraz działanie

cytotoksyczne na komórki rakowe. Tlenek niklu w nanoskali może występować w postaci nano wstążek, nanoprętów czy nanoarkuszy [9].

Aby lepiej zrozumieć potencjał toksyczny nano tlenków metali i dokonać dokładnej oceny ich ryzyka, należy odpowiedzieć na pytanie, czy ich toksyczność jest spowodowana obecnością nanocząsteczek tlenków metali, tworzeniem się agregatów i aglomeratów czy uwalnianiem jonów metali, a może wynika z kombinacji tych czynników? Dla każdego nano tlenku metalu odpowiedź jest inna [10,11].

Przyjmuje się, że nano tlenki metali mają potencjał do rozpuszczania się w środowisku wodnym, co powoduje uwalnianie toksycznych jonów metali do otaczającego środowiska. Jednak ze względu na niejednoznaczne ich zachowanie w pożywkach oraz praktyczną trudność oceny zmian rozpuszczalności zjawisko to jest rzadko opisywane.

Zbadano rozpuszczalność nanocząstek: CuO, NiO i TiO₂ dla dwóch stężeń (100 lub 10 mg/l) i w dwóch ośrodkach: w wodzie i w zmodyfikowanym podłożu Eagle'a Dulbecco. Badanie to wykazało, że charakterystyka rozpuszczania nanocząstek zależy od rodzaju tlenku metalu, badanego ośrodka wodnego i początkowego stężenia, ponadto każdy nano tlenek wykazywał wyższą rozpuszczalność niż jego odpowiednik w większej skali. W podłożu Eagle'a Dulbecco nano NiO wykazywał zwiększoną rozpuszczalność przy wyższym stężeniu początkowym, natomiast w wodzie trend ten uległ odwróceniu i nano NiO wykazywał zwiększoną rozpuszczalność przy niższym stężeniu początkowym. Wyniki te wskazują na znaczenie oceny rozpuszczalności nanocząstek w płynach istotnych biologicznie w stężeniach odpowiadających testom toksyczności [10,12].

Sprawdzono rozpuszczalność 4 nano tlenków niklu (pochodzących z różnych źródeł, o różnych wielkościach i kształtach cząstek) w 6 płynach: czystej wodzie, roztworze nadtlenu wodoru, soli fizjologicznej, sztucznym roztworze śródmiąższowym (roztwór Gamble'a) i sztucznym roztworze lizosomalnym. Stężenia jonów Ni²⁺ rosły w czasie dla każdego badanego nano tlenku niklu w każdym roztworze. Nano NiO o cząstkach w kształcie nanoprętów, 24 godziny po zmieszaniu w płynie lizosomalnym rozpuścił się w 100%, podczas gdy w pozostałych pięciu roztworach tylko 3,5–6,5% tego tlenku rozpuściło się po 216 godzinach. Z kolei dla pozostałych próbek nano tlenku niklu uzyskano około 11, 0,70 i 33% rozpuszczenia po 216 godzinach w płynie lizosomalnym i od 0,14% do 6,3% w pozostałych pięciu płynach [13].

O potencjale przeciwbakteryjnym decyduje nie tylko fakt uwalniania jonów, ale także intensywność działania przeciwbakteryjnego poszczególnych jonów metali. Istnieje między tlenkami metali duża zmienność pod tym względem. Spośród opisanych w pracy [11] jonów metali, Ni²⁺ był najmniej szkodliwy, dopiero stężenia powyżej 10 mg/L wywoływały efekt inhibicji. Gdy w środowisku hodowlanym obecne były jony Ni²⁺, szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 utrzymał zdolność rozkładu fenolu, lecz nawet niewielkie ilości jonów tego metalu wpływały na przyrost komórek i efektywność degradacji fenolu.. Stężenia jonów niklu powyżej 30 mg·dm⁻³ całkowicie hamowały wzrost *St. maltophilia* KB2 [14].

Wang i in. [11] podsumowali wyniki swoich badań stwierdzeniem, że efekt antybakteryjny wywołany jest przez same nanocząstki tlenku niklu.

48-godzinne ostre testy na morskich planktonowych widłonogach *Centropages ponticus*, wykazały LC50 (48 h) 4 mg/L dla dorosłych samic. Agregację i osadzanie się nanocząstek NiO obserwowano przy stężeniach powyżej 2 mg/l. Narażenie na stężenia subletalne ($\geq 0,02$ mg/l przez 48 godzin) miało istotny negatywny wpływ na sukces reprodukcyjny u *C. ponticus*. Produkcja jaj po 24 i 48 godzinach zmniejszyła się odpowiednio o 32% i 46% przy odpowiednio 0,02 mg/l oraz 70% i 82% przy 2 mg/l. Nawet przy krótkotrwałej ekspozycji zaobserwowano wzrost aktywności enzymatycznej przeciwutleniaczy, co wskazuje, że NiO NP u *C. ponticus* może powodować stres oksydacyjny [15].

W kilku badaniach sprawdzono aktywność przeciwdrobnoustrojową nanocząstek NiO zarówno w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Wyniki testów prowadzonych metodą dyfuzji agarowej, którym poddano *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* wskazały na biokompatybilność nanocząstek NiO w niskim stężeniu (100 $\mu\text{g/ml}$); wprowadzone nanocząstki nie hamowały wzrostu zarówno mikroorganizmów Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych [16].

Na podstawie innych testów nanocząstki NiO zostały określone jako toksyczne dla *Escherichia coli* (3,45 M; EC50 26,502 ppm) [17], *Enterococcus faecalis* i *Acinobacter baumannii* dla wszystkich badanych stężeń (125, 250 i 500 $\mu\text{g/ml}$) [18] oraz Gram-dodatnich *S. aureus* i Gram-ujemnych *K. pneumonia* [9]. Jednym z sugerowanych mechanizmów zwiększonej aktywności przeciwbakteryjnej nanocząstek NiO była interakcja między ujemnym ładunkiem na powierzchniach nanocząstek a dodatnim ładunkiem powierzchni bakterii, zwłaszcza Gram-dodatnich [18].

Autorzy pracy [19] zaobserwowali, że NiO NP wykazywał mocniejsze działanie przeciwbakteryjne w stosunku do bakterii Gram-dodatnich (*B. subtilis*) niż do Gram-ujemnych (*E. coli*), co może być spowodowane silniejszymi oddziaływaniami elektrostatycznymi. W przypadku bakterii Gram-ujemnych obecność dodatkowych ujemnie naładowanych lipopolisacharydów (LPS) sprawia, że potencjał powierzchniowy jest bardziej ujemny w porównaniu z bakteriami Gram-dodatnimi. Według tych badaczy główny mechanizm aktywności przeciwbakteryjnej nano tlenku niklu opiera się na generowanym na powierzchni nanocząstek stresie oksydacyjnym. Autorzy potwierdzili, że powstające RFT wywierają silny wpływ na kondycję błony komórkowej bakterii, powodując jej uszkodzenie, a w konsekwencji śmierć komórki bakteryjnej.

Powyższe ustalenia są poparte także wynikami uzyskanymi przez Khashana i wsp. [20], którzy badali wpływ obecności NiO NP na żywotność bakterii: *Pseudomonas aurogenisa*, *Escherichia coli* (bakterie Gram-ujemne), *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pneumonia* (bakterie Gram-dodatnie). Odnotowano, że nanocząstki niklu są skutecznym środkiem bakteriobójczym zarówno wobec szczepów Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, jednak bakterie Gram-dodatnie są bardziej wrażliwe.

Zaobserwowano, że po wprowadzeniu do kultury bakteryjnej nanocząstek, zachodzą zmiany w morfologii błony komórkowej powodujące znaczny wzrost jej przepuszczalności. Mechanizm ten pozwala skutecznie zwiększać penetrację i akumulację amoksyliny w komórkach bakterii. W porównaniu z aktywnością amoksyliny lub samych nanocząstek Ni, skuteczność hamowania wzrostu bakterii można znacznie zwiększyć wprowadzając je jednocześnie. Stopień hamowania wzrostu *S. pneumonia* przez nanocząstki Ni wynosi 10%, przez amoksylinę -15% (15 µg ml⁻¹ amoksyliny) i 28% (30 µg ml⁻¹ amoksyliny). Gdy w hodowli obecna była amoksyliny (30 µg ml⁻¹) oraz nanocząstki Ni, skuteczność inhibicji wzrosła do 35%.

Dla ośmiu szczepów bakterii: *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *S. marcescens*, *S. epidermidis*, *M. luteus* and *B. subtilis* wyznaczono minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC). Najbardziej wrażliwy okazał się szczep *Staphylococcus epidermidis*, dla którego wyznaczono MIC=0,39 mg/ml oraz MBC=0,78 mg/ml. Najbardziej odporne były szczepy *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa*, dla których maksymalne testowane stężenie 100 mg/ml nie było ani bakteriobójcze ani inhibujące. Także w tej pracy potwierdzono większą wrażliwość bakterii Gram-dodatnich [21].

Na toksyczność nanocząstek NiO wpływ ma także sposób ich syntezy. Nanocząstki uzyskane na drodze tzw. zielonej syntezy są łagodniejsze dla środowiska w porównaniu z bardziej toksycznymi (wskutek wzmożonego tworzenia się reaktywnych form tlenu) nanocząstkami uzyskanymi metodami chemicznymi [22].

Nie zawsze współwystępowanie nanocząstek metali lub ich tlenków z bakteriami prowadzi do dezaktywacji mikroorganizmów. W pracach [23] oraz [24] podano kilka przykładów pozytywnego wpływu nanocząstek na biodegradację pyrenu i innych węglowodorów. Pozytywny efekt w postaci zwiększenia populacji drobnoustrojów i zwiększenia aktywności enzymów w czasie biodegradacji kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego wywołało zastosowanie nanocząstek Fe₃O₄ w połączeniu z mikroorganizmami glebowymi [24]. Połączenie biodegradacji i utleniania typu Fentona doprowadziło do skuteczniejszego, niż w czasie biodegradacji jednoetapowej, usuwania naftalenu. Po zastosowaniu żelaza o zerowej wartościowości w nanoskali, skuteczność usuwania naftalenu i pojawiających się metabolitów wzrosła do 91,6% [25].

Każda nanostruktura powinna być rozpatrywana oddzielnie, ponieważ każda charakteryzuje się specyficznymi właściwościami i może posiadać inne mechanizmy działania. Autorzy wspomnianych powyżej badań w większości zaobserwowali antibakteryjne działanie nano tlenku niklu. Wciąż jednak nie stwierdzono jednoznacznie, który mechanizm jest odpowiedzialny za wywołanie takiego efektu. W niniejszej pracy podjęto próbę oceny wpływu obecności nanocząstek tlenku niklu na wzrost szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 oraz efektywność prowadzonej przez ten szczep biodegradacji fenolu.

2. MATERIAŁY I METODY

Szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 pozyskano z kolekcji Zespołu Biochemii i Genetyki Mikroorganizmów Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Dostępny jest także w kolekcji VTT (Finlandia) pod numerem E-113197.

W kolejnych testach wykorzystywano komórki wcześniej przystosowane do wykorzystania fenolu jako źródła węgla i energii. Procedurę ich pozyskiwania opisano we wcześniejszej pracy [26]. W zasadniczych eksperymentach stosowano pożywkę o zredukowanej ilości fosforanów [14]. Hodowle prowadzono w kolbach Erlenmayera (500ml), w stałej temperaturze i przy szybkości wytrząsania 150 rpm. Objętość zawiesiny w kolbach wynosiła 150 ml co zapewniało bakteriom dostateczną ilość tlenu. Do każdej kolby dodawano fenol jako substrat wzrostowy, uzyskując stężenie początkowe fenolu $100 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$.

W testach wykorzystywano roztwory surfaktantów: cytrynianu sodu, SDS, CTAB oraz Pluronicu 123 (P123) o stężeniu 0,33 lub 5 mM.

Nanoproszek tlenku niklu (Pol-Aura, wielkość nanocząstek nie przekracza 20nm) wprowadzano do układów biologicznych w postaci zawiesiny utworzonej na bazie roztworu soli mineralnych (pożywki) z dodatkiem surfaktantu (od 0,0444 do 0,111 mM). Korzystano z dwóch zawiesin o stężeniach: 50 i 100 $\text{mg}_{\text{NiO NP}} \cdot \text{L}^{-1}$, które sonikowano (20 minut, amplituda 30%, moc 700W) bezpośrednio przed użyciem.

Zmiany ilości komórek mikroorganizmów oznaczano metodą spektrofotometryczną (spektrofotometr HACH 3900), poprzez pomiar absorbancji zawiesiny (długość fali $\lambda=550 \text{ nm}$).

Obecność fenolu monitorowano stosując metodę kolometryczną z wykorzystaniem paranitroaniliny. Próbki po pobraniu z kolb wirowano, a następnie supernatant przefiltrowywano przy użyciu filtra strzykawkowego ($0,2 \mu\text{m}$). Do tak przygotowanej próbki dodawano dwuazowaną p-nitroanilinę, 10% Na_2CO_3 i 10% NaOH , a następnie mierzono absorbancję przy długości fali 480 nm.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

3.1. STABILNOŚĆ UKŁADU DYSPERSYJNEGO

Ważnym i trudnym etapem prowadzonych badań było przygotowanie stabilnej zawiesiny nanocząstek tlenku niklu, którą wykorzystywano w kolejnych testach. Istotnym zagadnieniem jest utrzymanie rozdrobnienia cząstek i jednorodności takiego preparatu. Na stabilność zawiesin i koloidów składają się stabilność chemiczna i fizyczna. Stabilność chemiczna to brak skłonności cząstek do przemian chemicznych, zaś stabilność fizyczna jest określona przez wypadkową sił grawitacji, oddziaływań międzycząsteczkowych, oddziaływań między powierzchniami międzyfazowymi oraz efektu sterycznego. Zależy od zawartości objętościowej cząstek, ich wielkości

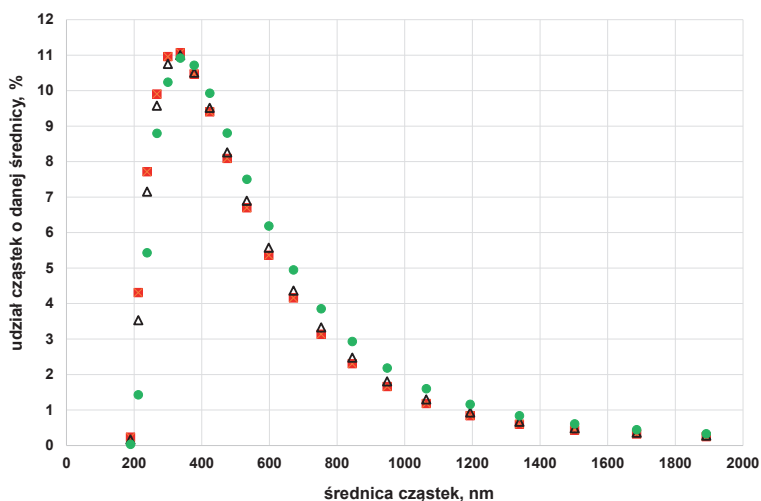
i migracji, na które z kolei wpływ mają takie czynniki jak: wymiar, kształt, polarność, budowa chemiczna, temperatura, pH, gęstość i lepkość cieczy. Fizyczna destabilizacja przejawia się zmianą wielkości cząstek (aglomeracja, agregacja, rekrytalizacja Ostwalda) oraz lokalnymi zmianami zawartości cząstek w danej objętości cieczy (sedymentacja, śmietankowanie). Częsty kontakt pomiędzy cząstkami, np. wskutek ruchów Browna, sprzyja aglomeracji i agregacji. Gdy cząsteczki stykają się swymi powierzchniami zachodzi nieodwracalna agregacja. Natomiast aglomeraty mogą być rozbite na mniejsze lub nawet na indywidualne cząstki w wyniku zastosowania homogenizacji mechanicznej lub ultradźwiękowej [1,27]. Rozbijanie ultradźwiękami można wykonać za pomocą homogenizatora ultradźwiękowego typu sondy lub urządzenia do kąpeli ultradźwiękowej. Istnieją jednak między nimi znaczne różnice w wydajności i skuteczności. Urządzenie do kąpeli ultradźwiękowej może generować słabe ultradźwięki o wartości około 20–40 W/L i bardzo nierównomierny ich rozkład, podczas gdy urządzenie z sondą ultradźwiękową może zapewnić tysiącrotnie większą moc [28,29].

Analiza publikacji poświęconych tej technice niestety wykazała dużą rozpiętość stosowanych parametrów pracy sonikatora: czasu trwania sonikacji (od 3 minut do 2 godzin), częstotliwości (od 20 do 40 kHz) oraz mocy (od 100 do 750 W) [27,29-31]. Zwłaszcza na temat ustalenia optymalnego czasu trwania sonikacji pojawia się wiele sprzecznych doniesień. W pracy [28] podano, że wydłużenie czasu i mocy ultradźwięków prowadzi do zwiększenia stabilności nanocieczonej i zmniejszenia rozmiaru klastrow. Natomiast Nguyen i wsp. [30] uznali, że optymalny czas sonikacji to 3 minuty, a przedłużanie sonikacji może prowadzić do reaglomeracji cząstek.

Jeśli zawiesina nie jest wystarczająco ustabilizowana to w krótkim czasie po zastosowaniu wibracji ultradźwiękowej może zachodzić reaglomeracja. Tendencja ta jest szczególnie silna w przypadku małych cząstek, ze względu na duży udział atomów powierzchniowych w stosunku do atomów objętościowych. Warunkiem stabilności dyspersji wodnej jest wartość potencjału zeta większa niż 30 mV. Wzrost wartości potencjału zeta można osiągnąć wprowadzając do układu surfaktanty lub znacznie zmieniając wartość pH. Długie cząsteczki surfaktantu umieszczone pomiędzy nanocząstkami umożliwiają zachowanie pewnej odległości między nimi i niedopuszczenie do bliskiego kontaktu (efekt steryczny). Przy właściwym dla danej dyspersji pH, na powierzchni cząstek wytwarzają się ładunki jednoimienne, dzięki czemu cząstki się odpychają, a to utrudnia proces aglomeracji [32,33].

W badaniach dotyczących układów biologicznych zakres stosowanego pH jest dość wąski, więc metoda oparta na manipulowaniu wartością pH została odrzucona. Jako surfaktanty wybrano trzy modelowe związki powierzchniowo czynne różniące się charakterem chemicznym: anionowe dodecylosiarczan sodu (SDS) i cytrynian sodu, kationowy bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (CTAB) oraz niejonowy Pluronic 123. Przedstawione surfaktanty posiadają istotne znaczenie praktyczne; taki dobór reprezentantów umożliwi porównanie wpływu surfaktantów o odmiennym charakterze chemicznym na badane układy. Pozostało jeszcze zagadnienie kolejności stosowania

ultradźwięków i surfaktantów. Bihari i wsp. [33] sprawdzili rozkład wielkości cząstek w dyspersjach przygotowywanych w różnych wariantach: bez sonikacji (obecny surfaktant), sonikacja przed wprowadzeniem surfaktantu, różna intensywność sonikacji. Dla opisywanej przez nich dyspersji nanocząstek TiO_2 najkorzystniejsze okazało się przeprowadzenie sonikacji przed wprowadzeniem surfaktantu.



Rys. 1. Procentowy udział cząstek o danych średnicach w zawiesinach z cytrynianem sodu sonikowanych przez 20 minut: ■ pomiar po przygotowaniu, ▲ pomiar godzinę po przygotowaniu; ● sonikacja przed dodaniem cytrynianu sodu;

Fig. 1. Particle percentage in the size distribution in the suspensions with sodium citrate sonicated for 20 minutes; ■ measurement after preparation, ▲ measurement one hour after preparation; ● sonication before adding sodium citrate;

W niniejszej pracy hydrodynamiczny rozkład wielkości nanocząstek w różnych układach sprawdzono metodą dyfrakcji laserowej, przy użyciu aparatu Malvern 2000. Na rysunku 1 zaprezentowano procentowy udział poszczególnych frakcji cząstek tlenku niklu w zawiesinach przygotowanych na bazie roztworu soli mineralnych z dodatkiem cytrynianu sodu, którą sonikowano przez 20 minut (pomiar bezpośrednio po przygotowaniu i po godzinie) oraz w zawiesinie na bazie roztworu soli mineralnych, do której dodano cytrynian sodu dopiero po 20 minutowym sonikowaniu. Zastosowanie ultradźwięków przed wprowadzeniem surfaktantu spowodowało spadek udziałów najmniejszych cząstek. Rozkład wielkości cząstek w pożywce mineralnej oraz w zawiesinach zawierających cytrynian sodu lub CTAB był bardzo zbliżony (tabela 1). Ze względu na silne pienienie próbek, nie można było przeprowadzić pomiaru wielkości cząstek w obecności pozostałych surfaktantów.

Tabela 1. Udziały nanocząstek w różnych dyspersjach.
Table 1. Shares of nanoparticles in different dispersions.

Ośrodek dyspersyjny	Sonikacja	Udział cząstek o średnicy poniżej 475 nm, %	Udział cząstek o średnicy poniżej 950 nm, %
Pożywka	20 minut	71,7	95,4
Pożywka + cytrynian	20 minut	72,15	95,5
Pożywka + cytrynian; pomiar po godzinie	20 minut	70,5	94,9
Pożywka + cytrynian	20 minut, przed dodaniem cytrynianu	66,3	93,9
Pożywka + CTAB	20 minut	70,3	94,8

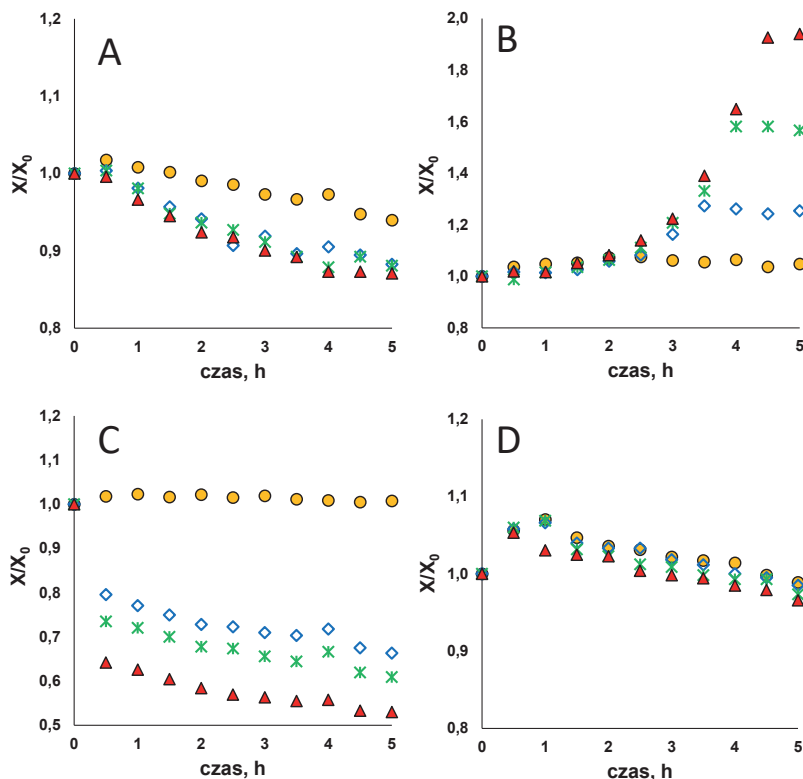
Stwierdzono, że w analizowanych próbkach średnicę poniżej 475 nm ma od 66% do 72% cząstek, zaś średnicę poniżej 950 nm ma od 93% do 95,5 % cząstek. W żadnej z próbek nie wykazano obecności cząstek mniejszych niż 180 nm.

3.2. SURFAKTANTY

Wprowadzane wraz z zawiesiną nanocząstek surfaktanty mogą wpływać na przebieg procesu biodegradacji fenolu. Pozytywny lub negatywny wpływ dodatku związków powierzchniowo–czynnych silnie zależy od szczepu bakterii, interakcja między nimi jest unikalna dla każdego układu węglowodór–surfaktant–mikroorganizm. Środki powierzchniowo–czynne tylko zwiększają wchłanianie składników poprzez micelną solubilizację i emulsyfikację, lecz mogą również zmieniać charakterystykę powierzchni komórek drobnoustrojów. Co więcej, węglowodory w takich mieszaninach mogą być trudniej dostępne, a surfaktanty mogą charakteryzować się naturalną biodegradowalnością lub wręcz odwrotnie – toksycznością [34,35].

Stąd konieczne było przeprowadzenie kilku dodatkowych testów przed wprowadzeniem do układów mikrobiologicznych zawiesiny nanocząstek przygotowanej z dodatkiem surfaktantu. W pierwszej serii testowano układy, w których surfaktanty były jedynymi dostępnymi dla bakterii związkami organicznymi, w drugiej serii hodowle suplementowano dodatkowo fenolem. Przyrosty biomasy w zawiesinach o różnych stężeniach związków powierzchniowo–czynnych zilustrowano wykresami zależności $X/X_0=f(t)$. Jeden z wybranych przez nas surfaktantów – CTAB, poza najniższym badanym stężeniem, okazał się silnym inhibitorem wzrostu szczepu KB2 (rys.2C). W całym zakresie badanych stężeń P123 zanotowano niewielki przyrost biomasy w pierwszej godzinie i spadek wartości stosunku X/X_0 w kolejnych pomiarach. Dla SDS taki efekt zaobserwowano tylko dla najniższego stężenia tego surfaktantu (rys.2 A i D). Natomiast cytrynian sodu był wykorzystywany przez badany szczep

bakterii jako źródło węgla i energii co skutkowało, proporcjonalnym do stężenia substratu, przyrostem biomasy (rys.2B).

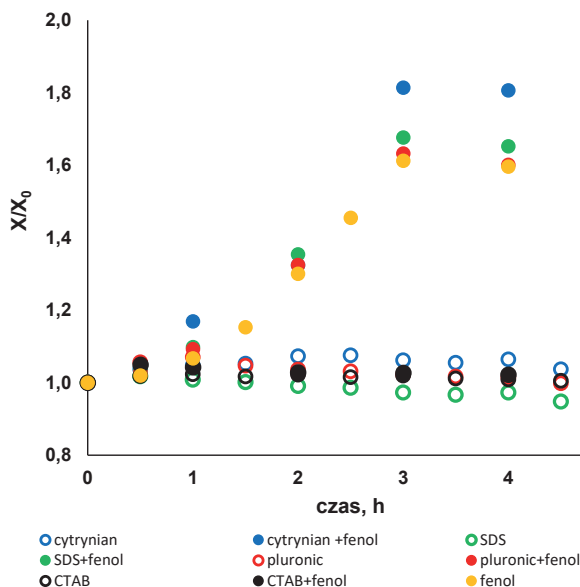


Rys. 2. Surfaktanty jako źródło węgla i energii dla szczepu *St. maltophilia* KB2. A) SDS; B) cytrynian sodu; C) CTAB; D) Pluronic 123; Stężenia, mM: 0,067 ●; 0,333 ◆; 0,666 *; 1 ▲

Fig. 2. Surfactants as a source of carbon and energy for the strain *St. maltophilia* KB2; A) SDS; B) sodium citrate; C) CTAB; D) Pluronic 123; Concentrations: 0.067 ●; 0.333 ◆; 0.666 *; 1 ▲

Na rysunku 3 porównano przebieg hodowli prowadzonych z udziałem surfaktantów w stężeniu 0,067mM oraz fenolu ($100 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$) lub bez tego substratu. Przy takim stężeniu CTAB nie zaobserwowano wzrostu stężenia biomasy ani zmiany stężenia fenolu. Co prawda SDS oraz Pluronic123, jako pojedyncze substraty, wykazały słaby charakter inhibitujący, jednak w układach surfaktant-fenol-mikroorganizmy nie zaobserwowano spadku wartości X/X_0 , a nawet, w porównaniu z hodowlą prowadzoną bez surfaktantów, uzyskane dla SDS wartości X/X_0 były wyższe. Zarówno w przypadku SDS, jak i P123 degradacja fenolu trwała o godzinę dłużej niż w hodowli nie zawierającej surfaktantu. W obecności cytrynianu sodu również stwierdzono wydłużenie czasu rozkładu fenolu,

lecz przyrost biomasy był intensywniejszy. Nie monitorowano stężenia surfaktantu, możemy więc tylko przypuszczać, na podstawie analizy wykresów $X/X_0=f(t)$ (rys.2B i rys.3), że cytrynian jest dodatkowym źródłem węgla i energii dla szczepu KB2.



Rys. 3. Wpływ obecności surfaktantów w stężeniu 0,067 mM na wzrost szczepu *St. maltophilia* KB2 w hodowlach o początkowym stężeniu fenolu $100 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$.

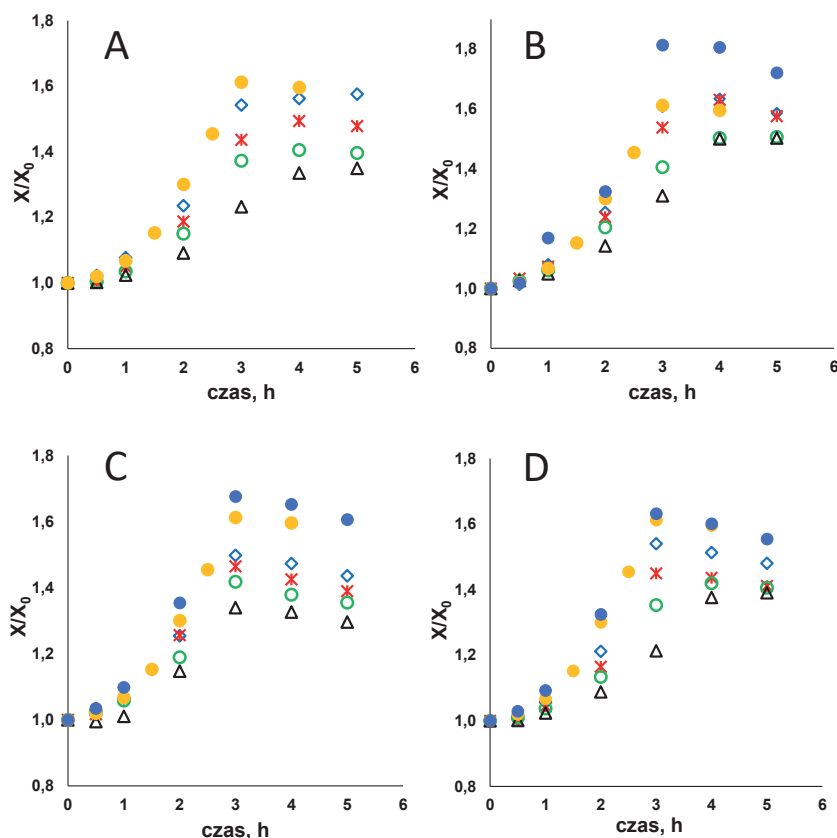
Fig. 3. The effect of the surfactants presence at a concentration of 0.067 mM on the *St. maltophilia* KB2 growth in cultures with an initial phenol concentration of $100 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$.

3.3. NANOCZĄSTKI

Wpływ obecności nanocząstek tlenku niklu badano w hodowli bez surfaktantu oraz w hodowlach z niewielkim dodatkiem cytrynianu sodu, SDS lub Pluronic 123. Ze względu na wstrzymany rozkład fenolu i opisaną wcześniej inhibicję wzrostu komórek surfaktantem CTAB, zrezygnowano z tego związku powierzchniowo–czynnego. Wprowadzenie do hodowli nanocząstek tlenku niklu nie zahamowało procesu biodegradacji fenolu, a reakcja populacji bakterii była uzależniona od sposobu przygotowania zawiesiny nanocząstek. Wydłużenie czasu trwania rozkładu fenolu z 3 do 4 godzin zaobserwowano po wprowadzeniu największych dawek nano NiO w postaci koloidu przygotowanego z dodatkiem P123 lub cytrynianu sodu. We wszystkich testach stwierdzono słabszy przyrost biomasy, proporcjonalny do stężenia nanocząstek (rys.4). Im więcej nano tlenku wprowadzano, tym niższe końcowe stężenie

biomasy uzyskiwano. W tabeli 2 przedstawiono przyrosty biomasy w postaci stosunku X/X_0 przy najniższych stężeniach surfaktantów w różnych układach eksperymentalnych. Efekt inhibicji wywołany wprowadzeniem nanocząstek widoczny jest dla każdego surfaktantu.

Biorąc pod uwagę uzyskane rozbitcie aglomeratów, inhibicję wzrostu komórek, przebieg hodowli w układach surfaktant-fenol-mikroorganizmy, ocenę wpływu obecności nano tlenku niklu na biodegradację fenolu należy oprzeć o wyniki pomiarów w układzie cytrynian sodu-fenol-nano tlenek niklu- szczep KB2.



Rys. 4. Wpływ różnych stężeń nano tlenku niklu na wzrost szczepu *St. maltophilia* KB2; początkowe stężenie fenolu $100 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$; stężenia nano tlenku, $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$: 0 ● ; 13,3 ◆ ; 20 * ; 26,6 ○ ; 33,3 ▲
 A) brak surfaktantu; B) cytrynian sodu; C) SDS; D) Pluronic 123; tylko fenol ●.

Fig. 4. Effect of different nano nickel oxide concentration on the growth of *St. maltophilia* KB2; initial phenol concentration $100 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$; nano oxide concentrations, $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$: 0 ● ; 13,3 ◆ ; 20 * ; 26,6 ○ ; 33,3 ▲
 A) without surfactant; B) sodium citrate; C) SDS; D) Pluronic 123; phenol alone ●.

Tabela 2. Porównanie uzyskanych w obecności różnych surfaktantów wartości stosunku X/X_0 .
 Table 2. Comparison of the X/X_0 ratio obtained for different surfactants.

	Cytrynian sodu	Pluronic123	SDS
Surfaktant (0,067mM)	1,075	1,069	1,017
Surfaktant+fenol	1,814	1,676	1,676
Surfaktant+fenol+nanocząstki	1,635	1,540	1,498

WNIOSKI

- Aktywność biologiczna nanocząstek jest zależna od ich rozmiaru, składu chemicznego, struktury powierzchni, rozpuszczalności, kształtu i skłonności do agregacji.
- Jako potencjalne mechanizmy oddziaływania antybakteryjnego wymienia się wpływ na strukturę i funkcjonowanie błon komórkowych, zaburzenia procesów metabolicznych na skutek tworzenia się reaktywnych form tlenu oraz negatywny wpływ na aktywność enzymów.
- Ze względu na rozkład wielkości cząstek najkorzystniejszy sposób przygotowania bazowej zawiesiny nano tlenku niklu to wprowadzenie do roztworu soli mineralnych cytrynianu sodu przed 20 minutową sonikacją.
- Ze względu na silną inhibicję CTAB nie należy prowadzić testów oceniających właściwości szczepu KB2 w obecności tego surfaktantu.
- Wykorzystywane w badaniach surfaktanty nie tylko stabilizowały bazową zawiesinę nanocząstek, lecz także miały wymierny wpływ na wzrost liczby bakterii oraz przebieg biodegradacji fenolu.
- Szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 utrzymuje zdolność rozkładu fenolu w środowisku zawierającym nanocząstki tlenku niklu.

OZNACZENIA – SYMBOLS

X	– stężenie biomasy, $\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ biomass concentration
X_0	– początkowe stężenie biomasy, $\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ initial biomass concentration
t	– czas, h time

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE – REFERENCES

- [1] Świdarska-Środa A., Łojkowski W., Lewandowska M., Kurzydłowski K., 2016. Świat nanocząstek, PWN Warszawa
- [2] Buchman, J.T., Hudson-Smith, N.V., Landy, K.M., Haynes, C.L., 2019. Understanding Nanoparticle Toxicity Mechanisms To Inform Redesign Strategies To Reduce Environmental Impact. *Acc. Chem. Res.* 52, 1632–1642. doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00053
- [3] Nastulyavichus, A., Shahov, P., Khaertdinova, L., Tolordava, E., Saraeva, I., Yushina, Y., Rudenko, A., Ionin, A., Khmelinskiy, R., Khmelenin, D., Borodina, T., Kharin, A., Kudryashov, S., 2021. Bactericidal impact of nickel-oxide nanoparticles on foodborne pathogens: Complementary microbiological and IR-spectroscopic insights. *Applied Surface Science* 558, 149857. doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.149857
- [4] Slavin, Y.N., Asnis, J., Häfeli, U.O., Bach, H., 2017. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnol* 15, 65. doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z
- [5] Soares, E.V., Soares, H.M.V.M., 2021. Harmful effects of metal(loid) oxide nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 1379–1394. doi.org/10.1007/s00253-021-11124-1
- [6] Guerrero Correa, M., Martínez, F.B., Vidal, C.P., Streitt, C., Escrig, J., de Dicastillo, C.L., 2020. Antimicrobial metal-based nanoparticles: a review on their synthesis, types and antimicrobial action. *Beilstein J. Nanotechnol.* 11, 1450–1469. doi.org/10.3762/bjnano.11.129
- [7] Metryka, O., Wasilkowski, D., Mroziak, A., 2021. Insight into the Antibacterial Activity of Selected Metal Nanoparticles and Alterations within the Antioxidant Defence System in *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus epidermidis*. *IJMS* 22, 11811. doi.org/10.3390/ijms222111811
- [8] Auffan, M., Rose, J., Wiesner, M.R., Bottero, J.-Y., 2009. Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environmental Pollution* 157, 1127–1133. doi.org/10.1016/j.envpol.2008.10.002
- [9] Hussein, B.Y., Mohammed, A.M., 2021. Biosynthesis and characterization of nickel oxide nanoparticles by using aqueous grape extract and evaluation of their biological applications. *Results in Chemistry* 3, 100142. doi.org/10.1016/j.rechem.2021.100142
- [10] Avramescu, M.-L., Chénier, M., Palaniyandi, S., Rasmussen, P.E., 2020. Dissolution behavior of metal oxide nanomaterials in cell culture medium versus distilled water. *J Nanopart Res* 22, 222. doi.org/10.1007/s11051-020-04949-w
- [11] Wang, D., Lin, Z., Wang, T., Yao, Z., Qin, M., Zheng, S., Lu, W., 2016. Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: The nanoparticles, the ions, or a combination of both? *Journal of Hazardous Materials* 308, 328–334. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.066
- [12] Oukarroum, A., Barhouni, L., Samadani, M., Dewez, D., 2015. Toxic Effects of Nickel Oxide Bulk and Nanoparticles on the Aquatic Plant *Lemna gibba* L. *BioMed Research International* 2015, 1–7. doi.org/10.1155/2015/501326
- [13] Shinohara, N., Zhang, G., Oshima, Y., Kobayashi, T., Imatanaka, N., Nakai, M., Sasaki, T., Kawaguchi, K., Gamo, M., 2017. Kinetics and dissolution of intratracheally administered nickel oxide nanomaterials in rats. *Part Fibre Toxicol* 14, 48. doi.org/10.1186/s12989-017-0229-x
- [14] Gąszczak, A., Szczyrba E., Szczotka, A., Greń, I., 2021. Effect of Nickel as Stress Factor on Phenol Biodegradation by *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. *Materials* 14, no. 20: 6058. doi.org/10.3390/ma14206058
- [15] Djebbi, E., Bonnet, D., Pringault, O., Tlili, K., Yahia, M.N.D., 2021. Effects of nickel oxide nanoparticles on survival, reproduction, and oxidative stress biomarkers in the marine calanoid copepod *Centropages ponticus* under short-term exposure. *Environ Sci Pollut Res* 28, 21978–21990. doi.org/10.1007/s11356-020-11781-1
- [16] Khairnar, S.D., Shrivastava, V.S., 2019. Facile synthesis of nickel oxide nanoparticles for the degradation of Methylene blue and Rhodamine B dye: a comparative study. *Journal of Taibah University for Science* 13, 1108–1118. doi.org/10.1080/16583655.2019.1686248
- [17] Kar, S., Pathakoti, K., Tchounwou, P.B., Leszczynska, D., Leszczynski, J., 2021. Evaluating the cytotoxicity of a large pool of metal oxide nanoparticles to *Escherichia coli*: Mechanistic

- understanding through In Vitro and In Silico studies. *Chemosphere* 264, 128428. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128428
- [18] Altaee, M.F., Yaaqoob, L.A., Kamona, Z.K., 2020. Evaluation of the Biological Activity of Nickel Oxide Nanoparticles as Antibacterial and Anticancer Agents. *eijs* 2888–2896. doi.org/10.24996/eijs.2020.61.11.12
- [19] Behera, N., Arakha, M., Priyadarshinee, M., Pattanayak, B.S., Soren, S., Jha, S., Mallick, B.C., 2019. Oxidative stress generated at nickel oxide nanoparticle interface results in bacterial membrane damage leading to cell death. *RSC Adv.* 9, 24888–24894. doi.org/10.1039/C9RA02082A
- [20] Khashan, K.S., Sulaiman, G.M., 2016. Synthesis, characterization and antibacterial activity of colloidal NiO nanoparticles. *Pak. J. Pharm. Sci.* 7.
- [21] Ilbeigi, G., Kariminik, A., Moshafi, M.H., 2019. The Antibacterial Activities of NiO Nanoparticles Against Some Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Strains. *Int J Basic Sci Med* 4, 69–74. doi.org/10.15171/ijbsm.2019.14
- [22] Vijaya Kumar, P., Jafar Ahamed, A., Karthikeyan, M., 2019. Synthesis and characterization of NiO nanoparticles by chemical as well as green routes and their comparisons with respect to cytotoxic effect and toxicity studies in microbial and MCF-7 cancer cell models. *SN Appl. Sci.* 1, 1083. doi.org/10.1007/s42452-019-1113-0
- [23] Kumari, B., Singh, D.P., 2016. A review on multifaceted application of nanoparticles in the field of bioremediation of petroleum hydrocarbons. *Ecological Engineering* 97, 98–105. doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.08.006
- [24] Gong, X., Huang, D., Liu, Y., Peng, Z., Zeng, G., Xu, P., Cheng, M., Wang, R., Wan, J., 2018. Remediation of contaminated soils by biotechnology with nanomaterials: bio-behavior, applications, and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology* 38, 455–468. doi.org/10.1080/07388551.2017.1368446
- [25] Yu, B., Jin, X., Kuang, Y., Megharaj, M., Naidu, R., Chen, Z., 2015. An integrated biodegradation and nano-oxidation used for the remediation of naphthalene from aqueous solution. *Chemosphere* 141, 205–211. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.050
- [26] Szczyrba E., Gaśczak A., Szczotka A., Kolarczyk H., Janus B., 2020. Wpływ niklu na wzrost szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 w obecności fenolu. *Prace Naukowe ICh PAN*, 24, 95-106
- [27] Keller, A.A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H.S., Cherr, G., Cardinale, B.J., Miller, R., Ji, Z., 2010. Stability and Aggregation of Metal Oxide Nanoparticles in Natural Aqueous Matrices. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1962–1967. doi.org/10.1021/es902987d
- [28] Asadi, A., Pourfattah, F., Miklós Szilágyi, I., Afrand, M., Żyła, G., Seon Ahn, H., Wongwises, S., Minh Nguyen, H., Arabkoohsar, A., Mahian, O., 2019. Effect of sonication characteristics on stability, thermophysical properties, and heat transfer of nanofluids: A comprehensive review. *Ultrasonics Sonochemistry* 58, 104701. doi.org/10.1016/j.ulsonch.2019.104701
- [29] Jiang, J., Oberdörster, G., Biswas, P., 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanopart Res* 11, 77–89. doi.org/10.1007/s11051-008-9446-4
- [30] Nguyen, V.S., Rouxel, D., Hadji, R., Vincent, B., Fort, Y., 2011. Effect of ultrasonication and dispersion stability on the cluster size of alumina nanoscale particles in aqueous solutions. *Ultrasonics Sonochemistry* 18, 382–388. doi.org/10.1016/j.ulsonch.2010.07.003
- [31] Yi, S., Babadagli, T., Li, H., 2020. Stabilization of nickel nanoparticle suspensions with the aid of polymer and surfactant: static bottle tests and dynamic micromodel flow tests. *Pet. Sci.* 17, 1014–1024. doi.org/10.1007/s12182-020-00433-1
- [32] Yıldız, G., Ağbulut, Ü., Gürel, A.E., 2021. A review of stability, thermophysical properties and impact of using nanofluids on the performance of refrigeration systems. *International Journal of Refrigeration* 129, 342–364. doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2021.05.016
- [33] Bihari, P., Vippola, M., Schultes, S., Praetner, M., Khandoga, A.G., Reichel, C.A., Coester, C., Tuomi, T., Rehberg, M., Krombach, F., 2008. Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Part Fibre Toxicol* 5, 14. doi.org/10.1186/1743-8977-5-14

- [34] Zdarta, A., Smulek, W., Pacholak, A., Dudzińska-Bajorek, B., Kaczorek, E., 2020. Surfactant addition in diesel oil degradation – how can it help the microbes? *J Environ Health Sci Engineer* 18, 677–686. doi.org/10.1007/s40201-020-00494-9
- [35] Mohanty, S., Jasmine, J., Mukherji, S., 2013. Practical Considerations and Challenges Involved in Surfactant Enhanced Bioremediation of Oil. *BioMed Research International Article ID 328608*. doi.org/10.1155/2013/328608

AGNIESZKA GAŚCZAK , ELŻBIETA SZCZYRBA, ANNA SZCZOTKA, HANNA KOLARCZYK, BOŻENA JANUS

WHAT ARE THE EFFECT OF NICKEL OXIDE NANOPARTICLES ON THE STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA KB2 GROWTH IN THE PRESENCE OF PHENOL?

Nanoparticles have existed in the environment for hundreds of years as anthropogenic materials (designed or released as unintended by-products), but also naturally. The interest in nanoparticles results from their specific optical, physical and chemical properties that are significantly different from bulk materials. The benefits of nanotechnology are widely publicized, however despite conducting experimental research on the risk posed by nanomaterials, it has not been clearly explained to what extent nanoparticles affect living organisms. So far, it has been established that the exposure of organisms to nanoparticles may result in the formation of reactive oxygen species much more than are naturally produced in biological systems. In addition they are absorbed through the cell membrane, followed by direct interaction with the functional groups of proteins and nucleic acids, damaging enzyme activity, changing the cell structure, affecting the normal physiological processes, and ultimately inhibiting the microorganism. The biological activity, mechanism and kinetics of nanoparticles penetration into the cell and their impact on individual organelles depend on several morphological parameters: size and tendency to agglomeration, shape, chemical composition and structure of the surface.

An important and difficult stage of the research was the preparation of nickel oxide nanoparticles base suspension, especially maintain the fragmentation of the particles and the homogeneity of the dispersion. Due to the particle size distribution, the most advantageous way to prepare the base suspension is to introduce sodium citrate into the mineral salt solution before 20 minutes of sonication. Surfactants introduced with the suspension of nanoparticles may affect the course of the phenol biodegradation process so it was necessary to conduct some additional tests. In the first series of experiments, surfactants were the only organic compounds available to bacteria, and in the second series, the cultures were also supplemented with phenol. The surfactants used in the research not only stabilized the base suspension of nanoparticles, but also had a measurable effect on the number of bacteria and the course of phenol biodegradation. The increases in biomass in suspensions with different concentrations of surfactants were illustrated by the graphs of the relationship $X/X_0 = f(t)$. CTAB turned out to be a strong growth inhibitor of the *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 strain, on the other hand, sodium citrate was used by the tested bacterial strain as a source of carbon and energy, which resulted in a biomass growth proportional to the concentration of the substrate.

The effect of the presence of nickel oxide nanoparticles was investigated in cultures without surfactant and in cultures with a small addition of sodium citrate, SDS or P 123. Due to the inhibited phenol

decomposition and the previously described inhibition of cell growth with the CTAB surfactant, this surface-active compound was abandoned. The introduction of nickel oxide nanoparticles into the culture did not inhibit the phenol biodegradation process, and the reaction of the bacterial population depended on the method of preparing the nanoparticle suspension.

Received: 30.11.2021

Accepted: 23.12.2021