

Grażyna Płaza, Ewa Kowalska, Joanna Radomska, Elżbieta Czerwosz, Kamlesh Jangid, Katarzyna Gawior, Krzysztof Ulfig, Katarzyna Janda-Ulfig

Wpływ wielościennych nanorurek węglowych na wzrost bakterii z rodzaju *Bacillus* i produkcję biosurfaktantów

Nanomateriały, złożone z cząstek o wielkości mniejszej niż 100 nm i wyjątkowych właściwościach fizyczno-chemicznych (mała gęstość, duża powierzchnia właściwa, duża giętkość, wyjątkowa elastyczność i sprężystość, silna i długotrwała emisja polowa), zyskują obecnie coraz większe znaczenie. 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 r. wartość ta wyniosła ponad 1 mld dol.). Niezwykle interesującymi materiałami są nanomateriały węglowe, do których zalicza się fulereny, nanorurki, nanowłókna, nanopianki, czy cebulki.

Rozwój nanotechnologii – mimo związanych z nią nadziei jako źródła tańszych i lepszych materiałów – nie jest jednak 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 [1,2], natomiast rola biosurfaktantów i/lub mikroorganizmów produkujących biosurfaktanty w tym procesie jest nieznaną.

Celem badań omówionych w niniejszej pracy była ocena wzrostu bakterii z rodzaju *Bacillus* w obecności wielościennych nanorurek węglowych i ich zdolności do produkcji biosurfaktantów.

Dr hab. G. Płaza, mgr K. Gawior: Instytut Ekologii Terenów Przemysłowych, ul. L. Kossutha 6, 40–844 Katowice, pla@ietu.katowice.pl

Dr E. Kowalska, inż. J. Radomska, dr hab. E. Czerwosz: Instytut Tele- i Radiotechniczny, ul. Ratuszowa 11, 03–450 Warszawa
ewa.kowalska@itr.org.pl

Dr K. Jangid: University of Georgia, Department of Microbiology, Athens, GA 30602, USA, jangidk@uga.edu

Dr hab. K. Ulfig: Politechnika Szczecińska, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Instytut Polimerów, Zakład Biomateriałów i Technologii Mikrobiologicznych, ul. K. Pułaskiego 10, 70–322 Szczecin
k_ulfig@ps.pl

Dr inż. K. Janda-Ulfig: Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska, ul. J. Słowackiego 17, 71–434 Szczecin
kjanda@agro.ar.szczecin.pl

Materiały i metody

Izolacja i identyfikacja bakterii produkujących biosurfaktanty

Szcepki bakteryjne wykorzystane w badaniach wyizolowano z gruntów zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi z terenu rafinerii w Czechowicach-Dziedzicach [3] oraz oceniono ich zdolność do produkcji biosurfaktantów i rozkładu węglodorów alifatycznych i aromatycznych [4]. Wyizolowane szcepki bakterii przechowywano na skosach agarowych (SMA, bioMerieux) w temperaturze 4 °C.

Ekstrakcję DNA bakterii wykonano wg metody opisanej w pracy [5]. Czystość wyizolowanego DNA sprawdzono na 1% żelu agarozowym. Następnie oczyszczony DNA wykorzystano w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR – polymerase chain reaction) [6]. Do tego celu zastosowano zestaw do namnażania firmy Amersham Biosciences (puReTaq™ Ready-To-Go™). Przeprowadzono 30 cykli namnażania fragmentu 16S rDNA w następujących warunkach: denaturacja w temp. 94 °C przez 5 min, reasocjacja w temp. 72 °C przez 2 min, elongacja w temp. 61 °C przez 1 min. Reakcje przeprowadzono w aparacie Mastercycler® 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.

Synteza wielościennych nanorurek węglowych

Nanorurki wielościenne zsyntezowano metodą termiczną (CVD – chemical vapor deposition) opisaną w pracy [7]. Jako źródło węgla użyto ksylen (C_8H_{10}), zaś jako prekursor katalizatora zastosowano ferrocen ($Fe(C_5H_5)_2$). Proces CVD prowadzono w poziomym rurowym reaktorze kwarcowym, umieszczonym w piecu elektrycznym o dwóch strefach grzania, stosując 10% roztwór ferrocenu w ksylenie

i argon jako gaz nośny. Roztwór był wstrzykiwany do reaktora kwarcowego z szybkością 0,1 cm³/min. W pierwszej strefie pieca (200 °C) roztwór odparowywał, następnie jego pary były przenoszone przez argon do drugiej strefy (680 °C), w której dochodziło do rozkładu par roztworu. W wyniku rozkładu na ściankach reaktora osadzał się produkt węglowy.

Wzrost bakterii z rodzaju *Bacillus* na podłożach stałym i płynnym w obecności nanorurek węglowych

Bakterie z rodzaju *Bacillus* hodowano na podłożach stałym i płynnym [8] wraz z nanorurkami węglowymi w zakresie dawek od 0,001 g do 0,01 g. Hodowle bakterii inkubowano w temperaturze 45 °C. W przypadku hodowli stałych odczyty wzrostu bakterii robiono po 24 h i 48 h. W przypadku hodowli płynnych pobrano po 1 cm³ hodowli w czasie od 0 do 144 h, a następnie metodą płytek lanych obliczono liczbę wyrosłych kolonii bakterii (jtk/cm³) i wyznaczono krzywe wzrostu, które porównano z hodowlą kontrolną (bez nanorurek węglowych).

Właściwości biosurfaktantów produkowanych przez bakterie z rodzaju *Bacillus* w obecności nanorurek węglowych

Hodowle płynne poszczególnych szczepów *Bacillus* inkubowano w 45 °C przez 7 d, a następnie odwirowano w czasie 10 min przy prędkości obrotowej 10000/min. Otrzymany płyn nadosadowy 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 °C, przy odchyleniu 0,09 mN/m. Zdolność emulgowania badano wg metody opisanej w pracach [9,10]. Do 5 cm³ cieczy nadosadowej dodano 2 cm³ różnych substancji hydrofobowych. Po 24 h oceniono wysokość warstwy emulgującej i obliczono wskaźnik emulgacji EI24 wg [9]. Jeżeli wskaźnik EI24 był większy niż 40%, to oceniono emulsję jako stabilną. Współczynnik pienienia (FV – foam volume) oceniono wg metody opisanej w pracy [11]. Do cylindra szklanego wiano 25 cm³ cieczy nadosadowej, przez którą następnie przepuszczano strumień powietrza (50 cm³/min) przez 5 min. Współczynnik pienienia obliczono na podstawie różnicy pomiędzy objętością warstwy pieniającej a pozostałością cieczy nadosadowej.

Wyniki badań

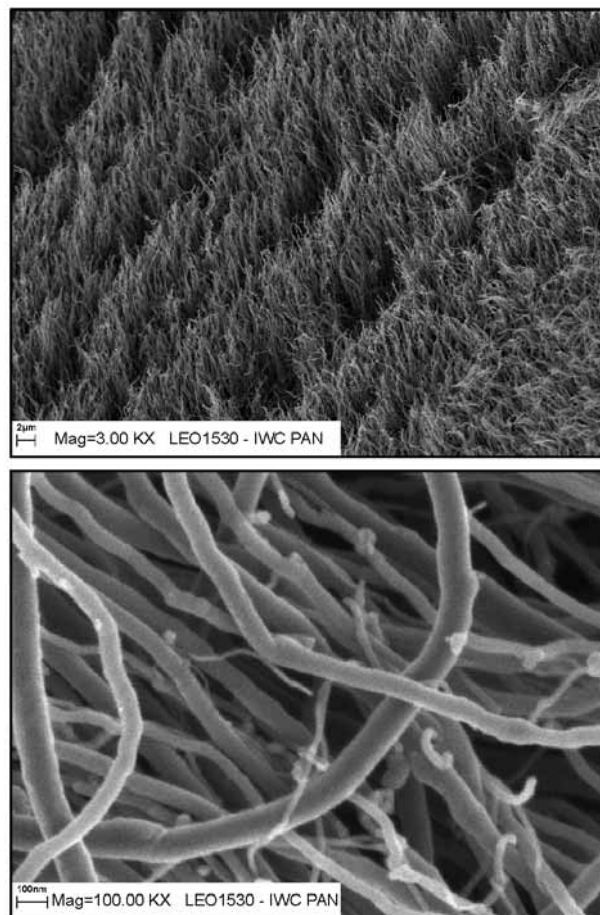
W badaniach wykorzystano trzy szczepy bakterii zidentyfikowane jako *Bacillus subtilis* (T⁻-1a), *Bacillus* sp. (T-1) oraz *Bacillus* sp. (T⁻-1). Analiza sekwencyjna genu 16S rRNA wykazała, że w przypadku dwóch szczepów, tj. T-1 i T⁻-1 trudno było jednoznacznie określić przynależność taksonomiczną do gatunku. Zarówno szczep oznaczony jako T-1, jak i T⁻-1 wykazały >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* należały do grupy halofilnych i termotolerancyjnych

bakterii o kształcie pałeczek, czasami tworzących formy łańcuszkowe. Rosły w temperaturach od 37 °C do 70 °C, przy czym optimum ich wzrostu wynosiło 45 °C oraz tolerowały różne stężenia NaCl (2÷12%).

Wielościennie nanorurki węglowe otrzymane metodą CVD miały długość około kilku mikrometrów i zewnętrzne średnice w zakresie 20÷80 nm (rys. 1). W badaniach wykorzystano nanorurki, które nie były wstępnie oczyszczone i zawierały cząstki katalizatora.

Na rysunku 2 przedstawiono krzywe wzrostu bakterii wyznaczone przy różnych dawkach nanorurek węglowych, przy czym różnice między tymi krzywymi nie były statystycznie istotne. Zastosowane dawki nanorurek nie wpłynęły na szybkość wzrostu bakterii, nie spowodowały również zmian morfologicznych, natomiast stymulowały powstawanie przetrwalników. W hodowlach z nanorurkami udział komórek bakteryjnych tworzących endospory mieścił się w zakresie 93÷97%, podczas gdy w hodowlach kontrolnych (bez nanorurek) udział ten wynosił 28%.

Biosurfaktanty syntetyzowane przez bakterie powodowały dyspersję nanorurek węglowych oraz miały właściwości powierzchniowe, porównywalne z hodowlą kontrolną (bez nanorurek węglowych), tj. zmniejszały napięcie powierzchniowe (tab. 1), charakteryzowały się silnymi zdolnościami emulgującymi w stosunku do zastosowanych substancji/mieszanin hydrofobowych (tab. 2) oraz zdolnością do pienienia.



Rys. 1. Obraz mikroskopowy (SEM) zsyntezowanych wielościennych nanorurek węglowych
Fig 1. SEM micrograph of the synthesized multiwalled carbon nanotubes

Tabela 1. Napięcie powierzchniowe szczepów *Bacillus* hodowanych w obecności i bez wielościennych nanorurek węglowychTable 1. Surface tension of the *Bacillus* strains cultured with and without carbon nanotubes

Szczep <i>Bacillus</i>	Napięcie powierzchniowe, Nm/m	
	hodowla z nanorurkami	hodowla kontrolna
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 ± 0,4 mN/m, pożywka – 68 ± 0,08 ÷ 2,31 mN/m

Tabela 2. Zdolność emulgująca biosurfaktantów produkowanych przez szczepy *Bacillus* w obecności wielościennych nanorurek węglowychTable 2. Emulsifying properties of the biosurfactants produced by the *Bacillus* strains in the presence of carbon nanotubes

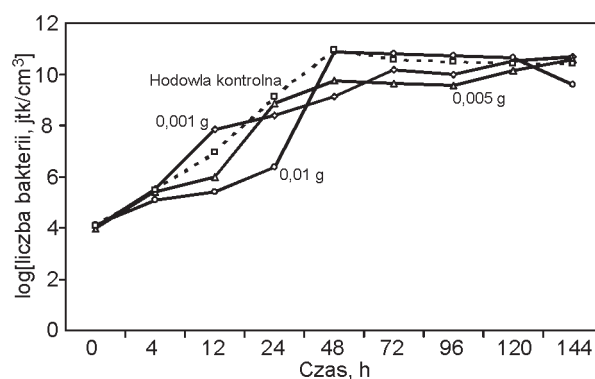
Substancja/ Mieszanka hydrofobowa	Wskaźnik emulgacji (EI24), %					
	T-1/N	T-1/K	T'-1/N	T'-1/K	I'-1a/N	I'-1a/K
Heksadekan	76	9	2	2	4	11
Olej mineralny	100	100	100	100	100	100
Izooktan	13	12	5	2	16	28
Toluen	72	69	70	69	93	94
Ksylen	74	72	71	72	89	90
Squalen	100	94	21	16	18	16
Olej napędowy	71	67	71	70	70	72
Benzyna	72	71	71	69	71	69
Frakcja destylacji ropy naftowej A3	42	29	35	27	28	28
Frakcja destylacji ropy naftowej A5	100	100	24	29	30	37
Frakcja destylacji ropy naftowej P1	100	100	100	100	100	100
Frakcja destylacji ropy naftowej P2	100	100	31	30	100	100
Zużyty olej (ze smażenia frytek)	100	100	100	100	100	100

N – hodowla w obecności nanorurek węglowych

K – hodowla kontrolna (bez nanorurek węglowych), odch. stand. 0,5 ÷ 5%

Podsumowanie

Ocena wzrostu trzech szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus* i produkcji przez nie biosurfaktantów wykazała, że nanorurki węglowe nie spowodowały zahamowania wzrostu bakterii oraz zmian morfologicznych, natomiast stymulowały produkcję endospor. Produkowane przez badane szczepy biosurfaktanty spowodowały dyspersję nanorurek



Rys. 2. Wzrost szczepów *Bacillus* w pożywce płynnej z różnymi dawkami wielościennych nanorurek węglowych
Fig. 2. Growth of the *Bacillus* strains in the liquid culture medium, at varying doses of carbon nanotubes

węglowych w roztworach wodnych, zmniejszyły napięcie powierzchniowe oraz charakteryzowały się silnymi zdolnościami emulgowania wybranych substancji/mieszanin hydrofobowych. Z praktycznego punktu widzenia istotne było wykazanie w pracy, że zarówno biosurfaktanty, jak i mikroorganizmy produkujące biosurfaktanty powodowały dyspersję wielościennych nanorurek węglowych.

LITERATURA

- C.G. SALZMANN, B.T.T. CHU, G. TOBIAS, S.A. LLEWELLYN, M.L.H. GREEN: Quantitative assessment of carbon nanotube dispersions by Raman spectroscopy. *Carbon* 2007, 45, pp. 907–912.
- L. VAISMAN, H.D. WAGNER, G. MAROM: The role of surfactants in dispersion of carbon nanotubes. *Ad. Coll. Interface Science* 2006, 128–130, pp. 37–46.
- C.J. BERRY, S. STORY, D.J. ALTMAN, R. UPCHURCH, W. WHITMAN, D. SINGLETON, G. PŁAZA, R.L. BRIGMON: Biological treatment of petroleum in radiologically contaminated soil. In: *Remediation of Hazardous Waste in the Subsurface*. Bridging Flask and Field [Eds. C.J. CLARK II, A.S. LINDNER], American Chemical Society, Washington DC 2006, pp. 87–93.
- G. PŁAZA, I. ZJAWIONY, I.M. BANAT: Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *J. Petrol. Sc. Eng.* 2006, 50, pp. 71–77.
- M.A. FURLONG, D.R. SINGLETON, D.C. COLEMAN, W.B. WHITMAN: 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.* 2002, 68, 1265–1274.
- R.J. STEFAN, R.M. ATLAS: Polymerase chain reaction: Applications in environmental microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 1991, 45, pp. 137–152.
- E. KOWALSKA, J. RADOMSKA, P. BYSZEWSKI, P. KOWALCZYK, K. ANTONOVA, R. DIDUSZKO, H. LANGE, P. DŁUŻEWSKI: Morphology and electronic properties of carbon nanotubes grown with Fe catalyst. *J. Mater. Res.* 2003, 18, pp. 2451–2458.
- A.S. ABU-RUWAIDA, I.M. BANAT, S. HADITIRTO, A. SALEM, M. KADRI: Isolation of biosurfactant-producing bacteria. Product characterization and evaluation. *Acta Biotechnol.* 1991, 11, pp. 315–324.
- M.P. BOSCH, M. ROBERT, M.E. MERCADE, M.J. ESPUNY, J.L. PARRA, J. GUINEA: Surface-active compounds on microbial cultures. *Tenside Surf. Deterg.* 1988, 25, pp. 208–212.
- P.A. WILLLUMSEN, U. KARLSON: Screening of bacteria isolated from PAH-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation* 1997, 7, pp. 415–423.
- M. DAS, S.K. DAS, R.K. MUKHERJEE: Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on n-alkanes and sugars. *Biores. Technol.* 1998, 63, pp. 231–235.

Plaza, G., Kowalska, E., Radomska, J., Czerwosz, E., Jangid, K., Gawior, K., Ulfig, K., Janda-Ulfig, K. Effect of Multiwalled Carbon Nanotubes on the Growth of Bacteria of the Genus *Bacillus* and on the Production of Biosurfactants. *Ochrona Srodowiska* 2009, Vol. 31, No. 1, pp. 21–24.

Abstract: Three bacterial strains of the genus *Bacillus* were tested in order to ascertain how the presence of nanotubes in the culture medium influenced their growth, as well as their ability to produce biosurfactants. It was found that the bacteria grew very well in the presence of the nanotubes, and that they were capable of producing biosurfactants. The biosurfactants synthesized by the bacteria accounted for the dispersion of the carbon nanotubes in liquid cultures. Although the multiwalled carbon nanotubes

did not affect the morphology or the growth of the bacteria, they were found to stimulate endospore production. The objective of the study was also to assess the properties of the biosurfactants produced by the bacteria growing in the presence of the carbon nanotubes, *i.e.* surface tension, emulsification and foamability. The nanotubes examined were found to exert no influence on the surface activity of the biosurfactants produced by the bacteria. The biosurfactants reduced surface tension, showed emulsifying properties towards some hydrophobic substances/mixtures, and displayed foamabilities comparable to those of the control.

Keywords: Nanotechnology, carbon nanotubes, biosurfactant.