

IRENA MALISZEWSKA^{1*)}, ZYGMUNT SADOWSKI¹⁾, ALEKSANDRA SKŁODOWSKA²⁾,
AGNIESZKA LEŚKIEWICZ-LAUDY³⁾

Wykorzystanie metod biotechnologicznych do otrzymywania nanocząstek metali^{**)}

Streszczenie — Zbadano możliwość wykorzystania kosmopolitycznych pleśni z rodzaju *Penicillium* do zewnątrzkomórkowej syntezy nanostruktur srebra. Ocenie poddano kilkanaście pleśni wyizolowanych z naturalnego środowiska. Określono wpływ warunków reakcji, tj. wieku hodowli i stężenia biomasy na kształt, wymiary i stabilność uzyskiwanych nanocząsteczek, a także na przebieg biosyntezy. Tworzenie nanostruktur monitorowano wizualnie oraz za pomocą spektroskopii UV-VIS.

Słowa kluczowe: nanocząstki srebra, biosynteza, pleśnie, *Penicillium*.

APPLICATION OF BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR THE BIOSYNTHESIS OF METAL NANOPARTICLES

Summary — Studies on the possibilities of the application of cosmopolitan moulds of the *Penicillium* group type for the extracellular synthesis of silver nanostructures have been presented. A number of moulds were isolated from their natural habitat and studied. The influence of reaction conditions such as the age of the cell culture and concentration of biomass on the structure, dimensions and stability of the obtained nanoparticles as well as on this biosynthesis process as a whole was evaluated. The formation of the nanoparticles was monitored visually (Fig. 1) and with UV-Vis spectroscopy (Figs. 2–10).

Keywords: silver nanoparticles, biosynthesis, moulds, *Penicillium*.

Nanocząstkami przyjęto nazywać struktury o średnicach nieprzekraczających 100 nm. Ze względu na swoje wymiary wykazują one wyjątkowe cechy, różne od tych, którymi charakteryzują się większe cząstki zbudowane z takiego samego materiału. Ogromne zainteresowanie nanomateriałami wynika właśnie z ich unikatowych optycznych, magnetycznych, elektrycznych oraz chemicznych właściwości.

Jak dotąd opisano już szereg chemicznych i fizycznych metod otrzymywania nanocząstek metali [1–3].

Szczególne miejsce wśród nanostruktur zajmuje srebro, a jego antybakteryjne działanie znane było już w starożytności. Ostatnio coraz częściej srebro jest wykorzystywane w aplikacjach innych niż bezpośrednio medycz-

ne. Najszerzej prowadzone są prace dotyczące zastosowania polimerowych materiałów impregnowanych nanosrebrem do produkcji opatrunków (bandaże, plastry), bielizny, maseczek itp.[4]. Wykazano również niezwykłą skuteczność np. poliuretanu, polisulfonu zawierającego nanocząstki srebra w procesie dezynfekcji wody [5], włączając w to usuwanie wirusów [6].

Stąd też, w ostatnich latach obserwuje się intensyfikację prac badawczych zmierzających do opracowania nowych, efektywnych i tanich metod otrzymywania nanocząstek srebra. Jednym z nowatorskich sposobów jego wytwarzania jest wykorzystanie metod biotechnologicznych, tj. metabolizmu mikroorganizmów, glonów lub roślin wyższych [7, 8].

Biologiczna synteza nanocząstek może się odbywać zarówno zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowo, i o ile w przypadku roślin oraz alg, wytwarzanie nanocząstek ogranicza się jedynie do syntezy zewnątrzkomórkowej, to w odniesieniu do mikroorganizmów obie metody są możliwe i stosowane w zależności od przeznaczenia uzyskiwanych struktur.

Do chwili obecnej opisano kilkanaście szczepów bakterii syntetyzujących nanocząstki srebra. *Pseudomonas stutzeri* AG259 jest przykładem bakterii akumulującej wewnątrz komórek nanosrebro o wymiarach 36–46 nm [9]. Wewnątrzkomórkowa synteza nanocząstek srebra

¹⁾ Politechnika Wroclawska, Wydział Chemiczny, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław.

²⁾ Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Pracownia Analizy Skażeń Środowiska, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa.

³⁾ Muzeum Pałac w Wilanowie, ul. S. Kostki-Potockiego 10/16, 02-958 Warszawa.

*) Autor do korespondencji; e-mail: irena.helena.maliszewska@pwr.wroc.pl

**) Artykuł zawiera treść wystąpienia przedstawionego w ramach VI Kongresu Technologii Chemicznej, który odbył się w Warszawie w dniach 21–25 czerwca 2009 r.

jest prowadzona również przez *Bacillus licheniformis* [10], a także *Lactobacillus* — bakterię powszechnie występującą w maślanie [11].

Do bakterii syntetyzujących nanocząstki srebra na zewnątrz komórek można zaliczyć pałeczki *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter cloacae*, w przypadku których już po 5 minutach inkubacji jonów srebra z ich przesączami pochodzonymi rozpoczyna się intensywna ich redukcja [12].

Stosunkowo nowym rozwiązaniem jest wykorzystanie do biosyntezy nanocząstek komórek grzybów strzępkowych. Ich konkurencyjność w stosunku do bakterii wynika przede wszystkim z dużych ilości enzymów, przypuszczalnie niezbędnych do redukcji jonów metali do postaci metalicznej, wbudowanych w ścianę komórkową grzyba, ale także znajdujących się w jego wnętrzu, a co chyba najważniejsze, wydzielanych do środowiska. Ponadto, ściana komórkowa grzybów jest bogata w lipi- i glikoproteiny strukturalne, które również mogą odgrywać rolę czynników redukujących [13]. Wymienione cechy umożliwiają, w przypadku grzybów, otrzymywanie nanocząstek metali we wnętrzu komórek, na ich powierzchni oraz w płynie pochodzonym.

Ekspozycja biomasy pleśni z rodzaju *Verticillium* [13] z jonami srebra powoduje ich redukcję i wewnątrzkomórkową akumulację nanocząstek srebra o średnicy 25 nm. *Aspergillus flavus* zaś redukuje jony srebra, prowadząc do powstania zaadsorbowanych na powierzchni grzybni nanocząstek o wymiarze 8,92 nm [14].

Zewnątrzkomórkowa synteza pozwala na uniknięcie kosztownego etapu oddzielania nanocząstek od biomasy. Taki sposób biosyntezy nanosrebra ma miejsce w przypadku *Fusarium oxysporum* [15], *Fusarium semitectum* [16] *Pchaenerochaete chrysosporium* [17], *Trichoderma asperellum* [18], oraz szczepów z rodzaju *Penicillium* [19, 20].

Biologiczna synteza jest możliwa również z wykorzystaniem ekstraktów z liści roślin wyższych. Zaletą ich zastosowania jest wyeliminowanie konieczności opracowania metod utrzymywania kultur komórkowych [21, 22].

Istnieje kilka hipotez wyjaśniających mechanizm redukcji jonów srebra i powstawanie nanocząstek. Przypuszcza się, że za proces ten odpowiadają enzymy. W kilku przypadkach potwierdzono rolę, obecnej w błonie komórkowej, reduktazy azotanowej zależnej od NADH [15, 23].

W niniejszym artykule prezentujemy wyniki badań dotyczących możliwości wykorzystania kosmopolitycznych pleśni z rodzaju *Penicillium* do zewnątrzkomórkowej syntezy nanostruktur srebra.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Selekcja i dobór pleśni

Aby dokonać wyboru najlepszych „producentów” nanocząstek srebra badaniom poddano kilkanaście różnych pleśni wyizolowanych z naturalnego środowiska:

gleby, aerozolu powietrznego oraz jedwabnych welurów pochodzących z Muzeum Pałacu w Wilanowie. Hodowle grzybów prowadzono w płynnym podłożu o następującym składzie: NH_4NO_3 — 1 g, K_2HPO_4 — 2 g, KH_2PO_4 — 7 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,1 g, ekstrakt drożdżowy — 0,6 g, glukoza — 10 g, woda redestylowana — 1000 ml. Po 7 dobach inkubacji w temp. 25 °C, metodą filtracji oddzielano grzybnie i zawieszano je w 100 ml wody dejonizowanej. Po kolejnych 72 h inkubacji w temp. 25 °C, grzybnie odfiltrowywano od płynu. Do tak uzyskanego ekstraktu dodawano AgNO_3 tak, aby końcowe jego stężenie wynosiło 10^{-3} M. Mieszaninę inkubowano przez 96 h w temp. 23 °C. Redukcję jonów Ag^+ monitorowano obserwując zmiany zabarwienia mieszanin reakcyjnych oraz śledząc widma UV-VIS w zakresie 200–800 nm, przy użyciu spektrofotometru Helios Delta.

Ocena wpływu wieku hodowli na biosyntezę nanocząstek srebra

Do badań wykorzystano 4-, 7- oraz 11-dniowe hodowle wyselekcjonowanego mikroorganizmu w podłożu płynnym. Do uzyskanych według procedury opisanej powyżej ekstraktów komórkowych dodawano AgNO_3 w końcowym stężeniu 10^{-3} M. Tworzenie nanostruktur monitorowano za pomocą spektroskopii UV-VIS.

Ocena wpływu stężenia czynnika redukującego na biosyntezę srebra

W badaniach wykorzystano 4-dniową hodowlę wybranego szczepu pleśni. Otrzymaną biomasę przesączono, dokładnie przemyto wodą dejonizowaną, zważono i rozdzielono, odpowiednio, w stosunku 5 g lub 20 g grzybni na 100 ml wody dejonizowanej. W ten sposób uzyskano ekstrakty komórkowe, do których dodano AgNO_3 i inkubowano w temp. 23 °C. Tworzenie nanocząstek srebra monitorowano rejestrując widma UV-VIS.

Metody badań

— Za pomocą technik TEM (elektronowa mikroskopia transmisyjna) oraz SEM (skaningowa mikroskopia elektronowa) określano kształt, wielkość i lokalizację nanocząstek.

— Do oceny wymiarów nanocząstek wykorzystano również metodę dynamicznego rozpraszania światła używając aparatu Zeta Potential/Particle Sizer NI-COMP™ 380 ZLS, wyposażonego w plastikowe kuwety. Pomiar przeprowadzono w dwóch cyklach 5-minutowych, w stałej temp. 25 °C i długości fali lasera równej 532 nm.

— Stabilność uzyskiwanych nanocząstek badano wykreślając ich widma w zakresie 200–800 nm, po 30 dobach przechowywania w temperaturze pokojowej.

— Mechanizm biosyntezy nanocząstek analizowano przy użyciu spektroskopii UV-VIS, wykorzystując eks-

trakt komórkowy otrzymany z 4-dniowej hodowli pleśni. Ekstrakt był poddawany ogrzewaniu przez 30 min w temp. 80 °C, a następnie użyty do biosyntezy nanocząstek srebra.

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Biosyntezę nanocząstek srebra przez wyizolowane pleśnie monitorowano obserwując zmieniające się zabarwienie mieszaniny reakcyjnej (rys. 1). Jeżeli, podczas inkubacji ekstraktu komórkowego z jonami srebra, zachodzi ich redukcja i tworzenie nanostruktur, wówczas mie-



Rys. 1. Barwa mieszaniny reakcyjnej przed dodaniem (po lewej) i po upływie 72 h od chwili dodania (po prawej) AgNO_3 do ekstraktu komórkowego uzyskanego z pleśni Pen 2

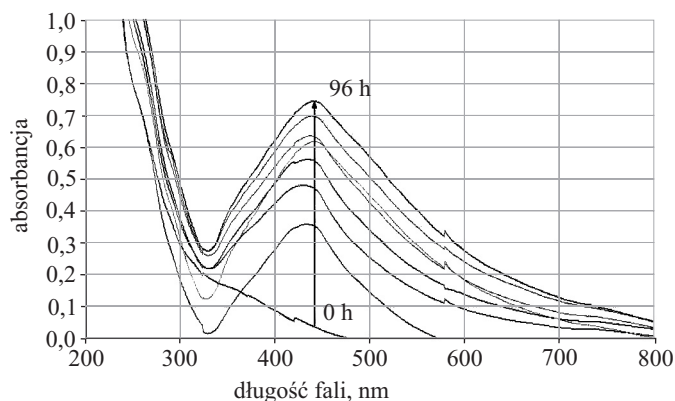
Fig. 1. The color of cell-free filtrate (left) and 72 h after the addition of silver ions (right)

szanina reakcyjna zmienia swoją barwę ze słomkowo żółtej na brązową.

Obserwowane zjawisko jest związane z powierzchniowym rezonansem plazmowym inicjowanym na drodze interakcji fali elektromagnetycznej światła widzialnego z chmurą elektronową cząstki [24]. W widmie UV-VIS jest widoczny charakterystyczny pik absorpcji w zakresie 415–440 nm, którego kształt zależy od wymiarów cząstek, ich kształtu, stopnia agregacji itp. Biorąc pod uwagę barwę mieszaniny reakcyjnej i przebieg widm UV-VIS, do dalszych badań wybrano mikroorganizm oznaczając go symbolem Pen 2. Na podstawie charakterystycznego wzrostu na podłożu Malt Extract Agar oraz mikroskopowego obrazu konidioforów, wybraną pleśń zaliczono do rodzaju *Penicillium* [25].

Wpływ wielu hodowli na biosyntezę nanosrebra

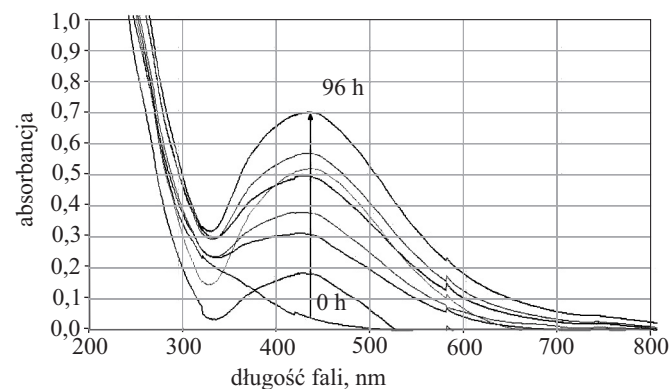
Szereg przeprowadzonych dotychczas doświadczeń wskazuje, że synteza nanocząstek metali jest cechą cha-



Rys. 2. Widma UV-VIS rejestrowane w czasie reakcji AgNO_3 z ekstraktem komórkowym uzyskanym z 4-dniowej hodowli pleśni

Fig. 2. UV-Vis spectra recorded during the reaction of silver nitrate with cell-free filtrate obtained from 4-day old biomass

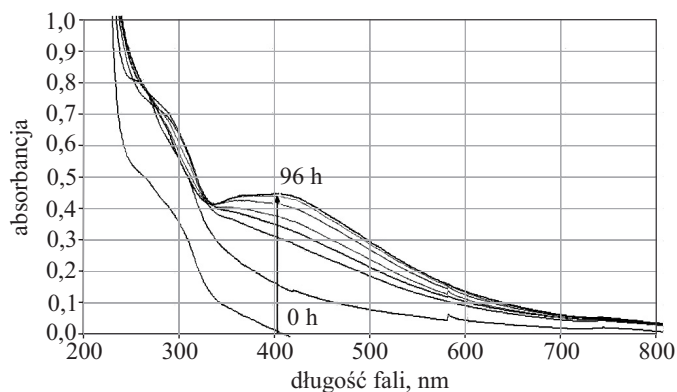
rakterystyczną dla danego mikroorganizmu i zależy od wielu czynników, m.in. od wieku hodowli. Rysunki 2–4 przedstawiają widma UV-VIS mieszanin reakcyjnych zawierających nanocząstki srebra uzyskane z wykorzystaniem 4, 7 i 11-dniowych hodowli pleśni. Jak widać, ekstrakty komórkowe uzyskane z 4 i 7-dniowych hodowli rozpoczynają redukcję jonów srebra już po dwóch godzinach inkubacji. Piki na odpowiadających im widmach są stosunkowo ostre, co świadczy o niedużej dyspersyjności otrzymywanych nanostruktur. Zwiększająca się wartość absorbancji w maksimum pików potwierdza postępujący w czasie intensywny proces bioredukcji. Obserwowane jest również przesunięcie, w toku przebiegającej reakcji, maksimum absorpcji w kierunku fal dłuższych z 430 nm do 441 nm w przypadku ekstraktu z 4-dniowej hodowli i z 421 nm do 440 nm – ekstraktu z 7-dniowej hodowli. Takie przesunięcia świadczą o zwiększeniu się średnicy nanocząstek wynikającym prawdopodobnie z ich nieznacznej agregacji (por. rys. 2, 3).



Rys. 3. Widma UV-VIS rejestrowane w czasie reakcji AgNO_3 z ekstraktem komórkowym uzyskanym z 7-dniowej hodowli pleśni

Fig. 3. UV-Vis spectra obtained during the reaction of silver nitrate with cell-free filtrate obtained from 7-day old biomass

Tworzenie nanocząstek srebra przy użyciu ekstraktu pochodzącego z hodowli 11-dniowej rozpoczyna się dopiero po upływie 48 h inkubacji i zachodzi z mniejszą wydajnością — wartości absorpcji są znacznie mniejsze (por. rys. 4). We wszystkich przypadkach można zaobserwować tzw. wolno opadające ogony. Taki kształt widm może świadczyć o powstawaniu nanocząstek polidispersyjnych.



Rys. 4. Widma UV-VIS rejestrowane w czasie reakcji AgNO_3 z ekstraktem komórkowym uzyskanym z 11-dniowej hodowli pleśni

Fig. 4. UV-Vis spectra obtained during the reaction of silver nitrate with cell-free filtrate obtained from 11-day old biomass

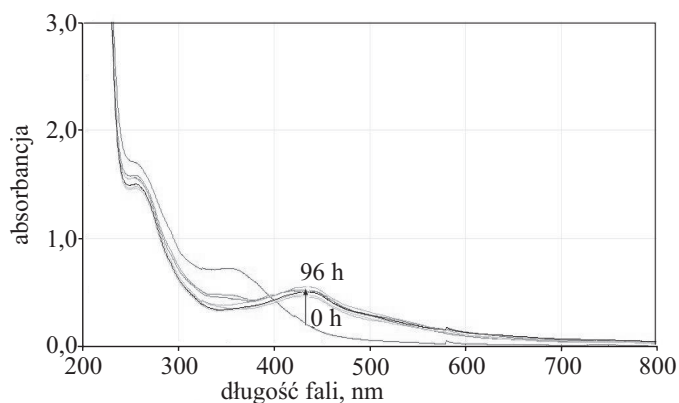
Maksimum absorpcji przypada, w zależności od czasu reakcji, na 372–403 nm, co sugeruje, że obecne w mieszaninie nanocząstki to małe struktury sferyczne [26].

Metodą dynamicznego rozpraszania światła potwierdzono, że wielkość uzyskiwanych nanocząstek srebra zależy od wieku hodowli. W przypadku użycia 4-dniowej hodowli pleśni, średnica nanocząstek wynosiła 40–59 nm, 7-dniowej — 30–45 nm, gdy zaś wykorzystamy hodowlę 11-dniową możemy uzyskać nanostruktury polidispersyjne o wielkości 3–61 nm (najwięcej jest tych o średnicy 4–5 nm).

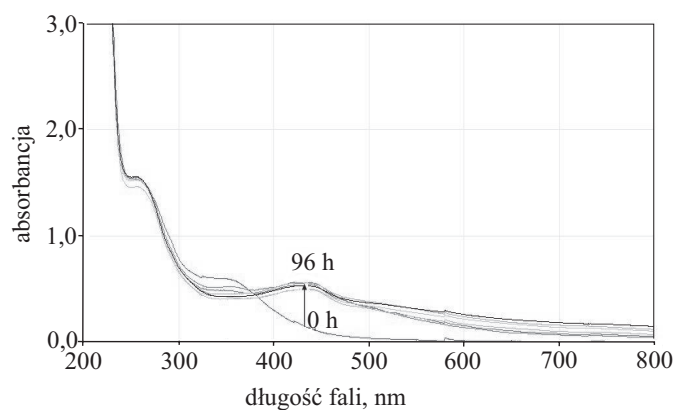
Wpływ stężenia czynnika redukującego na biosyntezę nanosrebra

Wpływ stężenia czynnika redukującego na biosyntezę badano wykorzystując hodowle 4-dniowe. Jako stężenie czynnika redukującego przyjęto stosunek masy biomasy do objętości wody dejonizowanej użytej na etapie otrzymywania ekstraktu komórkowego (rys. 5, 6).

Stężenie w ekstraktach komórkowych wytworzonych z 5 g lub 20 g biomasy jest wystarczające do przebiegu reakcji redukcji jonów Ag^+ , jednak reakcja przebiega z małą wydajnością. W mieszaninie dochodzi prawdopodobnie do agregacji i sedimentacji nanostruktur, czego efektem jest spadek wartości absorpcji w punkcie maksimum po kilku godzinach reakcji.



Rys. 5. Widma UV-VIS rejestrowane w czasie reakcji AgNO_3 z ekstraktem komórkowym uzyskanym z 5 g biomasy pleśni



Rys. 6. Widma UV-VIS rejestrowane w czasie reakcji AgNO_3 z ekstraktem komórkowym uzyskanym z 20 g biomasy pleśni

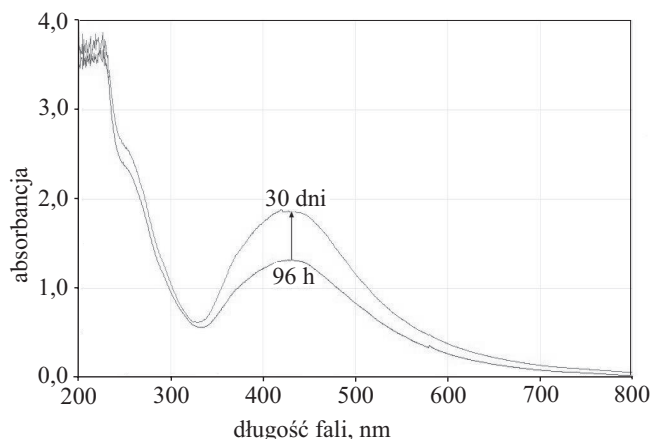
Widma w tym przypadku charakteryzują się również wolno opadającymi ogonami.

Charakterystyka nanocząstek srebra

Bardzo ważną cechą decydującą o możliwościach przemysłowego zastosowania nanocząstek jest ich stabilność.

Jak widać na rys. 7, w ciągu 30 dób przechowywania nanosrebra w temperaturze pokojowej, wartość absorpcji w punkcie maksimum nie zmniejsza się, ale nawet nieznacznie wzrasta. Świadczy to o zachodzącej w tym czasie biosyntezie nanosrebra. Nie obserwujemy również znaczącego przesunięcia maksimum absorpcji w kierunku fal dłuższych, mogącego świadczyć o postępującej agregacji nanocząstek.

Wyniki potwierdzają nasze obserwacje, że uzyskiwane struktury są stabilne w warunkach pokojowych. Już od pierwszego zastosowania układów biologicznych wiadomo, że nanocząstki wytwarzane przez materię

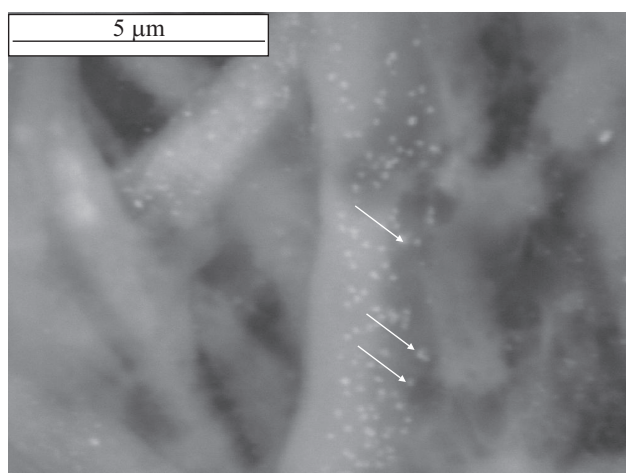


Rys. 7. Widma UV-VIS rejestrowane po 96 h i 30 dobach przechowywania w temperaturze pokojowej mieszaniny reakcyjnej zawierającej nanocząstki srebra

Fig. 7. UV-Vis spectra of the reaction mixture containing silver nanoparticles after incubation for 96 h and 30 days

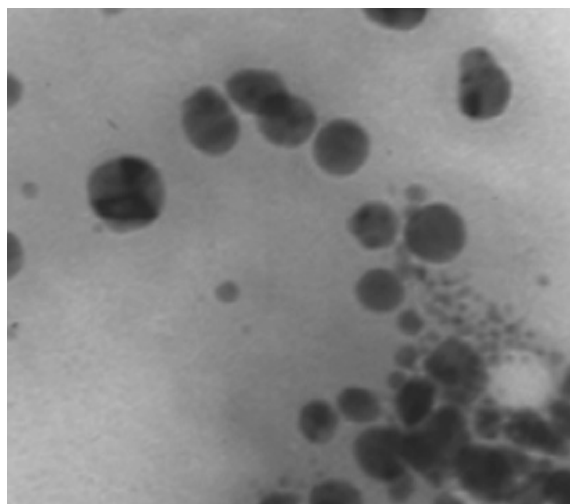
organiczną nie łączą się ze sobą, a w konsekwencji nie wykazują tendencji do sedymentacji. Obecnie tłumaczy się to zjawisko powstającymi kompleksami nanocząstek z białkami. Potwierdzeniem są widma UV-VIS mieszanin poreakcyjnych, gdzie można zaobserwować na ogół dwa główne maksima: jedno w pobliżu fali o długości 415–440 nm, pochodzące od nanocząstek srebra, drugie w pobliżu fali o długości 280 nm, charakterystyczne dla aromatycznych grup bocznych tyrozyny, tryptofanu oraz fenyloalaniny (por. rys. 7).

Rysunek 8 ilustruje lokalizację nanocząstek srebra wytworzonych przy udziale biomasy wybranej pleśni. Wyraźnie widać (jasne plamki), że nanocząstki zawieszono są w galaretowatej substancji organicznej na zewnątrz



Rys. 8. Obraz SEM, umiejscowienie nanocząstek srebra na powierzchni strzępek grzybni *Penicillium sp.* po 72 h inkubacji w wodnym roztworze AgNO_3

Fig. 8. SEM image of the localization of silver nanoparticles on the surface of *Penicillium sp.* cells after 72 hours of immersion in silver nitrate aqueous solution



Rys. 9. Mikrogram TEM nanocząstek srebra otrzymanych z wykorzystaniem ekstraktu komórkowego pochodzącego z 4-dniowej hodowli szczepu Pen 2 (powiększenie 220 000×)

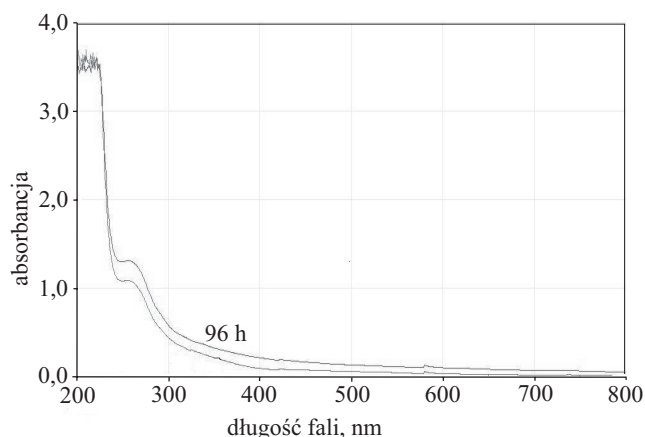
Fig. 9. TEM image of silver nanoparticles obtained using a cell-free filtrate from a 4-day old biomass of Pen 2 (220 000× magnification)

grzybni. To ta substancja prawdopodobnie znajduje się w ekstrakcie komórkowym i stabilizuje powstające nanostruktury. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejszą hipotezę mówiącą, że jony srebra akumulują się na powierzchni ściany komórkowej grzybni przypuszczalnie na skutek oddziaływania elektrostatycznego, a następnie są redukowane przez enzymy obecne w ścianie komórkowej [13].

Przykładowy obraz TEM wytworzonych nanostruktur srebra przedstawia rys. 9. Jak widać, w przeważającej części są to otoczone galaretowatą substancją struktury sferyczne, o wymiarach 4–45 nm (średnia wielkość to 16 nm). Można sądzić, że otaczająca substancja zapobiega ich agregacji. Dane dotyczące wymiarów nanocząstek srebra uzyskane za pomocą techniki TEM pokazują, że są one mniejsze niż wynikałoby to z pomiarów metodą dynamicznego rozpraszania światła — prawdopodobnie oznaczana tą metodą średnica nanocząstki jest powiększona o otaczającą ją galaretowatą substancję.

W celu wyjaśnienia podstaw mechanizmu syntezy nanocząstek srebra przez badaną pleśń Pen 2 prowadzono reakcję przy użyciu ekstraktu komórkowego, poddanego uprzednio ogrzewaniu w ciągu 30 min w temp. 80 °C (rys. 10).

Ogrzewanie ekstraktu komórkowego prowadzi prawdopodobnie do termicznej denaturacji obecnego tam enzymu odpowiedzialnego za proces bioredukcji jonów srebra. Na przedstawionych widmach nie zaobserwowano charakterystycznego dla nanocząstek srebra maksimum absorpcji. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia, że synteza nanocząstek srebra prowadzona przez mikroorganizmy jest procesem enzymatycznym [15, 23]. Zrozumienie tego mechanizmu wymaga jednak dodatkowych badań.



Rys. 10. Widma UV-VIS rejestrowane w czasie reakcji AgNO_3 z ogrzany ekstraktem komórkowym *Pen 2*

Fig. 10. UV-Vis spectra obtained during the reaction of silver nitrate with heat-denatured protein in the cell filtrate of *Pen 2*

PODSUMOWANIE

Wykazano możliwość wykorzystania kosmopolitycznych pleśni z rodzaju *Penicillium* do zewnątrzkomórkowej redukcji jonów srebra, w wyniku której wytwarzają się nanocząstki tego metalu. Przebieg biosyntezy łatwo można monitorować metodą spektroskopii UV-VIS. Wielkość powstających nanostruktur zależy od wieku hodowli i stężenia biomasy. Uzyskiwane nanocząstki srebra są naturalnie stabilizowane za pomocą białek obecnych w ekstraktach komórkowych.

LITERATURA

- Bonnemann H., Richards R. M.: *Eur. J. Inorg. Chem.* 2001, **10**, 2455.
- Krut'akov Yu. A., Kudrinskiy A. A., Olenin A. Yu., Lisichkin G. V.: *Rus. Chem. Rev.* 2008, **77**, 233.
- Kryukov A. I., Zin'chuk N. N., Korzhak A. V., Kuchmii S. Y.: *Theor. Exp. Chem.* 2003, **39**, 9.
- Ali A.W., Rajendran S., Joshi M.: *Carbohydrate Polym.* (article in press) doi: 10.1016/j.carbpol.2010.08.004
- Jain P., Pradeep T.: *Biotechnol. Bioeng.* 2005, **90**, 59.
- Brunet Z. K., Mahendra S., Li D., Zhang A., Li Q., Alvarez P. J.: *Water Res.* 2009, **43**, 715
- Mandal D., Bolander M. E., Mukhopadhyay D., Sarkar G., Mukherjee P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, **69**, 484.
- Huang J., Li Q., Sun D., Lu Y., Su Y. i in.: *Nanotechnology* 2007, **18**, 1.
- Klaus T., Joerger R., Olsson E., Granqvist C. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, **96**, 13611.
- Kalimuthu K., Babu R. S., Venkataraman D., Bilal M., Gurusnathan S.: *Colloids Surf. B* 2008, **65**, 150.
- Nair B., Pradeep T.: *Cryst. Growth Des.* 2002, **2**, 293.
- Shahverdi A. R., Minaeian S., Shahverdi H. R., Jamalifar H., Nohi A. A.: *Process Chem.* 2007, **42**, 919.
- Mukherjee P., Ahmad A., Mandal D., Senapati S., Sainkar S. R. i in.: *Nano Letters* 2001, **1**, 515.
- Vigneshwaran N., Ashtaputre N. M., Varadarajan P. V., Nachane R. P., Paralikar K. M., Balasubramanya R. H.: *Mater. Lett.* 2007, **61**, 1413.
- Duran N., Marcato P. D., Alves O. L., De Souza G. I. H., Espósito E.: *J. Nanobiotechnol.* 2005, **3**, 8.
- Basavaraja S., Balaji S. D., Lagesthetty A., Rajasab A. H., Venkataraman A.: *Mater. Res. Bull.* 2008, **43**, 1164.
- Vigneshwaran N., Kathe A. A., Varadarajan P. V., Nachane R. P., Balasubramanya R. H.: *Colloids Surf. B* 2006, **53**, 55.
- Mukherjee P., Roy M., Mandal B. P., Dey G. K., Mukherjee P. K. i in.: *Nanotechnology* 2008, **19**, 1.
- Sadowski Z., Maliszewska I. H., Grochowalska B., Polowczyk I., Koźlecki T.: *Mater. Sci. Poland* 2008, **26**, 419.
- Maliszewska I., Szewczyk K., Waszak K.: *J. Phys.: Conf. Ser.* 2009, **146**, 1.
- Song J. Y., Klim B. S.: *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2009, **32**, 79.
- Parashar V., Parashar R., Sharma B., Pandey A.: *Digital J. Nanomater. Biostruct.* 2009, **4**, 45.
- Kumar S. A., Abyaneh M. K., Pasricha R., Ahmad A., Khan M. I.: *Biotechnol. Lett.* 2007, **29**, 439.
- Mulvaney P.: *Langmuir* 1996, **12**, 788.
- Demain A. L., Solomon N. A.: „Biology of industrial microorganisms”, The Benjamin/Cummings Publ. Comp., Inc., 1985, str. 407–431.
- Mock J. J., Barbic M., Smith D. R., Schultz D. A., Schultz S.: *J. Chem. Phys.* 2002, **116**, 6755.

Otrzymano 7 XII 2009 r.