



Scan online to view this article

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

Marzieh Khodaverdi Tajabadi¹, Babak Kheyrkhah^{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: babakkheirkhah@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 براث، سوپر ناتانت 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 ناتانت 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

زیستی علاوه بر ارزان بودن و عدم نیاز به تجهیزات گران قیمت و به کارگیری روش های آسان و در نظر گرفتن این نکته که از لحاظ پایداری نسبت به روش های شیمیایی و فیزیکی از پایداری بالاتری برخوردار خواهند بود، به مرور جایگزین روش های فوق خواهند شد (۵). از طرفی توسعه مقاومت های آنتی بیوتیکی علیه میکروارگانیسم ها به یک مشکل تبدیل شده است و با توجه به این که حدود ۷۰ درصد از اکوسیستم های کره زمین را آب ها پوشانده اند و دارای تنوع عظیم میکروبی هستند؛ میکروارگانیسم های آب شور کم تر مورد توجه قرار گرفته اند (۶). در سال های اخیر جستجو برای منابع بالقوه از تحمل فلزی میکروارگانیسم ها، قارچ ها، سیانو باکتری ها و جلبک های آب شور برای سنتز نانوذره های فلزی کم تر بوده است. در این روش از گیاهان و میکروارگانیسم هایی مانند باکتری ها، قارچ ها، مخمرها و اکتینومیسست ها جهت تولید نانوذره ها استفاده می شود. هنگامی که میکروارگانیسم ها در معرض نمک های فلزی قرار می گیرند، با استفاده از آنزیم های خاص مانند: $NADH$ ردوکتاز و یا نیترات ردوکتاز یون های فلزی را احیا و نانوذره ها را به صورت داخل سلولی و یا خارج سلولی تولید می کنند (۷). باکتری ها در مقایسه با قارچ ها به دلیل کاربرد آسان تر مورد توجه گرفته اند. از تشکیل مواد بیولوژیکی معدنی توسط باکتری ها به تازگی گزارش هایی ارائه گردیده است از جمله: تشکیل نانوکریستال های لانتیوم توسط باکتری *Sodomonas astrohalophilus* و *Thiobacillus* در محیط حاوی نیترات لانتیوم است. میزان مقاومت باکتری به یون های فلزی و تشکیل ذره های معدنی به ترکیب های محیط رشد و ظرفیت جذب سلول ها برای جذب یون های فلزی سنگین وابسته است. *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* و *تیوباسیلوس تیواکسیدانس* قادر به فروشویی سولفیدهای معدنی و تولید نانوذره های نقره است. یکی از مثال های باکتری های تجمع دهنده فلزات، *Sodomonas* استاتزری است که قادر به تولید نانوذره های نقره کم تر از ۴۰۰ نانومتر است. با توجه به خاصیت ضد میکروبی نقره بایستی مکانیسم هایی در باکتری *Sodomonas* استاتزری وجود داشته باشد که سبب مقاومت این باکتری به نقره است (۸، ۹، ۱۰، ۱۱). با توجه به این که بیوتکنولوژی میکروبی دریا راه نوینی برای پیدا کردن میکروارگانیسم های جدید جهت استفاده از پتانسیل های بالقوه آن ها محسوب می شود؛ آب های شور می توانند منبع خوبی برای تحمل فلزی میکروارگانیسم ها باشد (۱۲). از نانوذره های نقره می توان به عنوان دارو در درمان بیماری های پوستی مانند جوش، انواع جراحات ها، سوختگی ها،

بیماری های باکتریایی، بیماری های قارچی، بیماری های گوارشی، بیماری های عفونی و بیماری های جنسی استفاده کرد. در مواد دندانی، نانوذره های نقره با قطر ذره های اولیه کوچک تر از ۴۰ نانومتر به عنوان یک ضد باکتری در طول فرآیند پلی مریزاسیون استفاده می شوند (۱۳). نانوذره های نقره با اتصال به گلیکوپروتئین ۱۲۰ کیلودالتونی که در سطح ویروس ایدز قرار دارد مانع از چسبیدن ویروس ایدز به سلول های زنده می شود. دانشمندان در حال حاضر مشغول ساختن ماده ای با استفاده از این نانوذره ها برای پیشگیری از ایدز هستند (۱۴، ۱۵). در ایران تولید نانوذره های نقره با استفاده از میکروب های آب شور مورد بررسی قرار نگرفته لذا لزوم توجه به پتانسیل باکتری های مزوفیل جداسازی شده خلیج فارس احساس شده و در پژوهش حاضر این پتانسیل در مقیاس آزمایشگاهی بررسی گردید؛ لذا در این مطالعه به جداسازی باکتری های مزوفیل هوازی دارای توانمندی تولید نانوذره های نقره از آب های شور خلیج فارس پرداخته شد و سویه های برتر شناسایی و معرفی گردیدند.

روش کار

نمونه برداری از آب دریا و جداسازی باکتری ها

در این مطالعه توصیفی-مقطعی که در یک بازه زمانی ۸ ماهه از ابتدای اردیبهشت لغایت انتهای آذر ۱۳۹۶ انجام گردید، نمونه آب و رسوب ها از سواحل و مناطق مختلف خلیج فارس از جمله ساحل بندرلنگه، ساحل شهر بندرعباس، ساحل میشین، جزیره قشم و جزیره هرمز در بطری های استریل درب پیچ دار جمع آوری شد و با رعایت شرایط سرمایی ۵-۲ درجه سانتی گراد در جعبه یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه، از کلیه نمونه ها در شرایط استریل رقت های سریالی در محلول رینگر (شرکت فرآورده های تریقی و دارویی- ایران) تهیه شد و از رقت های تهیه شده در شرایط استریل مقدار ۰/۲ میلی لیتر در سطح محیط کشت پلیت کانت آگار (مرک-آلمان) ریخته شد و کشت سطحی انجام شد و محیط های کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند (انکوباتور مدل بهداد-ایران) و سپس از لحاظ رشد و عدم رشد مورد پایش قرار گرفتند. براساس خصوصیت های ظاهری، باکتری های رشد کرده انتخاب و در سطح محیط های کشت پلیت کانت آگار به صورت خطی برای گرفتن کلنی خالص کشت داده شد و پس از آن در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرم خانه گذاری شدند

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 روماندها 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 اسپکتروفتومتر UV-VIS اندازه‌گیری جذب نوری محلول‌ها بعد از گذشت ۲ ساعت از زمان واکنش روماندها با نیترات نقره به تفکیک در طول موج‌های ۵۰۰-۲۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (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

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) و 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 گراداینت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۰ سیکل به صورت زیر انجام گرفت؛ با انتخاب برنامه مرتبط به صورت ذیل عمل گردید: گام اول واسرشت ثانویه ۹۴ درجه سانتی گراد ۵۰ ثانیه، گام دوم اتصال آغازگر ۵۵ درجه برای ۴۵ ثانیه، گام سوم بسط اولیه ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۲ دقیقه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. در پایان، محصول های واکنش PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵μg/ml) الکتروفورز گردید. هم چنین محصول های PCR با استفاده از روش سانگر و توسط شرکت ژن فن اوران تعیین توالی گردید.

جدول ۱- توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه

پیش رو	
توالی الیگونوکلئوتیدی (۵'→۳')	قطعه مورد نظر
F:AGAGTTTGATCCTGG CTCAG R:CGGTACCTTGTACGACTT	16SrRNA

رسم درخت فیلوژنتیک

بعد از توالی یابی و شناسایی جدایه ها، درخت فیلوژنتیک برای سویه های برتر رسم شد (شکل ۳). هم ردیفی توالی ژن *16SrRNA* نمونه ها به همراه تعدادی از گونه های جنس *مارینوباکتر* به روش ماسل^۱ در برنامه مگا^۲ انجام گرفت و سپس ارتباط تبارشناسی سویه ها با روش الحاق همسایگی مشخص شد. هم چنین درخت تبارشناختی رسم شده، توسط گونه ی *سر/شیا/اودورینفر/سویه* XY21 به عنوان گروه خارجی^۳، ریشه دار گردید.

تعیین کمترین غلظت مهاری نانوذره ها بر برخی از باکتری های پاتوژن

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

و *انتروکوکوس فکالیس* ATCC 29212 و *آلبیکنز* ATCC1778 از بانک میکروبی دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه شدند. سویه های مورد مطالعه با استفاده از محیط های افتراقی، انتخابی و اختصاصی و با استفاده از تست های بیوشیمیایی تأیید هویت گردیدند. آزمون تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به منظور تعیین کمترین غلظت مهاری (MIC) با استفاده از روش رقت سازی لوله ای و بر اساس دستورالعمل مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) انجام گردید. به طور خلاصه، ابتدا محلول ذخیره با غلظت ۱۰۲۴ میلی گرم در میلی لیتر از نانوذره تهیه و سپس، رقت های سریالی با طیف ۱ تا ۵۱۲ میلی گرم در میلی لیتر در لوله های مولر هینتون برات (مرک- آلمان) فراهم گردید. عمل تلقیح سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک فارلند به لوله های برات حاوی نانوذره انجام شد. پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباتور، اولین لوله ای که فاقد کدورت قابل مشاهده بود، به عنوان MIC تعیین و ثبت گردید.

یافته ها

کشت نمونه ها

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

ارزیابی نمونه های با منبع دریایی و غیردریایی برای تولید نانوذره های نقره

نتایج ارزیابی تولید نانوذره های نقره توسط روماند و بیومس از جدایه ها با منبع دریایی و غیردریایی به شرح جدول ۲ و ۳ است.

نتایج ارزیابی تولید نانوذره های نقره با دستگاه اسپکتروفتومتر

برای اطمینان از تولید نانوذره های نقره در نمونه های موردنظر، جذب نوری محلول های به دست آمده در طول موج های مختلف اندازه گیری 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.

¹ -MUSCLE

² -MEGA6

³ -Out group

نتایج آنالیز تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)

در مورد محلول های موردنظر خصوصیت های بیش تر نانوذره های نقره تولیدی با استفاده از طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز از نمونه های مایع شفاف باکتری ها 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 نشان دهنده حضور نانوذره های نقره بوده که اندازه آن ها متغیر بوده و دارای شکل کروی و بدون چسبندگی (غیر آگریگه) به یکدیگر بوده که پوشش پروتئینی اطراف آن ها نیز قابل مشاهده است (شکل ۲).

شناسایی میکروارگانیسم به روش تعیین ترادف ژن

16S rRNA

شکل ژل آگارز حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA سویه های موردنظر در شکل ۱ آورده شده است. هم چنین محصول های PCR با استفاده از روش سانگر و توسط شرکت ژن فن آوران تعیین توالی گردید. نتایج حاصل از تعیین توالی نشان داد که با ایدنتیتی^۱ بالای ۹۸٪ این سویه احتمالاً مربوط به جنس ماریوباکتر سویه np-4 با اگرشن 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 شاخه ها نشان داده شده است و شاخه های 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 رقت سازی لوله ای بر سویه های موردنظر در جدول ۵ ذکر شده است.

بحث

تولید نانوذره های فلزی و نانو ساختارها به علت خواص نوری، شیمیایی، فتوشیمیایی و الکتریکی غیر معمولی که دارند، جالب توجه است. فلزهایی مانند نقره و طلا که رزونانس پلاسمون سطحی قوی دارند بسیار حائز اهمیت هستند. ذره های نانو کریستالی نقره کاربردهای عمده ای در تشخیص های بیومولکولی بسیار حساس، خواص ضد میکروبی، درمان، کاتالیز و ساخت سنسورها دارند (۱۶). نانوذره های نقره از طریق موجودهای زنده مانند میکروارگانیسم ها از قبیل قارچ ها، باکتری ها، مخمرها و یا ماکروارگانیسم ها مانند گیاهان، جلبک ها و غیره سنتز می شود (۱۷) که استفاده از میکروارگانیسم های مختلف یک پروتکل کم هزینه و سازگار با محیط زیست برای سنتز نانوذره های نقره است؛ با توجه به مشکل های عمده ای که در روش های فیزیکی و شیمیایی برای تولید نانوذره وجود دارد نیاز به روش هایی آسان، کم هزینه، ایمن، غیرسمی و سازگار با محیط زیست وجود دارد (۱۶). رسوب های دریایی به طور معمول حاوی یک مخزن از کربن آلی و مواد مغذی ضروری است و فرض بر این است که فعالیت های آنزیمی در رسوب های دریایی نسبت به آب دریا افزایش می یابد (۱۸).

در این تحقیق تولید نانوذره ها توسط میکروارگانیسم ها نشان داده شده است. در مرحله اول بر روی محیط پایه پلیت کانت که درصد بالایی از میکروارگانیسم ها بر روی این محیط رشد می کنند تعداد ۳۹ کلنی خالص شد. در مرحله بعد از محیط کشت زوبل مارین آگار که محیط کشت اختصاصی برای رشد باکتری های 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 نانوذره ها بر پایه بیولوژیک، سرعت پایین آن است اما در این گونه باکتری ها در عرض چند ثانیه از مایع شفاف رویی و در عرض ۲۴ تا ۴۸ ساعت از توده زیستی باکتری نانوذره های نقره شروع به تولید و سنتز می کند و تغییر رنگ از زرد به قهوه ای یا خرمایی صورت می گیرد و این رنگ پایدار است و حتی بعد از گذشت ۴۰-۳۰ روز یا بیش تر و این نانوذره ها نیاز به پایدار کننده ندارد در بعضی موارد تولید نانوذره ها توسط عصاره گیاهان ناپایداری مشاهده می شود که باید توسط مواد شیمیایی یا عصاره های 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 Yokes 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 /شرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا/ در رقت- های ۱۶ mg/ml /به عنوان کم ترین غلظت مهاری، کاندیدا/ /لبیکنز رقت ۱/۸ mg/ml به عنوان کم ترین غلظت مهاری، باسیلوس سرئوس و /ستافیلوکوکوس 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 Yokes Babu و همکاران (۲۳) در سال ۲۰۱۳ همخوانی 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 روماند 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 روماند جدایه‌های با منبع غیر دریایی

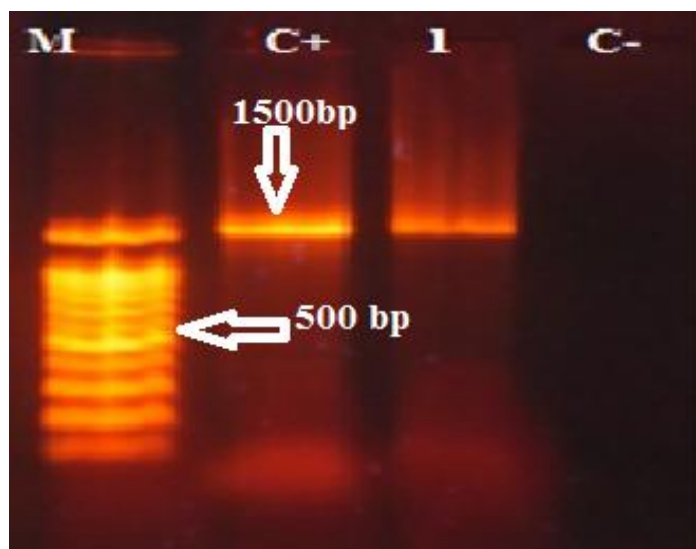
نام جدایه	نمونه‌ها رشد یافته
g ₃	+
F ₁	+
N ₁	+
D ₂	+
B ₈	+

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

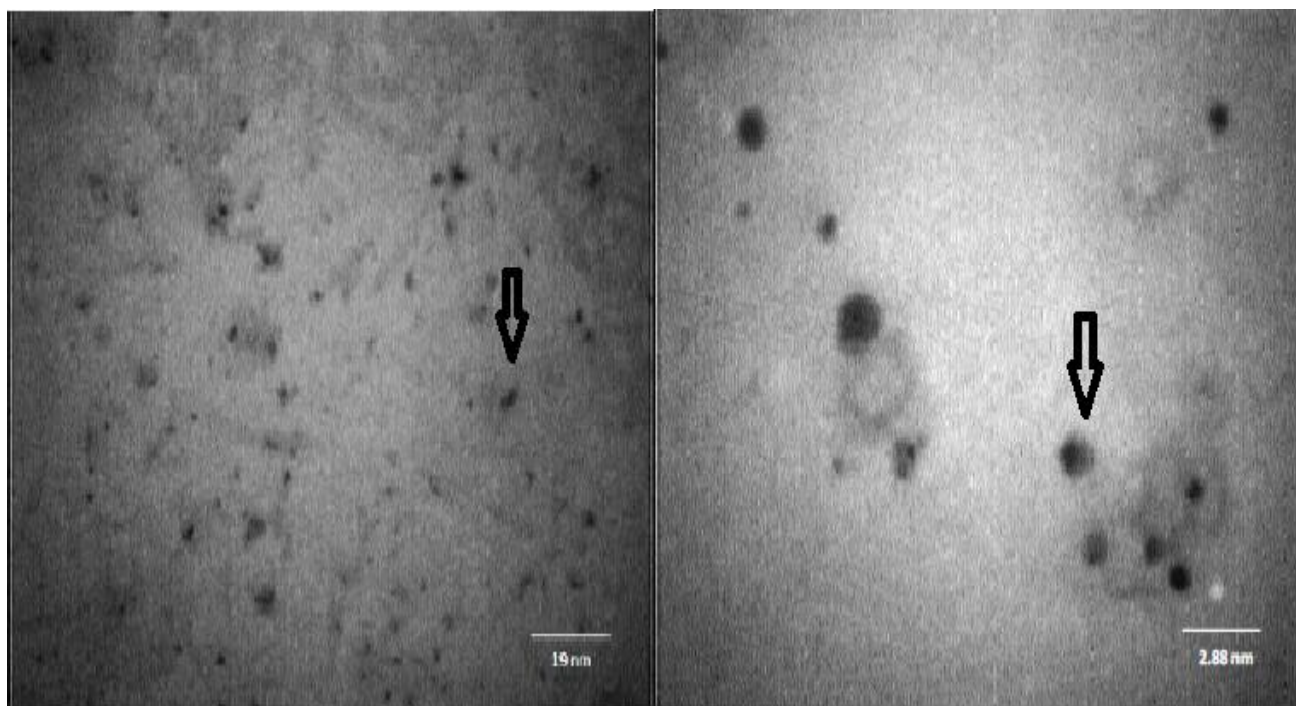
طول موج (nm)	۳۵۰	۴۰۰	۴۲۰	۴۵۰	۵۰۰	۵۵۰
نام جدایه						
T ₂	۰/۶۴۸	۰/۶۷۴	۰/۸۳۰	۰/۷۹	۰/۶۳۴	۰/۴۵۲
S ₁	۰/۶۵۶	۰/۶۸۴	۰/۸۵۵	۰/۸۴۵	۰/۷۷۴	۰/۶۵۶
a ₁	۰/۶۴۲	۰/۶۲۲	۰/۷۲۲	۰/۶۵۰	۰/۵۱۴	۰/۳۷۰
a ₁ [#]	۰/۶۵۶	۰/۶۶۶	۰/۸۰۸	۰/۷۵۶	۰/۶۲۲	۰/۴۸۰
a ₁ ^{##}	۰/۶۵۰	۰/۶۸۰	۰/۸۴۵	۰/۸۲۰	۰/۶۶۹	۰/۴۳۸
D	۰/۶۴۴	۰/۶۶۸	۰/۸۲۰	۰/۷۸۰	۰/۶۲۶	۰/۴۴۲
g ["] ₁	۰/۶۵۸	۰/۶۸۴	۰/۸۵۵	۰/۸۳۵	۰/۷۹۶	۰/۷۹۸
Y ₂	۰/۶۴۰	۰/۶۶۲	۰/۸۰۸	۰/۷۶۴	۰/۵۹۸	۰/۳۹۶
Y ₇	۰/۶۵۸	۰/۶۹۰	۰/۸۷۵	۰/۸۶۵	۰/۶۴۵	۰/۴۴۰

جدول ۵- حداقل غلظت ممانعت کنندگی نانوذره ها بر سویه های مورد نظر

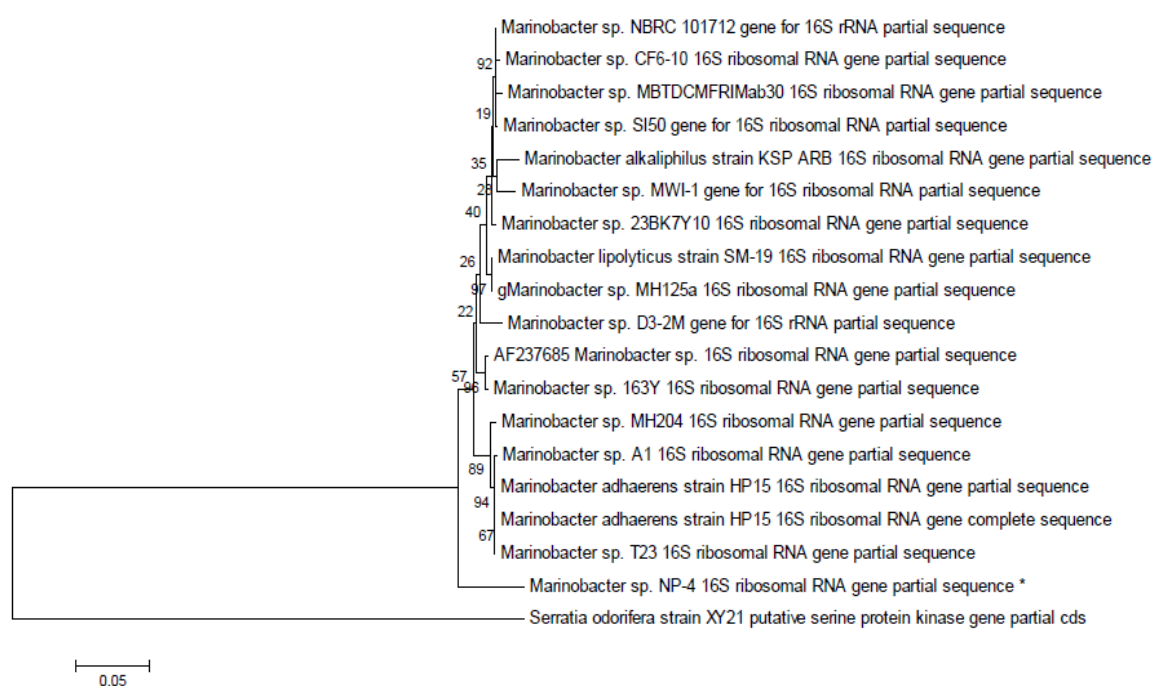
نام میکروارگانیسم	حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) (میلی گرم بر میلی لیتر)
کاندیدا آلبیکنز	۱/۸
اشریشیا کلی	۱/۱۶
انتروکوکوس فکالیس	۱/۴
سودوموناس آئروژینوزا	۱/۱۶
باسیلوس سرئوس	۱/۴
استافیلوکوکوس ارئوس	۱/۴



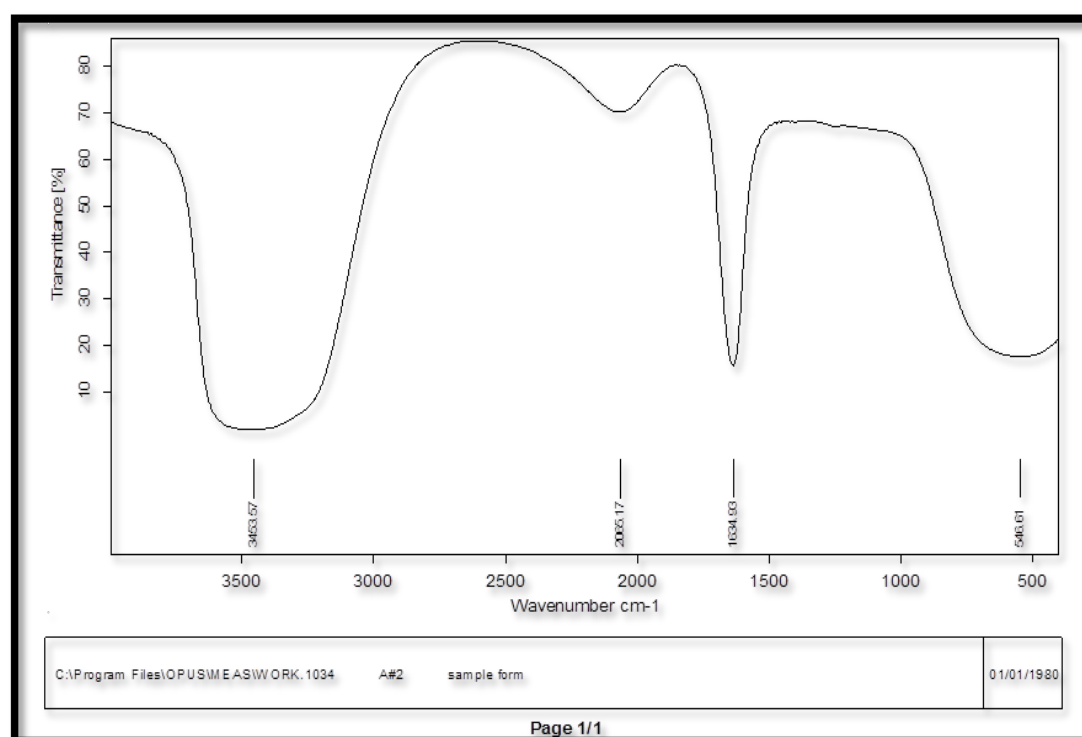
شکل ۱- ژل آگارز حاصل از تکثیر ژن *16S rRNA* ایزوله های مورد نظر. باند M؛ سایز مارکر ۱۰۰ bp DNA size marker (فرمنتاز)، باند C+؛ کنترل مثبت (سودوموناس آئروژینوزا ATCC 15442)، باند ۱؛ ایزوله مورد نظر با طول باند ۱۵۰۰ bp، باند C-؛ کنترل منفی (آب مقطر)



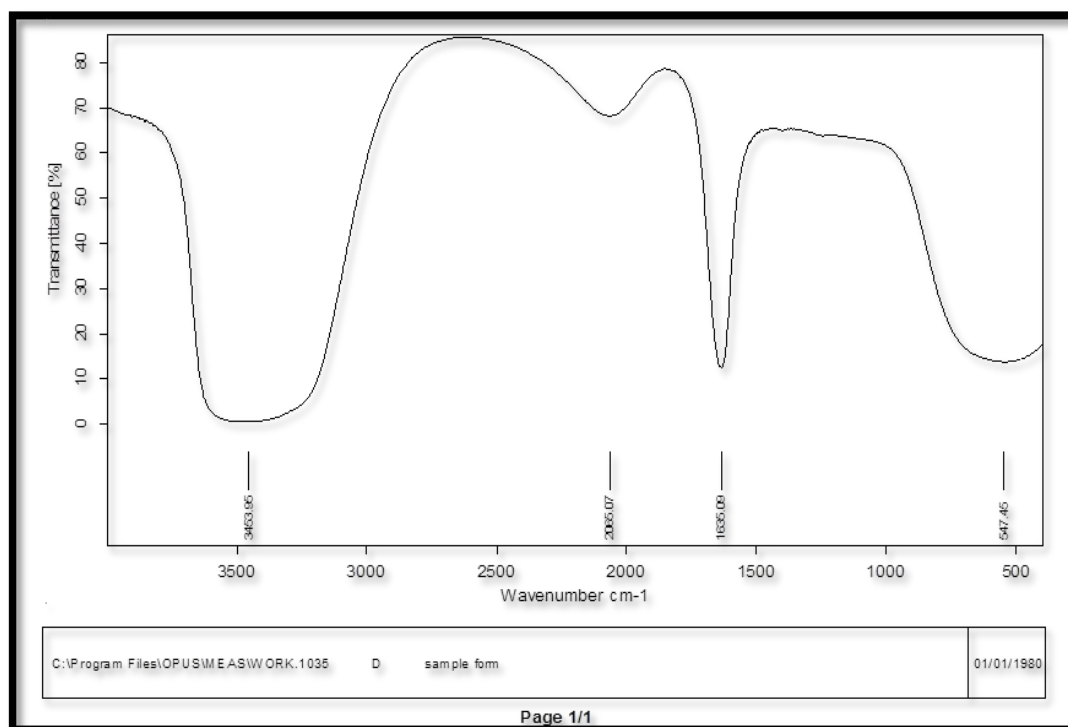
شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی TEM مربوط به نانوذره های سنتز شده در دو مقیاس (کروی و بدون چسبندگی)



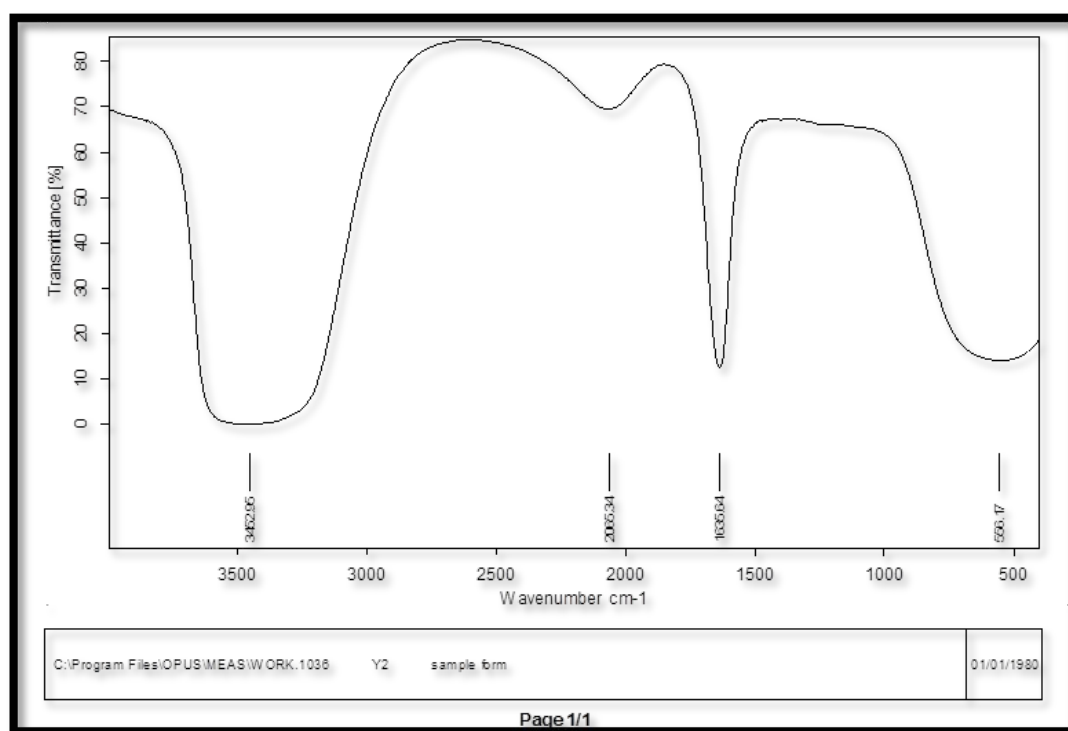
شکل ۳- درخت فیلوژنی از سویه برتر با نام مارینوباکتر *np-4*



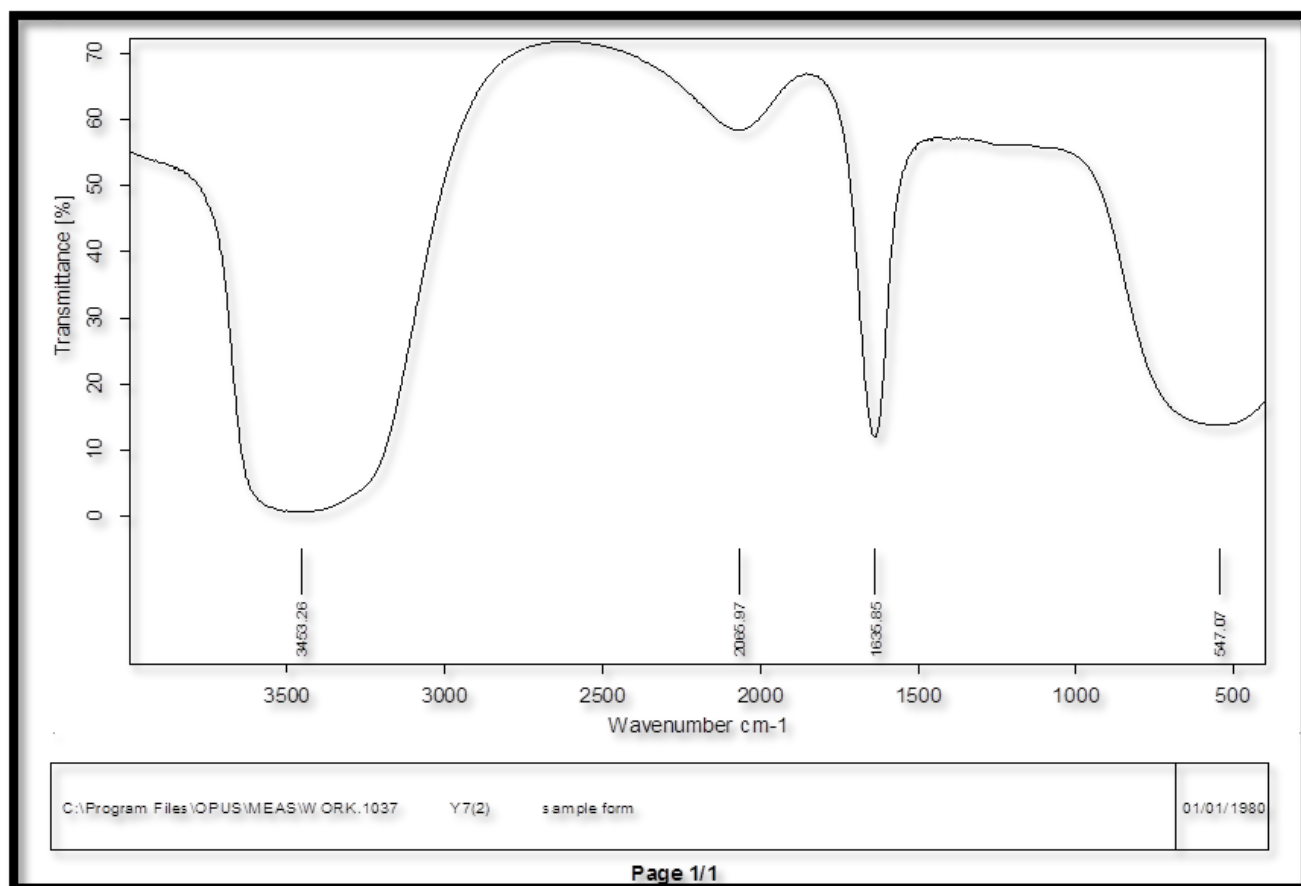
شکل ۴- طیف جذبی FTIR از نمونه a''_2



شکل ۵- طیف جذبی FTIR از نمونه d



شکل ۶- طیف جذبی FTIR از نمونه y2



شکل ۷- طیف جذبی FTIR از نمونه y7

منابع

- 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- Hamed 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 tetrastomatica*. 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.