FORMAÇÃO MICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Caroline Galvão de Faria (BIC/Fundação Araucária/UEPG), Juliana Inaba, Adriano Gonçalves Viana (Orientador), e-mail: adrianogviana@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química.

Bioquímica, Bioquímica dos Micro-organismos.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*, biorredução, bionanotecnologia.

Resumo

A utilização de bactérias é uma alternativa sustentável à síntese química de nanopartículas metálicas, devido à facilidade de cultivo e baixo custo. Anteriormente, nosso grupo de pesquisa demonstrou a capacidade de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 reduzir $HAuCl_4$ e formar nanopartículas de ouro (AuNPs). Neste trabalho avaliamos o efeito da fonte de carbono, pH externo e mutações genéticas sobre a biorredução. O cultivo bacteriano ocorreu em meio NFbHPN contendo malato ou glucose e a redução ocorreu a 30 °C e 120 rpm durante 10 dias em pHs 4,50; 6,30; 6,80; 7,30 ou 7,80 na presença de $HAuCl_4$ 1mM. A formação de AuNPs ocorreu para bactérias cultivadas em meio contendo glucose ou malato e em todos os pHs avaliados. O lipopolissacarídeo desta espécie parece não estar envolvido na biorredução, pois a deleção destes genes em mutantes LPSEB e RAMEB-B não impediram a formação de AuNPs. Porém, o mutante MBFNR231 sem genes íntegros para a codificação de uma redutase não produziu AuNPs, sugerindo a importância desta enzima para a redução por esta espécie.

Introdução

A biossíntese de nanopartículas metálicas por bactérias é uma das metodologias alternativas e sustentáveis à síntese química devido ao seu baixo custo, ausência de resíduo tóxico gerado e sua facilidade de cultivo, a qual permite produção em larga escala. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a Betaproteobactéria *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 é capaz de reduzir o ácido tetracloro áurico ($HAuCl_4$) com formação de AuNPs. A bioquímica envolvida na formação de AuNPs por bactérias ainda não está totalmente esclarecida, pois além de complexa, é distinta entre as espécies. Alguns estudos sugerem a participação de unidades monossacarídicas do lipopolissacarídeo (LPS) de membrana na biorredução (TUGAROVA, et al., 2013) ou que redutases da membrana citoplasmática participem desse processo (GHOLAMI-SHABANI, et al., 2015). O LPS é um glicoconjugado formado por um lipídeo A, um núcleo oligossacarídeo (*core*) e o antígeno-O. Neste trabalho avaliamos o efeito de duas estirpes mutantes com alteração de LPS. A estirpe LPSEB apresenta deleção do gene *waaL*, responsável pela síntese da enzima antígeno–O-ligase, a qual ancora o antígeno-O ao *core.* O mutante RAMEB-B, possui deleção do gene *rfbB,* um dos quatro genes responsáveis pela via de biossíntese de L-ramnose, monossacarídeo presente em maior quantidade no LPS. Para avaliar a importância das proteínas da cadeia transportadora de elétrons, utilizamos o mutante MBFNR231, com deleção nos seus

três genes *fnr-like*, de ativadores transcricionais de genes envolvidos na expressão e atividade de oxidases do tipo *cbb3* e na biogênese do citocromo *c* da cadeia transportadora de elétrons (BATISTA et al., 2013). Paralelamente, avaliamos outros fatores que possam influenciar a produção das AuNPs como a fonte de carbono e pH do ambiente redutor.

Materiais e Métodos

As estirpes utilizadas neste trabalho foram SmR1 [estirpe selvagem, resistente à estreptomicina (Sm^R)], estirpe LPSEB [*H. seropedicae* SmR1 *waaL*$^-$, Sm^r, resistente à Canamicina (Km^r), BALSANELLI, 2010]; RAMEB-B [*H. seropedicae* SmR1 *rfbB*$^-$, Sm^r, resistente à tetraciclina (Tc^r) , BALSANELLI, 2010], MBFNR231 (*H. seropedicae* SmR1 *fnr1*$^-$ *fnr2*$^-$*fnr3*$^-$, Sm^r , BATISTA, et al., 2013). O crescimento das estirpes ocorreu em meio NFbHPN (KLASSEN et al.,1997), contendo malato, lactato ou glucose como fonte de carbono, 10% (v/v) de meio LB (SAMBROOK et al., 1989) e os respectivos antibióticos Km 100 µg/mL, Tc 10 µg/mL e/ou Sm 80 µg/mL, a 30 °C e 120 rpm por 3 dias. Para a biorredução as suspensões foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, ressuspendidas e lavadas duas vezes com 30 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%). A concentração final de $HAuCl_4$ foi de 1mmol/L em salina (pH 4,50) ou solução tampão fosfato 0,1 mol/L pHs 6,30; 6,80; 7,30 ou 7,80. As suspensões contendo ouro e os controles negativos foram incubados a 30 °C e 120 rpm por 10 dias, protegidos da luz.

Após a biorredução do $HAuCl_4$, alíquotas das suspensões foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e lisadas com tampão de lise (0,1% de dodecilsulfato de sódio (SDS) e 0,2 mol/L de NaOH) para análise por espectrometria de UV-Vis em aparelho Varian Cary 50 Bio a fim de verificar a presença de banda plasmon entre 520 a 540 nm das AuNPs. Para a caracterização das AuNPs, as amostras foram depositadas em telas de carbono e analisadas por Microscopia Eletrônica De Transmissão (MET) em aparelho JEOL JEM 1200EX-II a 120 kv. O diâmetro médio das AuNPs foi obtido utilizando o programa ImageJ a partir da medida de 150 AuNPs em diferentes campos das imagens obtidas pela análise por MET.

Resultados e Discussão

Os ensaios de variação do pH sobre a bioredução de SmR1 mostrou que a concentração de íons H^+ afeta a formação de AuNPs. Após incubação por 10 dias com $HAuCl_4$ houve variação de coloração das soluções e do tamanho médio das AuNPs (Figura 1, A até H). Quando a bioredução ocorreu em salina pH 4,50 houve desenvolvimento de coloração roxa e as AuNPs apresentaram diâmetro médio de 7 nm. Quando mantidas em pH 6,30, apresentou coloração violeta escura e AuNPs com diâmetro médio de 13 nm. Em pH 6,80, desenvolveu coloração lilás e AuNPs com diâmetro médio de 18nm. Em pH 7,30, apresentou coloração avermelhada e AuNPs com diâmetro médio de 22 nm e em pH 7,80 coloração rósea, AuNPs com diâmetro médio de 15 nm e presença de grandes aglomerados, superiores a 100 nm.

A fonte de carbono também parece influenciar a formação das AuNPs. Quando a estirpe SmR1 foi crescida em meio contendo malato e incubada na

presença $HAuCl_4$ e salina, apresentou mudança de coloração da suspensão pérola para roxa após 10 dias e AuNPs com diâmetro médio de 6 a 14 nm. Para a mesma estirpe, crescida em meio contendo glucose, a coloração desenvolvida após incubação foi rósea e as AuNPs formadas apresentaram diâmetro médio de 26 nm (Figura 1, I e M). Não houve crescimento bacteriano no meio contendo lactato e, portanto, não foram feitos teste de biorredução do ouro nesta condição. A banda plasmon foi observada em todas as amostras entre 520 a 540 nm no espectro UV-Vis.

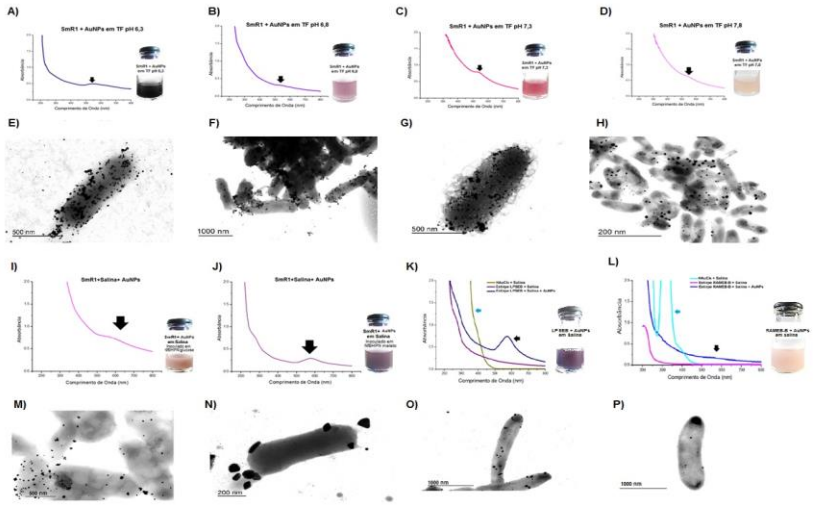


Figura 1. Efeito do pH (A-H), da fonte de carbono (I-J) e de estirpes mutantes (K-L) de *H. seropedicae* na produção de AuNPs. **A**-**D** e **I**-**L**: Análise por espectroscopia UV-Vis evidenciando a presença de banda *plasmon* (seta preta) e colorações das soluções. **E**-**H** e **M**-**P**: Imagens obtidas por MET . SMR1 incubada na presença de $HAuCl_4$ em tampão fosfato pH 6,3 (A e E - aumento de 15kx), pH 6,8 (B e F- aumento 15kx), pH 7,3 (C e G, aumento 5kx), pH 7,8 (D e H, aumento 4kx), em salina pH4,5 (J e N, aumento 10kx). Biorredução a partir de SmR1 crescidas em meio contendo glucose (I e M, aumento 20kx) e a partir de LPSEB (K e O, aumento de 8kx) e RAMEB-B (L e P, aumento de 8kx).

O estudo do efeito das mutações mostrou que SmR1 e LPSEB desenvolveram mudança de coloração pérola para violeta e para rósea na estirpe RAMEB-B após os 10 dias de redução. Entretanto, não foi evidenciada mudança de coloração na estirpe MBFNR231. A formação das AuNPs foi confirmada pela presença de banda plasmon em regiões entre 520 a 540 nm no espectro UV-Vis em todas as estirpes (Figura 2), exceto para MBFNR231, a qual não foi capaz de reduzir o $HAuCl_4$ nas condições testadas e apresentou banda de Au^{III} ($HAuCl_4$ não reduzido) em 310 nm. LPSEB produziu AuNPs com variadas formas e tamanho médio de 7nm, enquanto que RAMEB-B formou AuNPs esféricas com diâmetro médio de 5 nm. Ambos mutantes LPSEB e RAMEB-B possuem deficiência na síntese do LPS. No mutante LPSEB há a falta do antígeno-O de sua estrutura, enquanto que o mutante RAMEB-B é deficiente na inclusão da ramnose na estrutura oligossacarídica do LPS. Juntos os resultados obtidos sugerem que o LPS não está envolvido no transporte do ouro para o espaço intracelular em *H. seropedicae* e não participa do processo de biorredução. Em contrapartida, os componentes da cadeia transportadora de elétrons parece ser importante para a formação das AuNPs em *H. seropedicae,* uma vez que a deleção do seu ativador transcricional incapacitou esta estirpe de reduzir o sal de ouro.

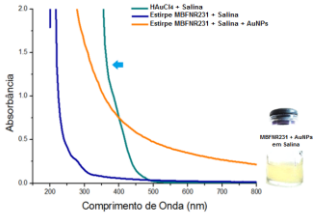


Figura 2. Espectroscopia UV-Vis das suspensões de MBFNR231 e $HAuCl_4$ 1 mM. Ausência de mudança de coloração, de banda plasmon e presença de Au^{III} (seta azul).

Conclusões

Os resultados obtidos mostraram que *H. seropedicae* foi capaz de produzir AuNPs quando crescido em meio contendo malato e glucose como fontes de carbono. O pH do meio de redução influencia o tamanho e forma das AuNPs. O LPS não está envolvido no transporte do ouro para o espaço intracelular em *H. seropedicae* e não é fundamental para a sua biorredução. Genes expressos à partir de FNR são importantes para o processo de biorredução do ouro e formação de AuNPs em *H. seropedicae.*

Agradecimentos

Ao Laboratório De Biologia Molecular Microbiana (LABMOM), a Fundação Araucária pelo auxílio financeiro, a UEPG, ao Centro De Microscopia Eletrônica da UFPR, ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio-UNICAMP) e ao grupo de fixação de nitrogênio da UFPR pelas estirpes bacterianas cedidas.

Referências

BALSANELLI, E. Caracterização funcional dos produtos dos genes rfbB e rfbC na síntese de LPS de *Herbaspirillum seropedicae* e sua interação com milho (Zea mays). 2010.

BATISTA, M. B. et al. The *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 Fnr orthologs controls the cytochrome composition of the electron transport chain. **Scientific reports**, v. 3, 2013.

KLASSEN, G. et al. Effect of nitrogen in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Can. J. Microbiol.** v. 43, p. 887-891, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning a laboratory manual. 2 ed. **Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

TUGAROVA, A. V. et al. Gold (III) reduction by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* with the formation of gold nanoparticles. **Microbial ecology**, v. 67, n. 1, p. 155-160, 2014.