

Biosintesi e attività di nanoparticelle prodotte da microrganismi estremofili

Ida Romano^{1*}, Luigi Leone¹, Andrea Cattaneo¹, Antonia D'Amodio¹, Giovanni Pezzella¹, Annarita Poli¹, Paola Di Donato^{1,2}, Ilaria Finore¹

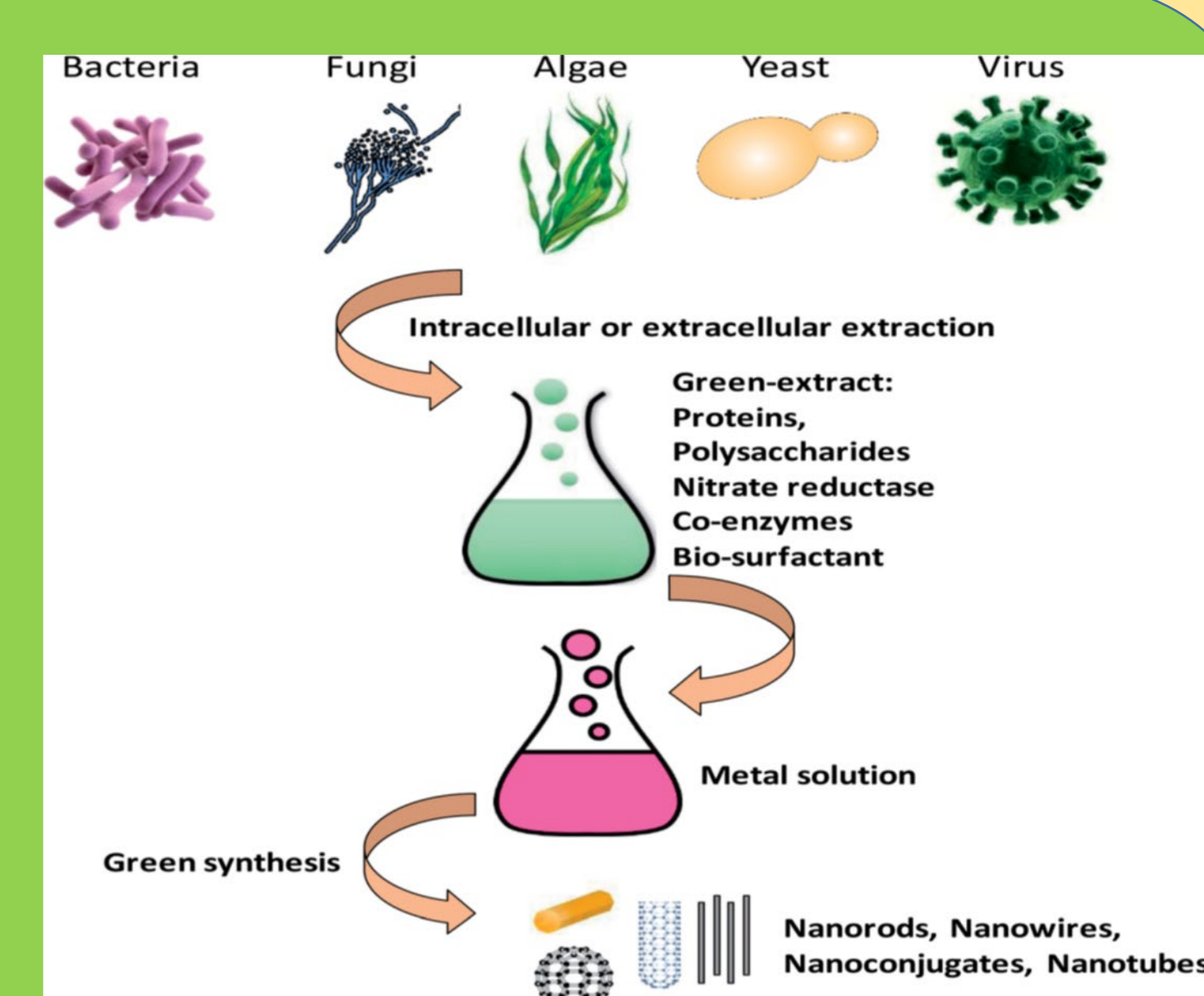


1 Istituto di Chimica Biomolecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Campi Flegrei, 34, Pozzuoli (NA), 80078, Italia
2 Dipartimento di Scienze e Tecnologie, Università "Parthenope", Centro Direzionale -Isola C4, Napoli 80143, Italia
E-mail : iromano@icb.cnr.it



INTRODUZIONE

La sintesi di nanoparticelle mediata da organismi viventi (sintesi biogenica) è una tecnica emergente nel campo delle nanotecnologie in quanto rappresenta un metodo a basso impatto ambientale per la produzione di nanomateriali. I microrganismi estremofili (microrganismi che vivono in ambienti caratterizzati da almeno un parametro di stress chimico-fisico) possono produrre nanostrutture attraverso diversi meccanismi biologici. In questa linea, sono stati testati alcuni microrganismi estremofili, disponibili presso la collezione ICB (<https://www.icb.cnr.it/institute-facilities/bioprocessi/https://susmirri-catalog.di.unito.it/collections>) per produzione biogenica di nanoparticelle metalliche di Ag (AgNPs) e Se (SeNPs) e particelle di natura polisaccaridica. Le AgNPs e le SeNPs possiedono un'ampia gamma di proprietà biologiche quali antitumorali, antimicrobiche, antibiotiche e disinfettanti e trovano pertanto applicazione nei campi della diagnostica, nella costruzione di biosensori, ecc. Gli esopolisaccaridi (EPS) microbici sono una classe di biomolecole di grande interesse scientifico, grazie alla loro notevole diversità chimica, da cui scaturisce un'interessante versatilità applicativa. Inoltre, essi possono strutturarsi in nanoparticelle accrescendo il loro potenziale utilizzo come agenti incapsulanti e nel delivery di sostanze di interesse.



Microrganismi: La biosintesi di AgNPs è stata condotta utilizzando il surnatante proveniente da una crescita di 24h del batterio termofilo *Thermus thermophilus* ceppo SAMU, trattato con 0,5 mM di AgNO₃ alla temperatura di 80°C. Al contrario per la sintesi intracellulare di SeNPs, il batterio aloalcalofilo *Halomonas campaniensis* ceppo 5AG, è stato coltivato in presenza di Na₂SeO₃. Le SeNPs sono state estratte dopo rottura cellulare. Le NPs polisaccaridiche sono state ottenute dal levano prodotto dal batterio artico *Pseudomonas* ceppo 2ASCA cresciuto a 15°C in brodo di coltura arricchito con saccarosio 6% (p/v).

Caratterizzazione delle nanoparticelle: Le nanoparticelle di Ag e Se sono state caratterizzate mediante spettroscopia UV-Vis, dynamic light scattering (DLS), microscopia elettronica a trasmissione (TEM), spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) e potenziale Zeta. Le nanoparticelle polisaccaridiche sono state analizzate mediante DLS e microscopia elettronica a scansione e la spettroscopia a raggi X a dispersione energetica (SEM-EDS).

Attività antibatterica delle nanoparticelle: L'attività antibatterica delle NPs metalliche è stata misurata contro *Escherichia coli* Gram-negativo DSM 648 e *Kokuria rhizophila* Gram-positiva DSM 348 mediante il metodo della diffusione, misurando la zona di inibizione.

Attività chelante delle nanoparticelle polisaccaridiche: La capacità di chelare metalli pesanti da parte dell'esopolimero prodotto dal ceppo 2ASCA è stata valutata, sia in soluzione di acqua distillata (pH 5,6) che in soluzioni di acido acetico (1%, v/v), testando alla concentrazione finale di 990 ppm i seguenti metalli: Cu (II), Zn (II), Pb (II), Fe (III), Cr (III), Cd (II) e, per esperimenti di competizione di legami dei metalli, Fe (III) e Cr(III), contemporaneamente. Il polimero è stato osservato dopo un'esposizione di 24 ore al metallo seguito da un ulteriore lavaggio in acqua, sempre di 24 ore.

METODI

Biosintesi di AgNPs ceppo termofilo Samu

Il cambiamento di colore della miscela di reazione da marrone chiaro a marrone scuro, attribuito alla riduzione del nitrato d'argento, è indicativo della produzione di NPs.

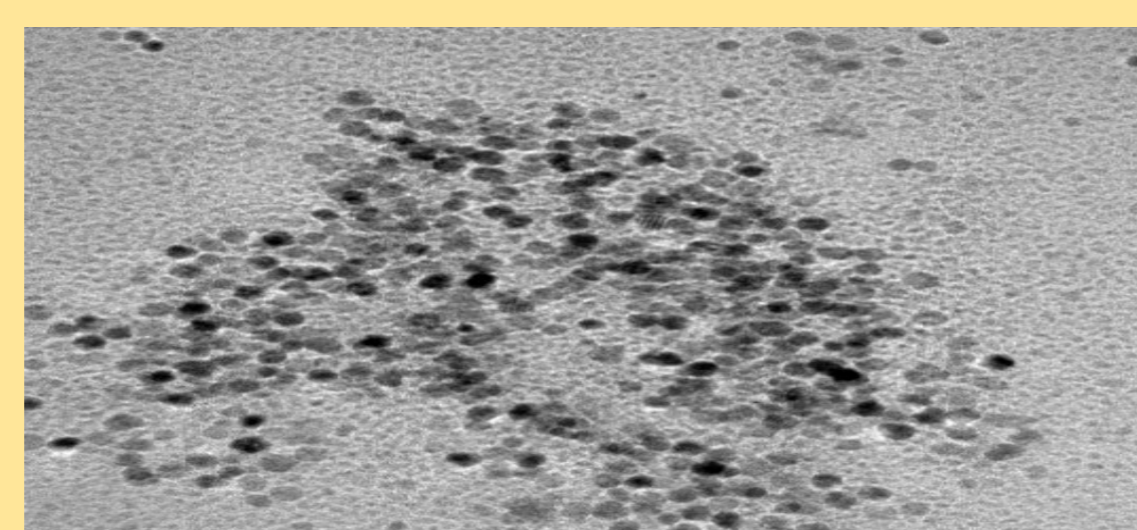
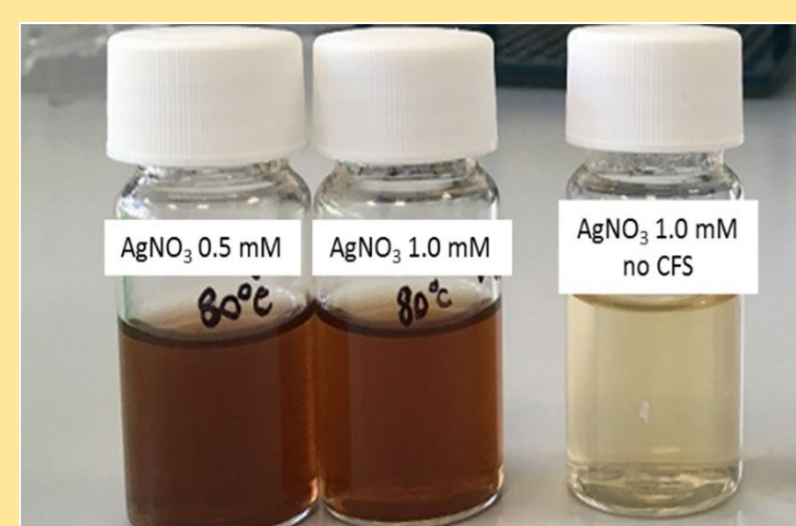
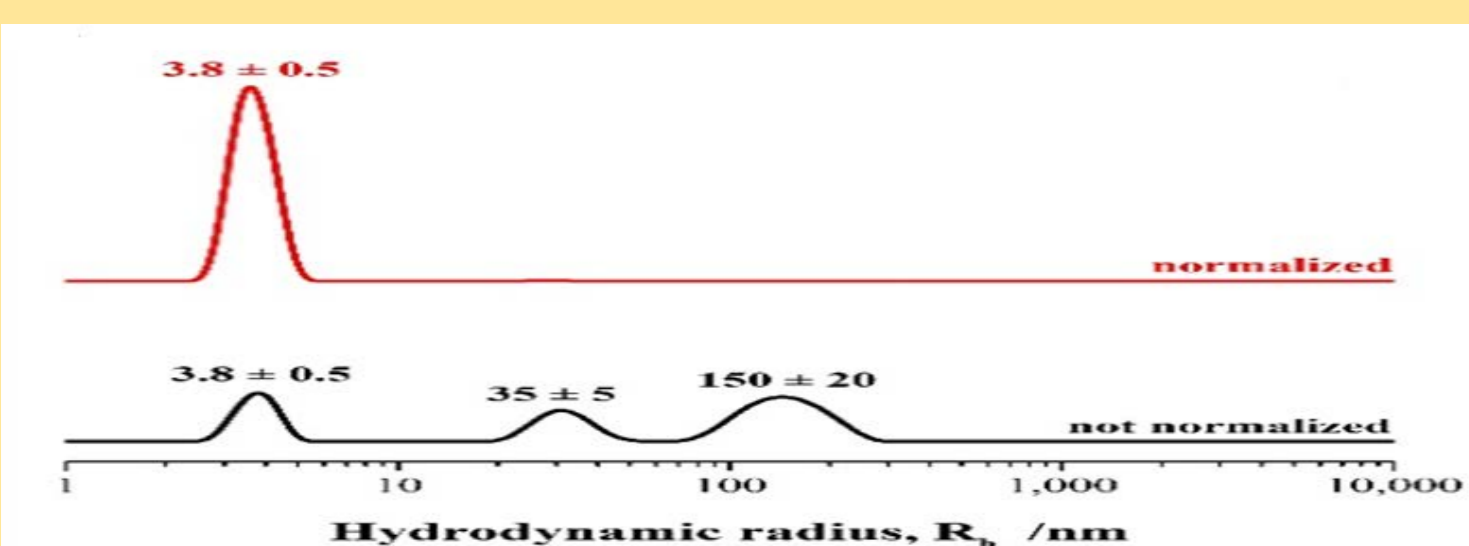


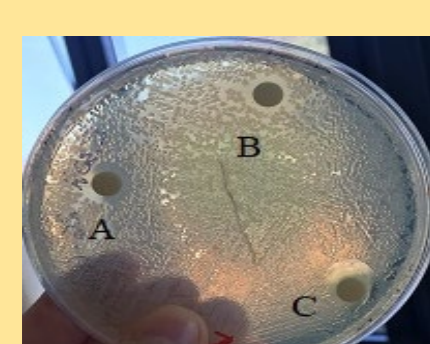
Immagine TEM di AgNPs prodotte dal ceppo Samu (scala: 50 nm)

Analisi DLS, distribuzioni del raggio idrodinamico delle AgNPs



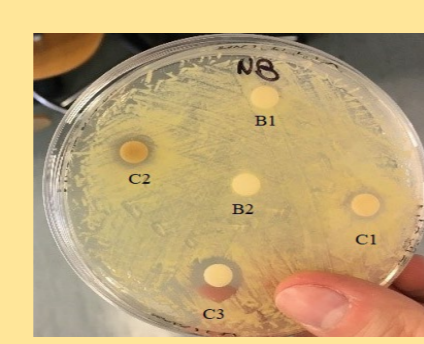
L'analisi DLS ha evidenziato la presenza di due tipi principali di NP sferiche: quelle nude (3,8 nm) e altre due popolazioni centrate rispettivamente a circa 35 e 150 nm, probabilmente riconducibili alla presenza di cluster di NP di dimensioni maggiori.

Attività antibatterica delle AgNPs contro *E. coli* e *K. rhizophila*

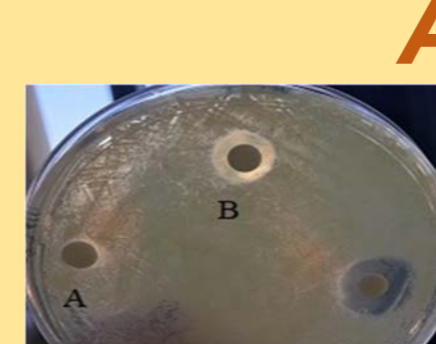


E. coli

Aloni di inibizione di *E. coli* e *K. rhizophila* in presenza di soluzioni contenenti 0.04 mg 0.08 mg e 0.16 mg di soluzione di AgNPs.



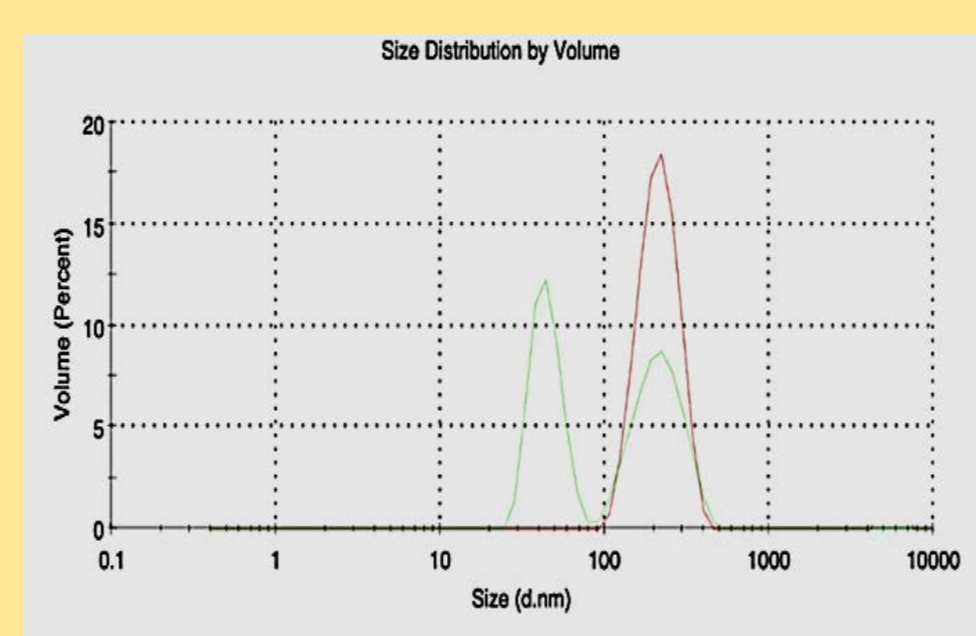
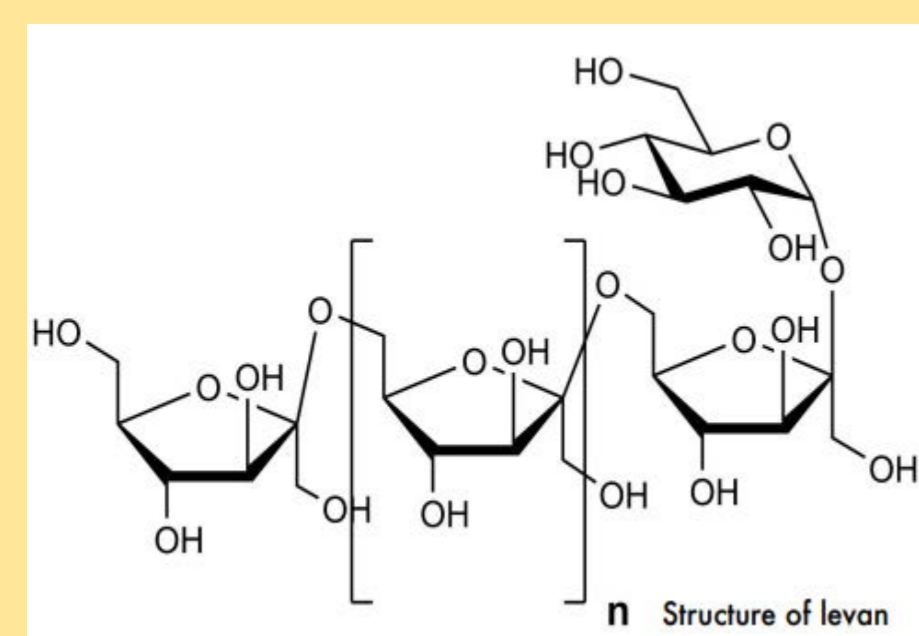
K. rhizophila



K. rhizophila

Biosintesi di nanoparticelle polisaccaridiche

Pseudomonas strain 2ASCA, microrganismo psicrofilo isolato dalla regione artica, produce levano (un omopolimero del fruttosio) 1.17 g/L in presenza di saccarosio (1%, p/v). Tale polimero risulta debolmente legato alle cellule e richiede un lavaggio in tampone per il suo recupero.



DLS del levano sospeso in acqua distillata (rosso) e in acqua acidificata (verde)

Conclusioni

La sintesi biogenica di nanoparticelle è una strategia a basso impatto ambientale per la produzione di nanomateriali utili dal punto di vista biotecnologico. A questo proposito, gli estremofili rappresentano un valido strumento per ottenere NP con proprietà antibatteriche (AgNPs e SeNPs) che possono essere anche prodotte a basso costo utilizzando mezzi di crescita economici (come quelli a base di rifiuti alimentari), in accordo con i principi di economia circolare e sostenibilità. Inoltre, il levano prodotto dal batterio 2ASCA presenta una forte affinità per il Cr(III), mai segnalata in precedenza per tale polimero, evidenziando un interessante potenziale uso nei processi di biorisanamento ambientale.

Referenze

Romano I. et al. 2022. Extremophilic Microorganisms for the Green Synthesis of Antibacterial Nanoparticles. *Microorganism* 2022,10,1885 <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101885>
Finore, I. et al. 2024 Sustainable production of heavy metal-binding levans by a subarctic permafrost thaw lake *Pseudomonas* strain 2ASCA. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 268,1, (2024), <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131664>.

Ringraziamenti

Questo progetto è finanziato parzialmente dai seguenti progetti: Progetto CNR FOE-2021 NutrAge—code DBA.AD005.225; PNRR European Commission – NextGenerationEU, Project "Strengthening the MIRRI Italian Research Infrastructure for Sustainable Bioscience and Bioeconomy, SUS MIRRI", code n. IR0000005"; Progetto PRIN 2022LPPFTY

RISULTATI

Biosintesi di SeNPs ceppo aloalcalofilo 5AG

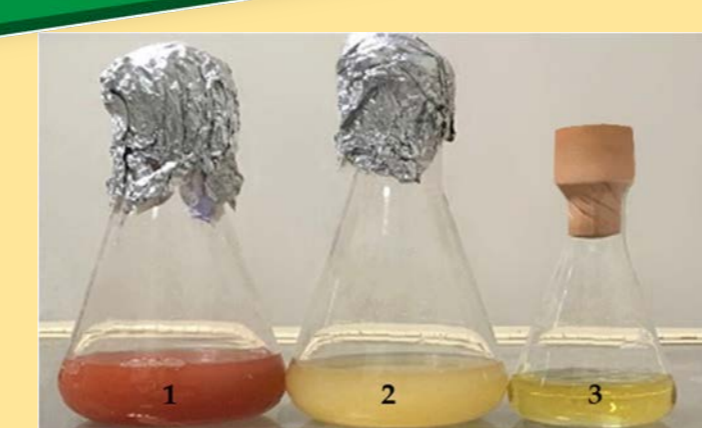
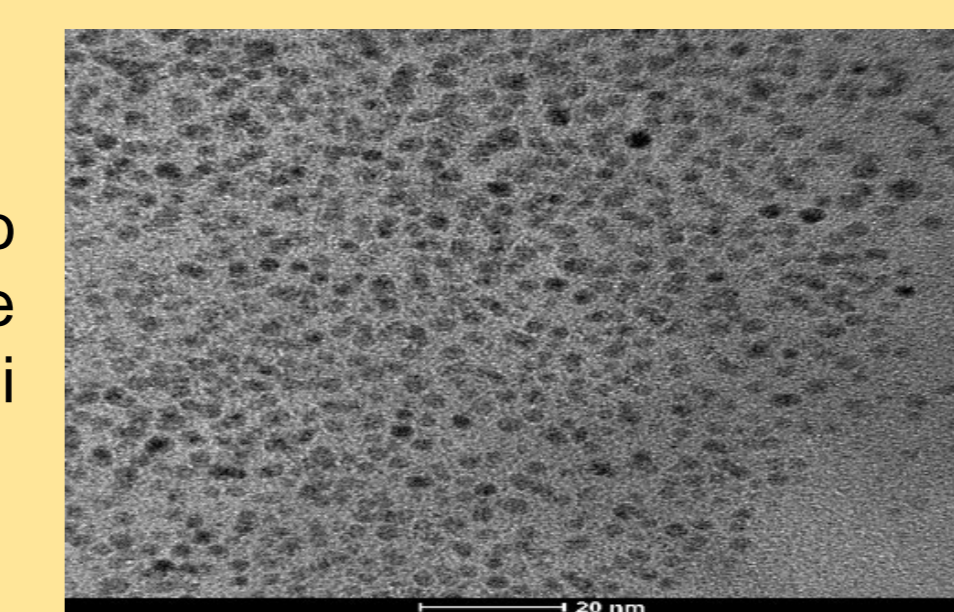
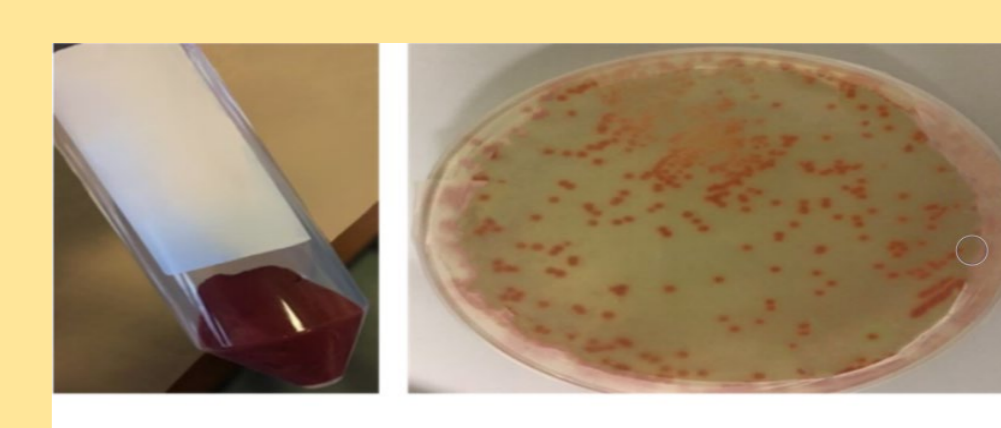


Immagine TEM delle SeNPs prodotte dal ceppo 5AG nel mezzo complesso (scala: 50 nm)

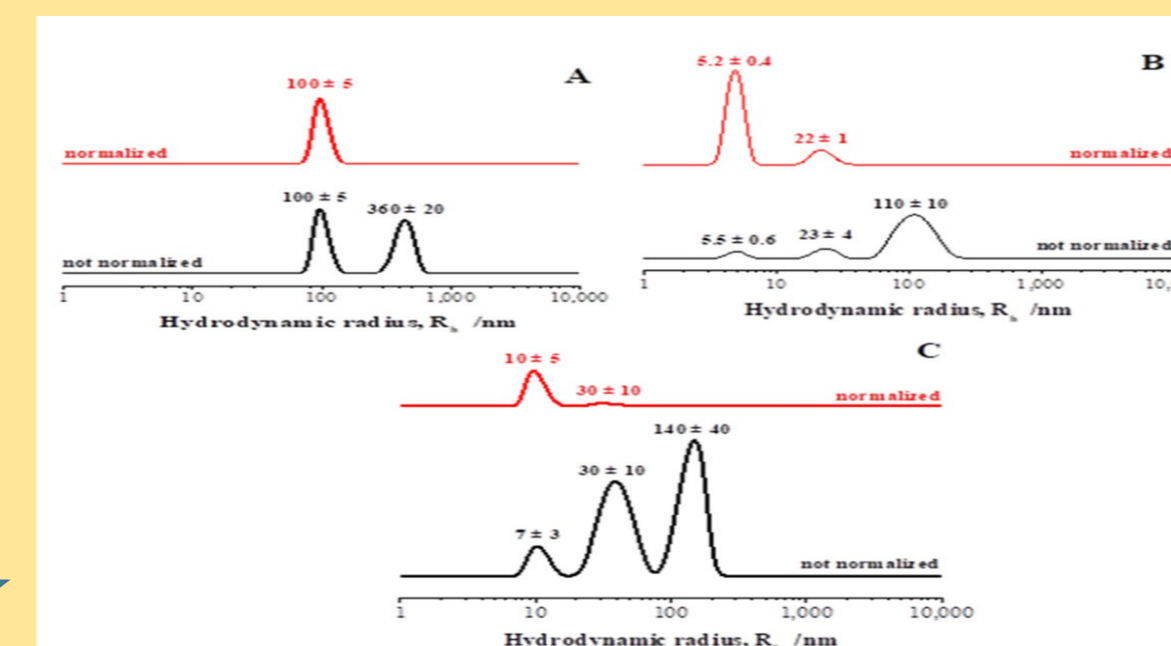


5AG coltivato nel terreno complesso in presenza e assenza di 200 ppm di Na₂SeO₃



Il colore rosso della coltura batterica evidenzia la riduzione intracellulare del selenio e la formazione delle nanoparticelle

Analisi DLS, distribuzioni del raggio idrodinamico delle SeNPs



L'analisi DLS ha mostrato che il tipo di terreno di coltura utilizzato per la biosintesi ha influenzato la dimensione delle SeNPs; infatti, mentre le nanoparticelle più grandi (100 nm) si sono formate nel terreno complesso (pannello A), popolazioni più piccole di NPs si sono formate rispettivamente nei terreni minimi di glucosio, pannello B (10 nm) e melassa, pannello C (30 nm).

Attività antibatterica delle SeNPs contro *K. rhizophila*

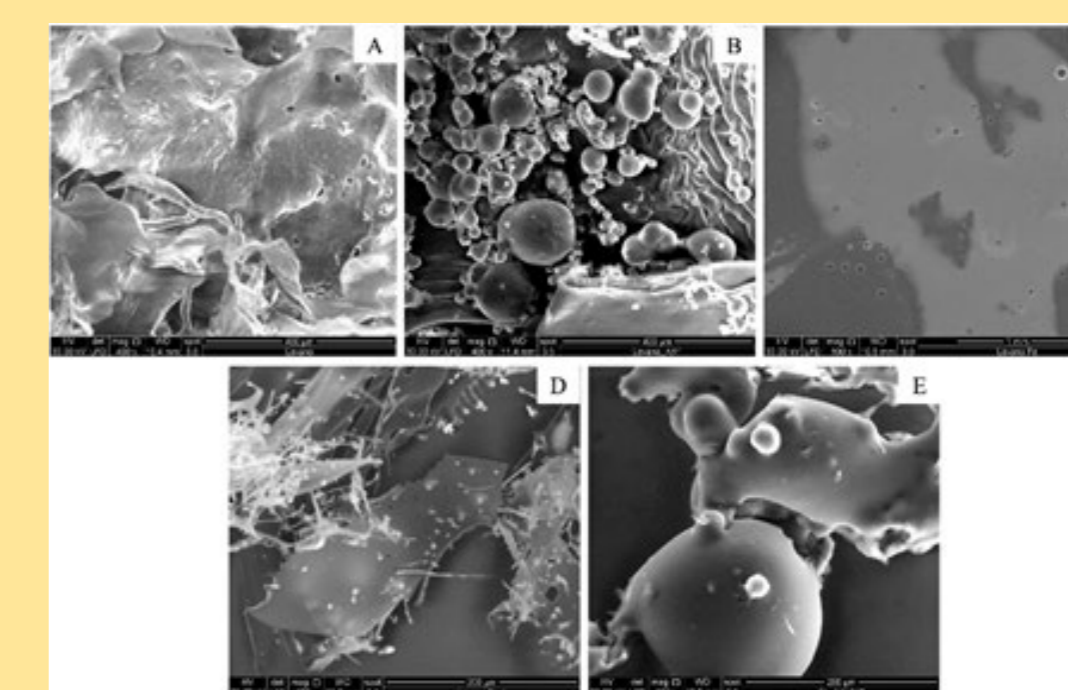
Aloni di inibizione di *K. Rhizophila* ottenuti in presenza di soluzione di SeNP da terreno complesso (A), da terreno di glucosio (B) e da terreno di melassa (C). Non è stata riscontrata invece alcuna attività antibatterica apprezzabile contro *E. coli*

Attività chelante delle nanoparticelle polisaccaridiche

Tutti i metalli testati risultavano adsorbiti sul levano dopo 24 ore di esposizione (linea A); tuttavia, solo Fe(III) e Cr(III) sono stati mantenuti dopo la fase di lavaggio (linea B). Negli esperimenti di competizione allestiti con la contemporanea presenza di Fe(III) e Cr(III), il Cr(III) ha mostrato un percentuale inferiore di adsorbimento rispetto al test precedente, ma una percentuale più alta di Cr(III) è stato trattenuto dopo il lavaggio.

Metallo	A peso % metallo	B peso % metallo
Fe(III)**	21.64 ± 1.97	10.76 ± 2.11
Cr(III)**	52.5 ± 2.34	31.0 ± 1.25
Pb(II)**	15.20 ± 6.73	1.66 ± 0.73
Cu(II)**	26.03 ± 1.83	0.21 ± 0.09
Zn(II)**	49.80 ± 14.68	0.85 ± 0.53
Cd(II)**	41.43 ± 3.16	-
Cr(III)/Fe(III)*	Fe(III) 4.3 ± 1.22 Cr(III) 29.7 ± 2.45	Fe(III) 4.25 ± 0.27 Cr(III) 21.4 ± 0.54
Cr(III)/Fe(III)**	Fe(III) 7.3 ± 2.24 Cr(III) 44.1 ± 1.43	Fe(III) 5.1 ± 0.32 Cr(III) 23.2 ± 1.15
Cr(III)**	30.4 ± 2.24	8.0 ± 0.24

*-Soluzione metallica in acqua distillata (pH 5.6);
**- soluzione metallica in acido acetico 1%(p/p) (pH 2.8)



Analisi SEM. Levano A :in acqua (400X). B: in acqua acidificata (400X). C: Fe/Levano in acqua (100X). D: Fe/Levano in acqua acidificata dopo il ciclo di lavaggio (800X). E: Fe/Levano in acqua acidificata dopo il ciclo di lavaggio (100X).