



Scan online to view this article

Production of silver Nano particle by mesophilic aerobic bacteria isolated from Persian Gulf

Marzieh Khodaverdi Tajabadi¹, Babak Kheyrkhan^{1*}, Kumarss Amini²

1- Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

2-. Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran,

Abstract

Aim and Background: Nanoparticles are widely used in medical, pharmaceutical and health sciences. The aim of this project was to evaluate the mesophilic bacteria isolated from the Gulf coast in the production of silver nanoparticles and investigate the antimicrobial effect of these nanoparticles on some pathogenic bacteria.

Material and methods: This descriptive and cross-sectional study was performed over a period of 8-month from April to November 2017. The isolates were purified from water and sediments samples of the coasts of Hormozgan Province - Iran, after that the purified isolates were cultivated in Zobell Marine Broth medium. The obtained supernatant of the medium was added to the silver nitrate (AgNO₃) solution (0/001 M) with (1:5) ratio at the light condition in order to the reduction of AgNO₃ to metallic silver. The synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) was investigated by UV-Vis spectrophotometer, Transmission electron microscope(TEM), and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analysis. The antimicrobial activity of AgNPs was evaluated against 6 microbes.

Results: The results indicated that supernatants of all isolates are capable of producing silver nanoparticles. The surface plasmon resonance of AgNPs showed a maximum peak near 420 nm, which UV-vis spectra correspond to the absorbance of AgNPs. The results of TEM micrographs image of silver nanoparticles produced by dominant strain showed spherical shapes and size of 2/88 to 19 nm. The synthesized AgNPs showed the antimicrobial activity and inhibitory effects on the growth of tested microbes.

Conclusion: The desired isolates have a potential ability to producing AgNPs, and to summarize, this is a low cost, ecofriendly, and quick method for the synthesis of AgNPs.

Keywords: Aerobic mesophilic bacteria, Persian Gulf, silver nanoparticles.

Corresponding author:

Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

Email: babakkheirkhan@yahoo.com

برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

تولید نانوذره های نقره توسط باکتری های هوازی مزوفیل جداسازی شده از آب های خلیج فارس مرضیه خداوردی تاج آبادی^۱، بابک خیرخواه^{۱*}، کیومرث امینی^۲

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: نانوذره ها کاربرد وسیعی در علوم پزشکی و دارویی و بهداشتی دارند. هدف از انجام پروژه حاضر، ارزیابی باکتری های مزوفیل جداسازی شده از سواحل خلیج فارس در تولید نانوذره های نقره و بررسی اثر ضد میکروبی این نانوذره ها بر روی برخی از باکتری های پاتوژن است.

مواد و روش ها: این مطالعه توصیفی-مقطعی در یک بازه زمانی ۸ ماهه از اردیبهشت لغایت آذر ۱۳۹۶ انجام شد. پس از خالص سازی جدایه ها از آب و رسوب ها از سواحل استان هرمزگان و کشت در محیط زوبل مارین برات، سوپر نانانت حاصل در شرایط نوری به نسبت ۱ به ۵ با محلول نیترات نقره ۰/۰۰۱ مولار به جهت احیای فلزی تیمار شد. وجود نانوذره های نقره از طریق اسپکتروفتومتر، میکروسکوپ الکترونی TEM، آنالیز FTIR و خواص ضد میکروبی، نانوذره ها علیه ۶ میکروب مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: سوپر نانانت کلیه جدایه ها توانایی تولید نانو ذره های نقره را دارد. در اسپکتروفتومتر نقطه اوج ۴۲۰ نانومتر، مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذره های نقره است و نتایج FTIR وجود ترکیب های احتمالی، دخیل در تولید نانوذره ها را اثبات کرد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی TEM نانوذره های تولیدی توسط سویه برتر را کروی شکل با ابعاد ۱۹-۲/۸۸ نانومتر نشان داد و خواص ضد میکروبی با توانایی مهار، رشد میکروب ها توسط نانوذره های تولیدی مشخص شد.

نتیجه گیری: جدایه های مورد نظر توان تولید نانوذره های نقره را دارند و این روش تولید برای محیط زیست ایمن، و از نظر اقتصادی و زمان به صرفه است.

واژه های کلیدی: باکتری مزوفیل هوازی، خلیج فارس، نانوذره های نقره

مقدمه

کشف برترین فرآیندها در پروسه بیولوژیکی و علوم پزشکی استفاده کرد (۱). تولید نانوذره های نقره یک دستاورد شگرف علمی از علم نانوتکنولوژی است که در عرصه های مختلف علوم پزشکی و صنایع مختلف مثل کشاورزی، دامپروری، آرایشی و بهداشتی کاربرد دارد (۲). امروزه سنتز نانوذره های فلزی به-خصوص نانوذره های نقره به دلیل اهمیت زیستی و کاربردهای پزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. به طور کلی سه روش شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی به منظور سنتز این نانوذره های نقره به کار می رود؛ در روش های فیزیکی و شیمیایی علاوه بر تحمیل هزینه های بالا، آلودگی های زیست محیطی بسیاری را به همراه دارند (۳، ۴). تولید نانوذره های نقره توسط روش های

امروزه علم نانو یا نانو فناوری به سرعت در حال رشد است و فناوری نانو در مجموع توصیف فناوری و علم مربوط به نانوذره ها است و افزایش دامنه تحقیق ها و تنظیم فعل و انفعال ها در سطح سلولی بین مواد مصنوعی و سیستم های بیولوژیک را در پی دارد. از نانوذره ها می توان به عنوان یک ابزار کارآمد برای

نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

پست الکترونیکی: babakkheirkhah@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۰۴

بیماری‌های باکتریایی، بیماری‌های قارچی، بیماری‌های گوارشی، بیماری‌های عفونی و بیماری‌های جنسی استفاده کرد. در مواد دندان‌ی، نانوذره‌های نقره با قطر ذره‌های اولیه کوچک‌تر از ۴۰ نانومتر به‌عنوان یک ضد باکتری در طول فرآیند پلی‌مریزاسیون استفاده می‌شوند (۱۳). نانوذره‌های نقره با اتصال به گلیکوپروتئین ۱۲۰ کیلودالتونی که در سطح ویروس ایدز قرار دارد مانع از چسبیدن ویروس ایدز به سلول‌های زنده می‌شود. دانشمندان در حال حاضر مشغول ساختن ماده‌ای با استفاده از این نانوذره‌ها برای پیشگیری از ایدز هستند (۱۴، ۱۵). در ایران تولید نانوذره‌های نقره با استفاده از میکروبی‌های آب‌شور مورد بررسی قرار نگرفته لذا لزوم توجه به پتانسیل باکتری‌های مزوفیل جداسازی شده خلیج فارس احساس شده و در پژوهش حاضر این پتانسیل در مقیاس آزمایشگاهی بررسی گردید؛ لذا در این مطالعه به جداسازی باکتری‌های مزوفیل هوازی دارای توانمندی تولید نانوذره‌های نقره از آب‌های شور خلیج فارس پرداخته شد و سویه‌های برتر شناسایی و معرفی گردیدند.

روش کار

نمونه‌برداری از آب دریا و جداسازی باکتری‌ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی که در یک بازه زمانی ۸ ماهه از ابتدای اردیبهشت لغایت انتهای آذر ۱۳۹۶ انجام گردید، نمونه آب و رسوب‌ها از سواحل و مناطق مختلف خلیج فارس از جمله ساحل بندرلنگه، ساحل شهر بندرعباس، ساحل میشین، جزیره قشم و جزیره هرمز در بطری‌های استریل درب پیچ‌دار جمع‌آوری شد و با رعایت شرایط سرمایی ۵-۲ درجه سانتی‌گراد در جعبه یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه، از کلیه نمونه‌ها در شرایط استریل رقت‌های سریالی در محلول رینگر (شرکت فرآورده‌هایی تزریقی و دارویی-ایران) تهیه شد و از رقت‌های تهیه‌شده در شرایط استریل مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر در سطح محیط کشت پلیت کانت آگار (مرک-آلمان) ریخته شد و کشت سطحی انجام شد و محیط‌های کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند (انکوباتور مدل بهداد-ایران) و سپس از لحاظ رشد و عدم رشد مورد پایش قرار گرفتند. براساس خصوصیت‌های ظاهری، باکتری‌های رشد کرده انتخاب و در سطح محیط‌های کشت پلیت کانت آگار به صورت خطی برای گرفتن کلنی خالص کشت داده شد و پس از آن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند

زیستی علاوه بر ارزان بودن و عدم نیاز به تجهیزات گران قیمت و به‌کارگیری روش‌های آسان و در نظر گرفتن این نکته که از لحاظ پایداری نسبت به روش‌های شیمیایی و فیزیکی از پایداری بالاتری برخوردار خواهند بود، به‌مرور جایگزین روش‌های فوق خواهند شد (۵). از طرفی توسعه مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی علیه میکروارگانیسم‌ها به یک مشکل تبدیل شده است و با توجه به این که حدود ۷۰ درصد از اکوسیستم‌های کره زمین را آب‌ها پوشانده‌اند و دارای تنوع عظیم میکروبی هستند؛ میکروارگانیسم‌های آب‌شور کم‌تر مورد توجه قرار گرفته‌اند (۶). در سال‌های اخیر جستجو برای منابع بالقوه از تحمل فلزی میکروارگانیسم‌ها، قارچ‌ها، سیانو باکتری‌ها و جلبک‌های آب‌شور برای سنتز نانوذره‌های فلزی کم‌تر بوده است. در این روش از گیاهان و میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و اکتینومیست‌ها جهت تولید نانوذره‌ها استفاده می‌شود. هنگامی که میکروارگانیسم‌ها در معرض نمک‌های فلزی قرار می‌گیرند، با استفاده از آنزیم‌های خاص مانند: NADH ردوکتاز و یا نیترات ردوکتاز یون‌های فلزی را احیا و نانوذره‌ها را به‌صورت داخل سلولی و یا خارج سلولی تولید می‌کنند (۷). باکتری‌ها در مقایسه با قارچ‌ها به دلیل کاربرد آسان‌تر مورد توجه گرفته‌اند. از تشکیل مواد بیولوژیکی معدنی توسط باکتری‌ها به‌تازگی گزارش‌هایی ارائه گردیده‌است از جمله: تشکیل نانوکریستال‌های لانتیوم توسط باکتری *سودوموناس آنروژینوزا* و *اشرشیاکلی* در محیط حاوی نیترات لانتیوم است. میزان مقاومت باکتری به یون‌های فلزی و تشکیل ذره‌های معدنی به ترکیب‌های محیط رشد و ظرفیت جذب سلول‌ها برای جذب یون‌های فلزی سنگین وابسته است. *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* و *تیوباسیلوس تیواکسیدانس* قادر به فروشویی سولفیدهای معدنی و تولید نانوذره‌های نقره است. یکی از مثال‌های باکتری‌های تجمع دهنده فلزات، *سودوموناس استاتزری* است که قادر به تولید نانوذره‌های نقره کم‌تر از ۴۰۰ نانومتر است. با توجه به خاصیت ضد میکروبی نقره بایستی مکانیسم‌هایی در باکتری *سودوموناس استاتزری* وجود داشته باشد که سبب مقاومت این باکتری به نقره است (۱۱، ۱۰، ۹، ۸). با توجه به این که بیوتکنولوژی میکروبی دریا راه نوینی برای پیدا کردن میکروارگانیسم‌های جدید جهت استفاده از پتانسیل‌های بالقوه آن‌ها محسوب می‌شود؛ آب‌های شور می‌توانند منبع خوبی برای تحمل فلزی میکروارگانیسم‌ها باشد (۱۲). از نانوذره‌های نقره می‌توان به‌عنوان دارو در درمان بیماری‌های پوستی مانند جوش، انواع جراحات‌ها، سوختگی‌ها،

و از لحاظ خلوص مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور اطمینان از جداسازی میکروارگانیسم‌ها با منبع دریایی علاوه بر محیط پلیت کانت آگار از محیط اختصاصی زوبل مارین آگار (هیمدیا-هند) و زوبل مارین برات (هیمدیا-هند) نیز استفاده شد.

بررسی توانایی تولید نانوذره‌های نقره توسط جدایه‌ها

از کلیه جدایه‌های به دست آمده با منبع دریایی و چند جدایه که منبع دریایی نداشتند که در مرحله غربالگری خالص‌سازی و از آن‌ها کشت جوان تهیه شده بود. سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند تهیه و به مقدار ۱ میلی‌لیتر به محیط کشت تلفیقی نوترینت-براث (مرک-آلمان) و زوبل مارین برات که به آن ۷ درصد آب و رسوب‌های دریا اضافه شده بود، تلقیح شد. کلیه محیط‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار (مدل بهداد-ایران)، دور ۱۵۰ rpm قرار داده شدند و سپس از سوپرناتانت (روماند) و بیومس (توده زیستی) رشد کرده برای تولید نانوذره‌های نقره به دو روش عمل شد. در روش اول بعد از سانتریفیوژ (مدل بهداد-ایران) محیط کشت در شرایط استریل در دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه رومانند حاصل جداسازی و به نسبت ۱ به ۵ به محلول نیترات نقره ۰/۰۰۱ مولار (فلوکا-فرانسه) تلقیح و در شرایط نوری قرار داده شد و از لحاظ تولید نانوذره‌ها مورد پایش قرار گرفتند. در روش دوم از توده زیستی به دست آمده از محیط کشت بعد از سانتریفیوژ به نسبت ۱ به ۵ به محلول نیترات نقره ۰/۰۰۱ مولار افزوده شد و نمونه در شرایط تاریکی (فویل آلومینیومی) به مدت ۴۸ ساعت و روشنایی در عرض چند ثانیه نگهداری و از لحاظ تولید نانوذره‌ها نقره مورد پایش قرار گرفتند. محلول‌هایی که دارای رنگ خرمایی بودند می‌توانند حاوی نانوذره‌های نقره باشند که برای ادامه کار و اثبات نانوذره‌ها نقره از روش‌های دستگاهی استفاده شد. از کلیه نانوذره‌های نقره تولیدی در پروژه حاضر ارزیابی‌های حساسیت ضد میکروبی به روش رقت‌سازی در مایع^۱ صورت گرفت. در تمام مراحل این واکنش از سویه *باسیلوس سرئوس* ATCC 25922 به عنوان سویه‌ای ناتوان در تولید نانوذره استفاده شد. لازم به ذکر است که میکروارگانیسم‌ها با احیا یون‌های نقره از نمک‌های نقره به فرم اتمی سبب بقا خود می‌شوند.

اندازه‌گیری جذب نوری محلول‌های حاوی نانوذره‌های نقره توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-VIS اندازه‌گیری جذب نوری محلول‌ها بعد از گذشت ۲ ساعت از زمان واکنش رومانند جدایه‌ها با نیترات نقره به تفکیک در طول موج‌های ۵۰۰-۲۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (فتونیکس ۲۰۱۵-AR-ایران) انجام و نتایج یادداشت شد.

روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز^۲ (FTIR)

این آنالیز برای محلول‌های حاوی نانوذرات نقره تولیدی که دارای پایداری بالا و رنگ خرمایی و خواص ضد میکروبی مطلوب تری انجام شد. این روش به شناسایی تعاملات بین نمک نقره و پروتئین‌ها و سایر ترکیب‌های احتمالی دخیل در تولید نانوذره‌های نقره کمک می‌کند. در این آزمون ۴ نمونه انتخاب و در دستگاه FTIR مدل تنسور ۲۷ مورد آنالیز دستگاهی قرار گرفتند.

تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی گذاره^۳ (TEM)

برای اثبات وجود نانوذره‌های نقره و هم‌چنین تعیین اندازه، شکل، آرایش و پوشش پروتئینی اطراف آن‌ها از بین کلیه نانوذره‌های نقره تولیدی فقط یک نمونه که خواص ضد میکروبی مطلوب تری داشت و در آنالیزهای دستگاهی اولیه اثبات شده بودند و برای شکل‌برداری توسط TEM به آزمایشگاه ارسال گردیدند. ابتدا محلول توسط پنبه و قیف (برای تفکیک به تر و تراکم کم‌تر) صاف و سپس محلول به مدت ۱۵ دقیقه سونیکیت شد و سپس یک قطره از نمونه بر روی صفحه‌های مسی پوشیده شده با کربن قرار داده شد تا لایه نازکی از نمونه حاصل شود و با استفاده از دستمال‌های مخصوص نمونه اضافی برداشته شد و این نمونه با TEM شکل‌برداری گردید.

شناسایی باکتری تولیدکننده نانوذره‌های نقره به روش

مولکولی

علاوه بر مشاهده‌های مورفولوژیکی و انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی از روش تعیین توالی ژن *16SrRNA* نیز جهت اثبات جنس باکتری مورد نظر استفاده شد. استخراج DNA با استفاده از کیت شرکت سیناژن (مدل: EX6071) انجام شد. پس از انتخاب پرایمرهای مناسب و بلاست^۴ نمودن آن‌ها در

^۲ - Fourier Transform Infrared Spectroscopy

^۳ - Transmission Electron Microscope

^۴ - BLAST

^۱ - Broth dilution method

و *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 29212 و *اکانیدیا آلبیکنز* ATCC1778 از بانک میکروبی دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه شدند. سوبه‌های مورد مطالعه با استفاده از محیط‌های افتراقی، انتخابی و اختصاصی و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی تأیید هویت گردیدند. آزمون تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به منظور تعیین کم‌ترین غلظت مهاری (MIC) با استفاده از روش رقت‌سازی لوله‌ای و بر اساس دستورالعمل مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) انجام گردید. به‌طور خلاصه، ابتدا محلول ذخیره با غلظت ۱۰۲۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از نانوذره تهیه و سپس، رقت‌های سریالی با طیف ۱ تا ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در لوله‌های مولر هینتون برات (مرک-آلمان) فراهم گردید. عمل تلقیح سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک فارلند به لوله‌های برات حاوی نانوذره انجام شد. پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباتور، اولین لوله‌ای که فاقد کدورت قابل مشاهده بود، به‌عنوان MIC تعیین و ثبت گردید.

یافته‌ها

کشت نمونه‌ها

در محیط پلیت کانت آگار (مرک-آلمان) در مجموع در مرحله غربال‌گری اولیه ۳۹ و در محیط کشت زوبل مارین آگار (همیدیا-هند) ۱۶ جدایه باکتریایی جداسازی و خالص شدند. انواع کلنی از نظر شکل، رنگ و نوع از نمونه‌های مختلف جدا شد. در محیط کشت تهیه‌شده بر پایه آب دریا نیز ۲۷ جدایه باکتری جدا گردید.

ارزیابی نمونه‌های با منبع دریایی و غیردریایی برای تولید نانوذره‌های نقره

نتایج ارزیابی تولید نانوذره‌های نقره توسط روماند و بیومس از جدایه‌ها با منبع دریایی و غیردریایی به شرح جدول ۲ و ۳ است.

نتایج ارزیابی تولید نانوذره‌های نقره با دستگاه اسپکتروفتومتر

برای اطمینان از تولید نانوذره‌های نقره در نمونه‌های موردنظر، جذب نوری محلول‌های به‌دست‌آمده در طول موج‌های مختلف اندازه‌گیری شد که در جدول ۴ آمده است. بدون در نظر گرفتن نمونه بیش‌ترین جذب نوری مربوط به طول موج ۴۲۰ نانومتر و کم‌ترین جذب نوری در ۵۵۰ نانومتر است.

سایت NCBI، واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر شامل ۱۲/۵ میکرو لیتر PCR master mix 5X (سینا کلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (۰/۰۵ U/μl)، MgCl₂ (۳Mm)، dNTPs (۰/۴Mm)، ۰/۸ میکرو لیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرو لیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۸/۳ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از گرادینت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۰ سیکل به‌صورت زیر انجام گرفت؛ با انتخاب برنامه مرتبط به صورت ذیل عمل گردید: گام اول واسرشت ثانویه ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵۰ ثانیه، گام دوم اتصال آغازگر ۵۵ درجه برای ۴۵ ثانیه، گام سوم بسط اولیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. در پایان، محصول‌های واکنش PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵μg/ml) الکتروفورز گردید. هم‌چنین محصول‌های PCR با استفاده از روش سانگر و توسط شرکت ژن فن اوران تعیین توالی گردید.

جدول ۱- توالی الیگونوکلوتیدی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه

پیش‌رو	
توالی الیگونوکلوتیدی (۵'→۳')	قطعه مورد نظر
F:AGAGTTTGATCCTGG CTCAG	16SrRNA
R:CGGTACCTTGTACGACTT	

رسم درخت فیلوژنتیک

بعد از توالی‌یابی و شناسایی جدایه‌ها، درخت فیلوژنتیک برای سوبه‌های برتر رسم شد (شکل ۳). هم‌ردیفی توالی ژن *16SrRNA* نمونه‌ها به‌همراه تعدادی از گونه‌های جنس *مارینوباکتر* به‌روش ماسل^۱ در برنامه مگا^۲ انجام گرفت و سپس ارتباط تبارشناسی سوبه‌ها با روش الحاق همسایگی مشخص شد. هم‌چنین درخت تبارشناختی رسم شده، توسط گونه‌ی *سراسیا/اودورینرا* سویه XY21 به‌عنوان گروه خارجی^۳، ریشه‌دار گردید.

تعیین کم‌ترین غلظت مهاری نانوذره‌ها بر برخی از باکتری‌های پاتوژن

در این مطالعه سوبه‌های *اشرشیاکلی* ATCC 25922، *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853، *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25922، *باسیلوس سرئوس* ATCC 21772

¹ -MUSCLE

² -MEGA6

³ -Out group

نتایج آنالیز تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)

در مورد محلول‌های موردنظر خصوصیت‌های بیش‌تر نانوذره‌های نقره تولیدی با استفاده از طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز از نمونه‌های مایع شفاف باکتری‌ها که با نیترا نقره ۰/۰۰۱ مولار تیمار شده بود و سپس در نور به رنگ خرمایی تغییر داده بود توسط دستگاه FTIR، جذب باندها در نواحی ذیل گزارش شد (شکل ۷-۴):

$$a''_2 = 3463, 2065, 1634, 546 \text{ cm}^{-1}$$

$$D = 3463, 2065, 1635, 547 \text{ cm}^{-1}$$

$$y_2 = 3462, 2066, 1635, 556 \text{ cm}^{-1}$$

$$y_7 = 3463, 2065, 1636, 547 \text{ cm}^{-1}$$

نتایج تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی TEM

نتایج و تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره نشان‌دهنده حضور نانوذره‌های نقره بوده که اندازه آن‌ها متغیر بوده و دارای شکل کروی و بدون چسبندگی (غیر آگریگه) به یکدیگر بوده که پوشش پروتئینی اطراف آن‌ها نیز قابل مشاهده است (شکل ۲).

شناسایی میکروارگانیسم به روش تعیین ترادف ژن

16S rRNA

شکل ژل آگارز حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA سویه‌های موردنظر در شکل ۱ آورده شده است. هم‌چنین محصول‌های PCR با استفاده از روش سانگر و توسط شرکت ژن فن آوران تعیین توالی گردید. نتایج حاصل از تعیین توالی نشان داد که با ایدینتیتی^۱ بالای ۹۸٪ این سویه احتمالاً مربوط به جنس ماریوباکتر سویه np-4 با اگزشن نامبر 1 kt763388.1^۲ است.

درخت فیلوژنتیک

درخت فیلوژنی از سویه برتر با نام ماریوباکتر سویه np-4 ترسیم گردید. ارزش بوت استرپ با بیان درصد از ۱۰۰۰ تکرار در بالای شاخه‌ها نشان داده شده است و شاخه‌های بالای ۵۰ درصد ارزش قابل استناد محسوب شد.

نتایج حاصل از آزمون سنجش حساسیت میکروبی به

نانوذرات نقره تولیدی

نتایج آزمون حساسیت میکروبی به نانوذرات نقره تولیدی در روش رقت‌سازی لوله‌ای بر سویه‌های موردنظر در جدول ۵ ذکر شده است.

بحث

تولید نانوذره‌های فلزی و نانو ساختارها به علت خواص نوری، شیمیایی، فتوشیمیایی و الکتریکی غیرمعمولی که دارند، جالب توجه است. فلزهایی مانند نقره و طلا که رزونانس پلاسمون سطحی قوی دارند بسیار حائز اهمیت هستند. ذره‌های نانو کریستالی نقره کاربردهای عمده‌ای در تشخیص‌های بیومولکولی بسیار حساس، خواص ضد میکروبی، درمان، کاتالیز و ساخت سنسورها دارند (۱۶). نانوذره‌های نقره از طریق موجودهای زنده مانند میکروارگانیسم‌ها از قبیل قارچ‌ها، باکتری‌ها، مخمرها و یا ماکروارگانیسم‌ها مانند گیاهان، جلبک‌ها و غیره سنتز می‌شود (۱۷) که استفاده از میکروارگانیسم‌های مختلف یک پروتکل کم‌هزینه و سازگار با محیط زیست برای سنتز نانوذره‌های نقره است؛ با توجه به مشکل‌های عمده‌ای که در روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای تولید نانوذره وجود دارد نیاز به روش‌هایی آسان، کم‌هزینه، ایمن، غیرسمی و سازگار با محیط‌زیست وجود دارد (۱۶). رسوب‌های دریایی به‌طور معمول حاوی یک مخزن از کربن آلی و مواد مغذی ضروری است و فرض بر این است که فعالیت‌های آنزیمی در رسوب‌های دریایی نسبت به آب دریا افزایش می‌یابد (۱۸).

در این تحقیق تولید نانوذره‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها نشان داده شده است. در مرحله اول بر روی محیط پایه پلیت کانت که درصد بالایی از میکروارگانیسم‌ها بر روی این محیط رشد می‌کنند تعداد ۳۹ کلنی خالص شد. در مرحله بعد از محیط کشت زوبل مارین آگار که محیط کشت اختصاصی برای رشد باکتری‌های دریایی است و به تقلید از آب دریا فرموله شده - است استفاده شد که تعداد ۱۶ کلنی خالص شد و از محیط کشت تهیه شده از تلفیق نوترینت براث و زوبل مارین براث با آب دریا نیز ۲۷ کلنی جدا شد.

مشکل بزرگ سنتز نانوذره‌ها بر پایه بیولوژیک، سرعت پایین آن است اما در این گونه باکتری‌ها در عرض چند ثانیه از مایع شفاف رویی و در عرض ۲۴ تا ۴۸ ساعت از توده زیستی باکتری نانوذره‌های نقره شروع به تولید و سنتز می‌کند و تغییر رنگ از زرد به قهوه‌ای یا خرمایی صورت می‌گیرد و این رنگ پایدار است و حتی بعد از گذشت ۴۰-۳۰ روز یا بیش‌تر و این نانوذره‌ها نیاز به پایدارکننده ندارد در بعضی موارد تولید نانوذره‌ها توسط عصاره گیاهان ناپایداری مشاهده می‌شود که باید توسط مواد شیمیایی یا عصاره‌های زیستی پایدار شوند

¹ - identity

² -accession number kt763388.1

غلظت کشندگی انجام گرفت که از دقت و اطمینان بیش تری برخوردار است.

تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی گذاره نشان می دهد که گستره اندازه نانوذره ها در محدوده ۸۸-۲/۱۹ نانومتر کروی^۱ و پوشش پروتئینی در اطراف آن ها است. بنابراین پروتئین های باکتریایی نه تنها عامل احیای یون نقره اند بلکه یک سری از این پروتئین ها اطراف نانوذره ها را فرا گرفته اند و عامل پایداری و مانع چسبندگی و تجمع^۲ نانوذره ها می- گردند و این ذره ها حتی بعد از گذشت ۵۰-۴۰ روز پایداری^۳ خود را حفظ کردند. مزیت ارزیابی باکتری های جدا شده از خلیج فارس در تولید نانوذره های نقره در این است که در این خصوص قبل کاری صورت نگرفته است.

نتیجه گیری

به طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که باکتری- های جدا شده با منبع دریایی و درصد بالایی از باکتری های غیردریایی از خلیج فارس قادر به تولید نانوذره های نقره به- صورت درون و برون سلولی هستند که این عمل با استفاده از آنزیم ها و پروتئین ها که باکتری ها به محیط ترشح می کنند، صورت می گیرد و نیاز به استخراج نداشته و بدون داشتن هزینه و مشکل های ناشی از استخراج می توانند مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

از کلیه مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد (تهران) که در انجام کارهای آزمایشگاهی و تهیه نمونه های این تحقیق کمال همکاری و مساعدت لازم را مبذول فرموده اند، سپاسگزاری فراوان می- گردد.

(۲۲). نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج حاصل از پژوهش Malarcodi و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۱۹) و Sechardi و همکاران در سال ۲۰۱۲ کامل مشابه بود (۱۹). طیف های اسپکتوفتومتری UV-Vis به طور کامل نشان دهنده افزایش ارتعاش های پلاسمون رزونانس سطحی در طول موج ۴۲۰ نانومتر است که برای همه سویه ها طول موج ۴۲۰ نانومتر اوج پیک نانوذره ها است که نشان دهنده پیک نانوذره های نقره است که با نتایج کار حاصل از پژوهش Shivakrishna و همکاران در هندوستان در سال ۲۰۱۳ و Sechardi و همکاران در سال ۲۰۱۲ به طور کامل مشابه بوده است (۲۱،۲۰).

در بین نمونه های دریایی ۴ نمونه که رنگ خرمایی پررنگ تر داشتند و سرعت بهتر و بیش تری در تولید نانوذره های نقره نشان دادند برای آنالیز FTIR انتخاب شدند. نتایج حاصل از پیک اثبات کننده حفظ ساختار دوم پروتئین ها پس از برهم کنش با نانوذره ها است. بنابراین پروتئین های حاصل از باکتری ها نه تنها عامل احیای یون نقره اند، بلکه این پروتئین ها اطراف نانوذره ها را فرا گرفته اند و مانع از تجمع و آگومره شدن نانوذره ها شده اند که این نتایج با نتایج Dee pa و همکاران در هندوستان در سال ۲۰۱۳ (۲۲) و Yokesh Babu و همکاران در سال ۲۰۱۳ در هندوستان (۲۳) مشابهت و همخوانی داشت.

پس از ظهور و افزایش مقاومت باکتری ها و دیگر میکروارگانیسم ها به آنتی بیوتیک ها تحقیق های بسیاری در سطح آزمایشگاهی برای کشف مواد جایگزین آنتی بیوتیک ها انجام شده است. نقره در فرم یونی یا در ابعاد خاص خاصیت ضد میکروبی بالایی داشته و می تواند برای کنترل میکروب های بیماری زا نسبت به آنتی بیوتیک ها کاربرد داشته باشد (۲۴). در تحقیق اخیر اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا در رقت های ۱۶ mg/ml / ۱ به عنوان کم ترین غلظت مهاری، کاندیدا / لیکنز رقت ۱/۸ mg/ml به عنوان کم ترین غلظت مهاری، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس ارئوس رقت ۱/۴ mg/ml به عنوان کم ترین غلظت مهاری در نظر گرفته شد و نتیجه اثر ضد میکروبی نانوذره های سنتز شده توسط باکتری که با نتایج حاصل از کار Yokesh Babu و همکاران (۲۳) در سال ۲۰۱۳ هم خوانی داشت که تحقیق های مشابه بر روی دیسک های دیفیوژن این تست انجام شده بود ولی این تحقیق بر روش رقت سازی لوله ای و تعیین کم ترین غلظت مهاری و کم ترین

^۱ - Spherical

^۲ - Aggregation

^۳ - Stability

جدول ۲- نتایج تولید نانوذره‌های نقره تولیدی توسط رومانند و بیومس جدایه‌های به‌دست آمده

نام جدایه	مایع رویی در نور تولید رنگ خرمایی	مایع رویی در تاریکی	بیومس در نور	بیومس در تاریکی
T ₂	+	-	-	-
S ₁	+	-	-	-
a ₁	+	-	-	-
a ₁ [#]	+	-	-	-
a ₁ ^{##}	+	-	-	+
D	+	-	-	+
g ^{''} ₁	+	-	-	-
Y ₂	+	-	-	+
Y ₇	+	-	+	+

جدول ۳- نتایج تولید نانوذره‌های نقره تولیدی توسط رومانند جدایه‌های با منبع غیر دریایی

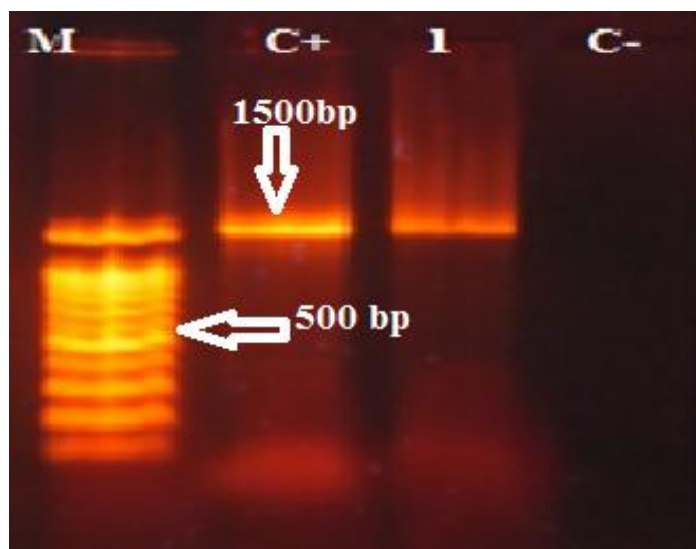
نام جدایه	نمونه‌ها رشد یافته
g ₃	+
F ₁	+
N ₁	+
D ₂	+
B ₈	+

جدول ۴- نتایج اندازه‌گیری جذب نوری نانوذره‌های سنتز شده در طول موج‌های مختلف

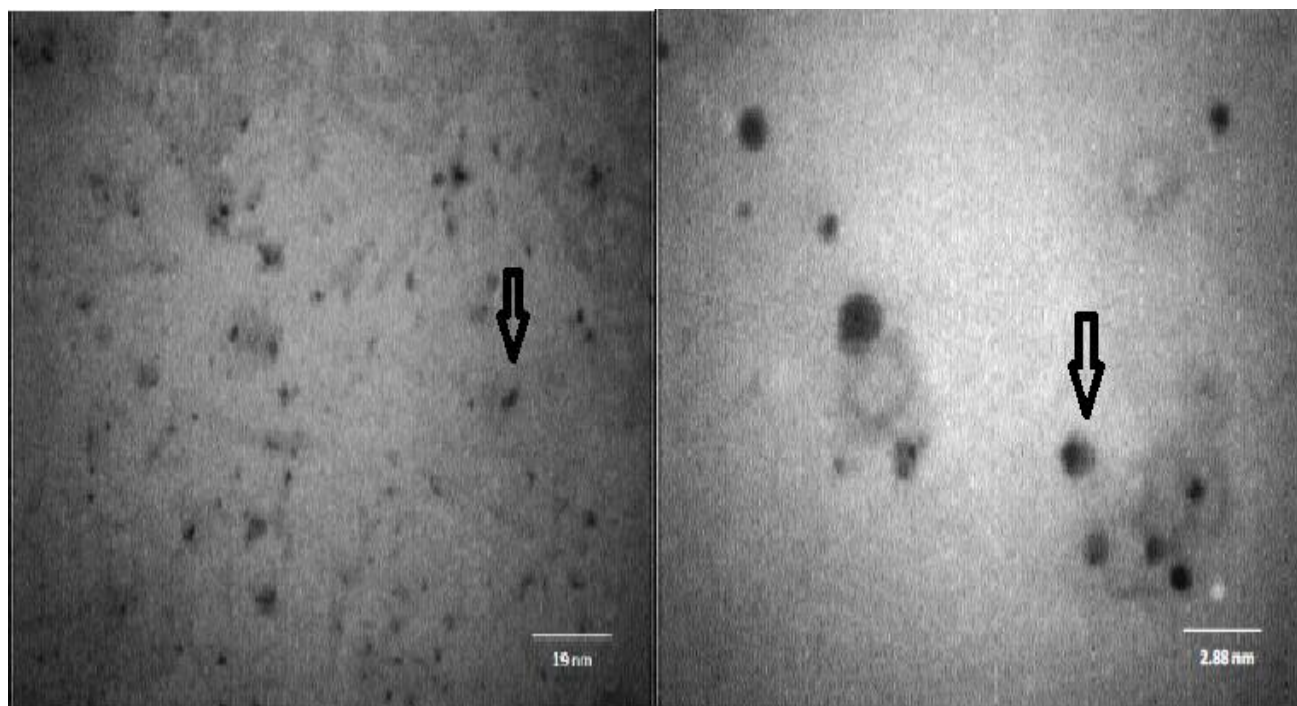
طول موج (nm)	۵۵۰	۵۰۰	۴۵۰	۴۲۰	۴۰۰	۳۵۰	نام جدایه
T ₂	۰/۴۵۲	۰/۶۳۴	۰/۷۹	۰/۸۳۰	۰/۶۷۴	۰/۶۴۸	
S ₁	۰/۶۵۶	۰/۷۷۴	۰/۸۴۵	۰/۸۵۵	۰/۶۸۴	۰/۶۵۶	
a ₁	۰/۳۷۰	۰/۵۱۴	۰/۶۵۰	۰/۷۲۲	۰/۶۲۲	۰/۶۴۲	
a ₁ [#]	۰/۴۸۰	۰/۶۲۲	۰/۷۵۶	۰/۸۰۸	۰/۶۶۶	۰/۶۵۶	
a ₁ ^{##}	۰/۴۳۸	۰/۶۶۹	۰/۸۲۰	۰/۸۴۵	۰/۶۸۰	۰/۶۵۰	
D	۰/۴۴۲	۰/۶۲۶	۰/۷۸۰	۰/۸۲۰	۰/۶۶۸	۰/۶۴۴	
g ^{''} ₁	۰/۷۹۸	۰/۷۹۶	۰/۸۳۵	۰/۸۵۵	۰/۶۸۴	۰/۶۵۸	
Y ₂	۰/۳۹۶	۰/۵۹۸	۰/۷۶۴	۰/۸۰۸	۰/۶۶۲	۰/۶۴۰	
Y ₇	۰/۴۴۰	۰/۶۴۵	۰/۸۶۵	۰/۸۷۵	۰/۶۹۰	۰/۶۵۸	

جدول ۵- حداقل غلظت ممانعت کنندگی نانوذره‌ها بر سویه‌های مورد نظر

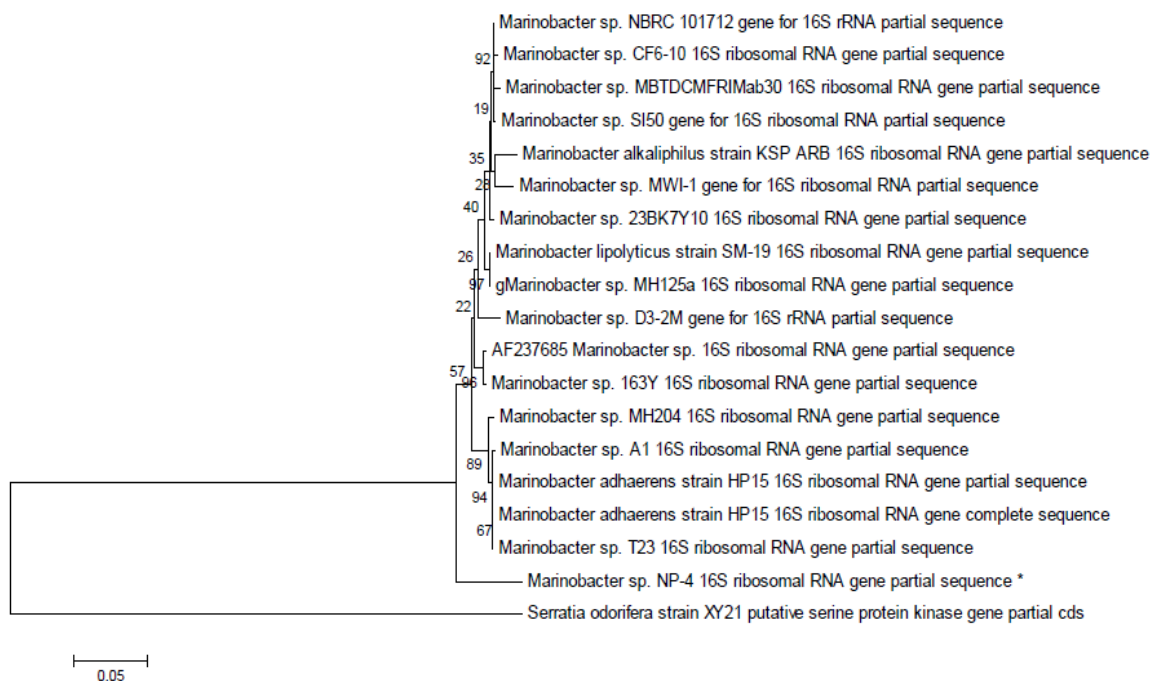
نام میکروارگانیسم	حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) (میلی گرم بر میلی لیتر)
کاندیدا آلبیکنز	۱/۸
اشرشیا کلی	۱/۱۶
انتروکوکوس فکالیس	۱/۴
سودوموناس آئروژینوزا	۱/۱۶
باسیلیوس سرئوس	۱/۴
استافیلوکوکوس ارئوس	۱/۴



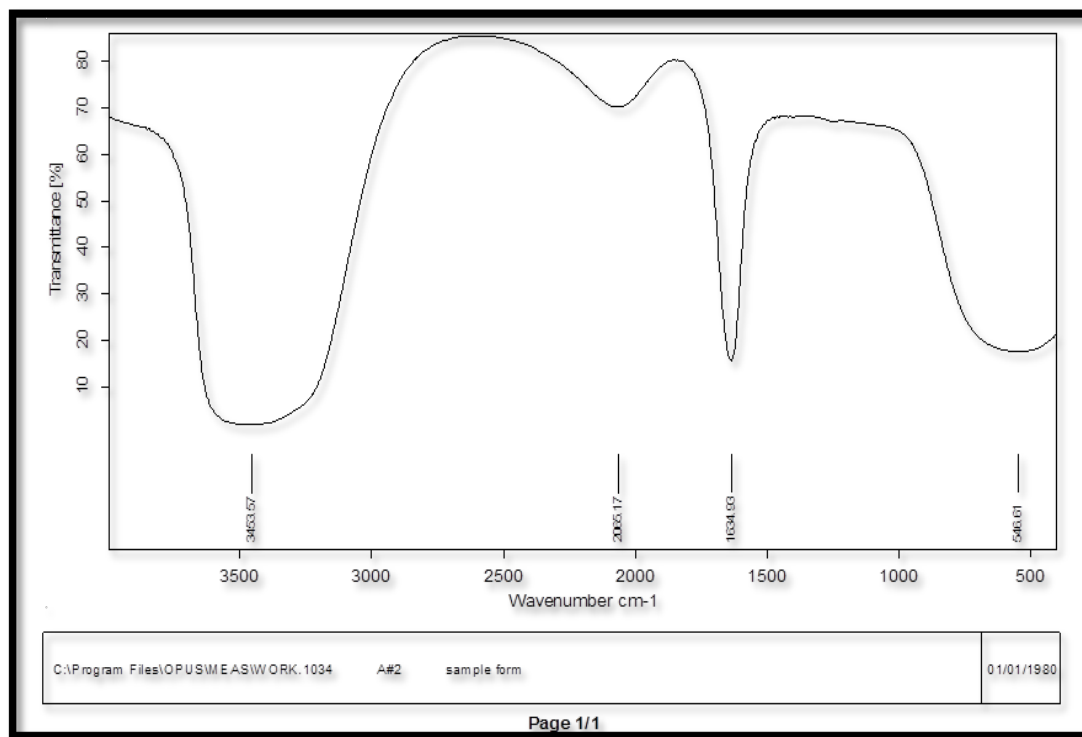
شکل ۱- ژل آگارز حاصل از تکثیر ژن *16S rRNA* ایزوله‌های مورد نظر. باند M؛ سایز مارکر DNA size marker ۱۰۰ bp (فرمنتاز)، باند C+؛ کنترل مثبت (سودوموناس آئروژینوزا ATCC 15442)، باند ۱؛ ایزوله مورد نظر با طول باند ۱۵۰۰ bp، باند C-؛ کنترل منفی (آب مقطر)



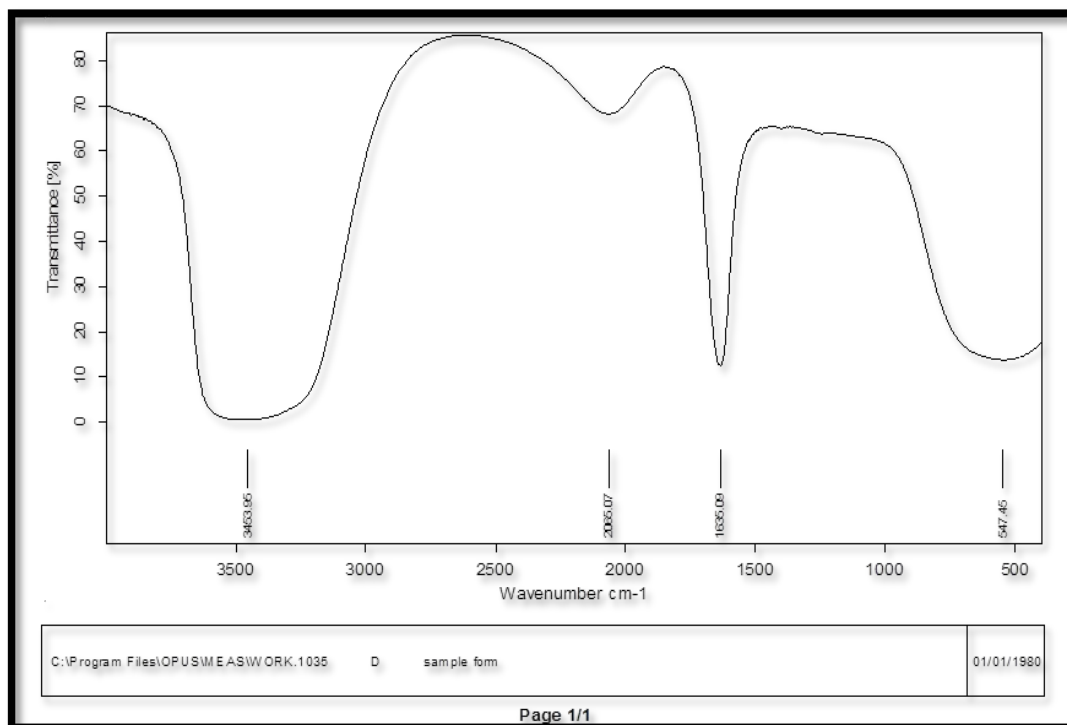
شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی TEM مربوط به نانوذره‌های سنتز شده در دو مقیاس (کروی و بدون چسبندگی)



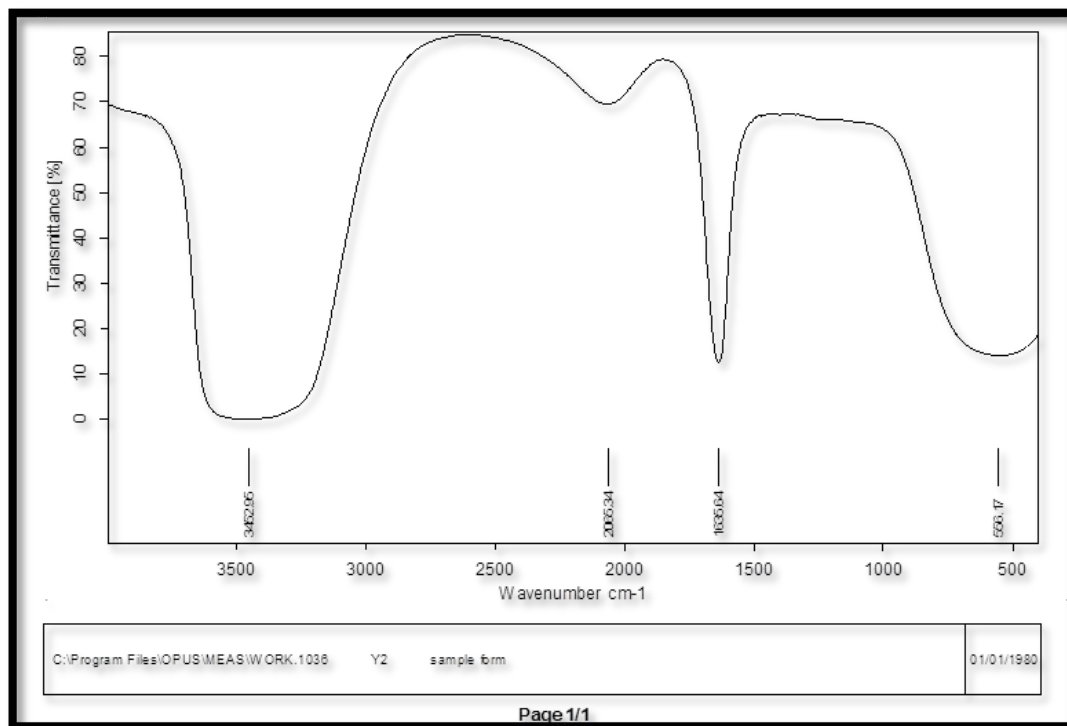
شکل ۳- درخت فیلوژنی از سویه برتر با نام مارینوباکتر *np-4*



شکل ۴- طیف جذبی FTIR از نمونه a''_2

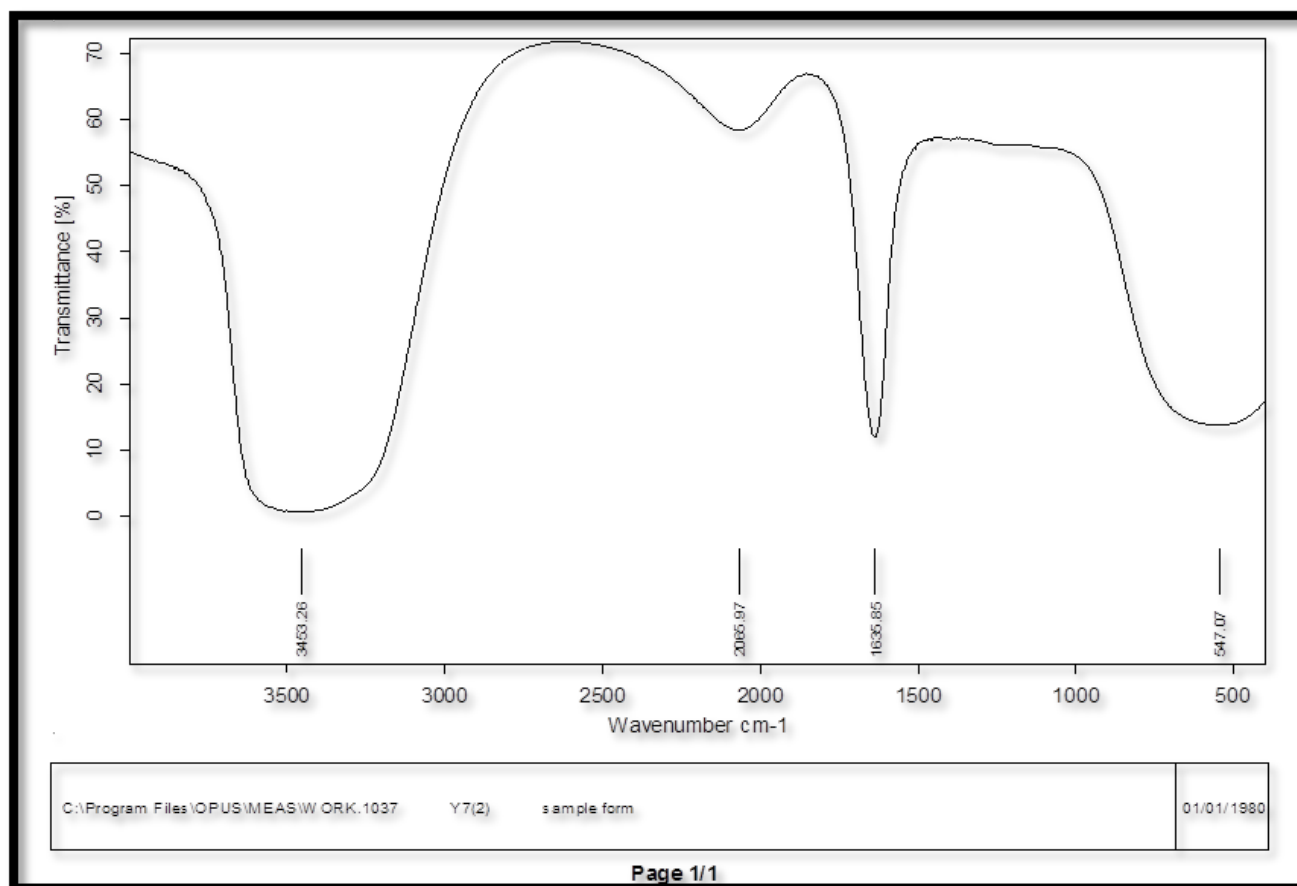


شکل ۵- طیف جذبی FTIR از نمونه d



شکل ۶- طیف جذبی FTIR از نمونه y2





شکل ۷- طیف جذبی FTIR از نمونه Y7

- 1- Moharrer S., Mohammadi B., Gharamohammadi RA, Yargoli M. Biological synthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus flavus*, isolated from soil of Ahar copper mine. *Indi J sci tech.* 2012. 5(S3):2443-4.
- 2-Souza GIH, Macato PD, Duran N, Esposito E. Utilization of *Fusarium oxysporum* in the biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activities. In: *Proceed .IX Nation Meet . Enviro Micrib*, 2004:25.
- 3- Sharma VK, Yangard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci*, 2009, 145(1-2):83-96.
- 4- Haefeli C, Franklin C, Hardy K. Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from a silver mine. *J Bacter*, 1984. 158(1):389-92.
- 5- Mandal D, Bolander ME, Mukhopadhyay D, Sarkar G, Mukherjee P. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Appl Microb Biotech*, 2006. 69(5):485-92.
- 6- Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *J Nanopart Res*, 2008. 10:507-17.
- 7- Hamedi S, Shojaosadati SA, Shokrollahzadeh S, Hashemi-Najaf Abadi S. Controlled Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Culture Supernatant of Filamentous Fungus. *Iran. J Chem. Chemi. Engin (IJCCE)*. 2018; 36(5):33-42.
- 8- Pugazhenthiran N, Anandan S, Kathiravan G, Prakash NKU, Crawford S, Ashokkumar M. Microbial synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus sp.* *J .Nanopart Res*, 2009, 11(7):1811.
- 9- Penesyan A., Marshall-Jones Z, Holmstrom C., Kjelleberg S., Egan S. Antimicrobial activity observed among cultured marine epiphytic bacteria reflects their potential as a source of new drugs. *FEMS microb eco*, 2009, 69(1):113-24.
- 10- Laport M., Santos O., Muricy G. Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. *Current pharmac. biotech*, 2009. 10(1):86-105.
- 11- Gandhimathi R., Arunkumar M., Selvin J., Thangavelu T., Sivaramakrishnan S., Kiran GS, et al. Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes. *J de Myco.Medi/J Medi. Myco*, 2008. 18(1):16-22.
- 12- Mahapatra SS, Karak N. Silver nanoparticles in hyperbranched polyamine: Synthesis, characterization and antibacterial activity. *Mater Chem Phys*, 2008. 112(3):1114-9.
- 13- Sondi I, Salopek- Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*, 2004, 275(1):177-82.
- 14- Kannan N., Selvaraj S., Murty RV. Microbial production of silver nanoparticles. *Digest J nanomater. biostruct*, 2010. 5(1):135-40.
- 15- Maiti S, Krishnan D., Barman G., Ghosh SK, Laha JK. Antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from *Lycopersicon esculentum* extract. *J analytsci. tech*, 2014. 5(1):40.
- 16- Rahimi Z, Yousefzadi M, Noori A, Akbarzadeh A. Synthesis of Silver Nanoparticles Using Three Marine Macro Algae from the Persian Gulf. *JOC*, 2014, 5 (19):71-78.
- 17- Ramezani F, Kazemi B, Jebali A. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Leishmania sp.* *New Cell. MoleculBiotech J*, 2013, 3(9):107-11.

- 18- Izadpanah Qeshmi F. avadpour S., Malekzadeh, K., Tamadoni Jahromi S., Rahimzadeh M. Persian Gulf is a Bioresource of Potent L-Asparaginase Producing Bacteria: Isolation & Molecular Differentiating. *Int J. Environ. Res.*, 2014. 8(3):813-818.
- 19- Malarkodi C., Rajeshkumar S., Paulkumar K., Gnanajobitha G., Vanaja M., Annadurai G. Bacterial synthesis of silver nanoparticles by using optimized biomass growth of *Bacillus sp.* *J Nanosci Nanotech*, 2013. 3:26-32.
- 20- Shivakrishna P, Krishna MRPG, Charya MS. Synthesis of silver nano particles from marine bacteria *Pseudomonas aerogenosa*. *Octa J Biosci*, 2013, 1(2).
- 21- Seshadri S, Prakash A, Kowshik M. Biosynthesis of silver nanoparticles by marine bacterium, *Idiomarina sp.* PR58-8. *Bullet. Mate Sci*, 2012, 35(7):1201-5.
- 22- Dee pa S.Kanimozhi K.Panneerselvam Anti-Microbial activity of extracellularly Synthesized silver nanoparticles from marine derived actinomyces. *Intern , Current Microbio . Appl Sci*, 2013. 2 (9): 223-230
- 23- YokeshBabu M, JanakiDevi V, Ramakritinan C, Umarani R, Nagarani N, Kumaraguru A. Biosynthesis of silver nanoparticles from seaweed associated marine bacterium and its antimicrobial activity against UTI pathogens. *Int J Curr Microb Appl Sci*, 2013, 2(8):155-68.
- 24- Rajeshkumar S, Kannan C, Annadurai G. Synthesis and characterization of antimicrobial silver nanoparticles using marine brown seaweed *Padina tetrastromatica*. *Drg Invent Today*, 2012, 4(10):511-3.
- 25- Wypij M, Czarnecka J, Świecimska M, Dahm H, Rai M, Golinska P. Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of biogenic silver nanoparticles synthesized from *Streptomyces xinghaiensis* OF1 strain. *Wor. J Microb. Biotech.* 2018; 34(2):23-33.