

تولید بیونانوذرات پالادیم توسط باکتری فلز دوست

بهارک حسین خانی^{۱*}، گیتی امتیازی^۲

۱. دانشجوی دکتری میکروبیشناسی، بخش میکروبیشناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۲. دکتری تخصصی میکروبیشناسی، استاد، بخش میکروب شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
نویسنده رابط: بهارک حسین خانی، بخش میکروبیشناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان ۰۹۱۳۲۴۳۰۸۳۰
bahar_hosseinkhani@yahoo.com

چکیده:

زمینه و اهدا ف: نانوذرات پالادیم به علت خصوصیات ویژه فیزیکی و شیمیایی کاربردهای فراوانی در ساخت ابزارهای نوری، الکترونیک، دندانپزشکی و بویژه کاتالیزورها دارند. اخیراً روش‌های زیستی به عنوان روش‌های دوست‌دار طبیعت مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند از این رو در این تحقیق تولید بیونانوذرات پایدار پالادیم توسط یک سیستم زیستی باکتری فلزدوست *Cupriavidus necator* مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بررسی: نانومتري بودن و ویژگی‌های این ذرات و مکانیسم تولید با روش‌های میکروسکوب الکترونی عبوری^۱ و طیف سنج پراش انرژی^۲ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: *Cupriavidus necator* به صورت زنده و غیر زنده قادر به احیاء فلز پالادیم و تشکیل بیونانوذرات در سطح دیواره سلولی می‌باشد. عدم تولید نانوذرات در اسفروپلاست و همچنین نتایج شبیه‌سازی سطح سلول توسط میکروپارتیکل‌های آمین و کربوکسیل دار دلیلی بر این است که تولید بیونانوذرات توسط مکانیسمی مستقل از فعالیت متابولیکی و آنزیمی در ارتباط با گروه‌های آمین و کربوکسیل موجود در دیواره سلولی این باکتری صورت می‌پذیرفت.

نتیجه گیری: تولید نانوذرات از جمله پالادیم، به روش میکروبی که روشی ساده، ارزان و بدون ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی امکان پذیر است.

کلید واژه‌ها: نانوذرات، پالادیم، *Cupriavidus necator*

¹ Transmission Electron Microscopy (TEM)

² Energy Dispersive spectra (EDS)

مقدمه:

که توسط مکانیسم های به فلزات مقاومت می کنند قادرند ذرات فلزی را به مقیاس نانو تبدیل کنند (۱۷،۱۶،۱۳).

گزارشاتی مبنی بر تولید درون سلولی و خارج سلولی نانوذرات پالادیم با اندازه های متفاوت ۱۰-۰/۷ نانومتر توسط باکتری ها، *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio fructosivorans*, *Desulfovibrio Vulgaris*, *Shewanella oneidensis*, *Bacillus sphaericus* وجود دارد (۲۰، ۱۸، ۱۹، ۱۲).

باتوجه به اهمیت کاتالیست ها در حذف آلودگی های زیست محیطی، اخیراً تلاش های بسیار زیادی در تهیه و بهبود آنها صورت گرفته است. مطالعات نشان داده است نانوذرات پالادیم رسوب پیدا کرده در سطح باکتری قادر به کاتالیز کردن واکنش های شیمیایی متعددی مانند دهلوزناسیون ترکیبات آروماتیک (۱۸) و احیاء فلزات سمی و سنگین کروم می باشند (۱۰). در مقیاس نانومتری به علت افزایش سطح به حجم ذرات فلزی، سطح میانکنش کاتالیست فلزی با سوبسترا افزایش پیدا می کند و بدین ترتیب نانوکاتالیست ها توانایی بیشتری در تسریع واکنش ها دارا می باشند. (۱۸)

Yong و همکاران (۲۰۰۲) اثبات نمودند بیو نانوذرات تولیدی توسط باکتری *Desulfovibrio desulfuricans* کاتالیست های فعال تری نسبت به نانوذرات پالادیم تهیه شده به روش احیاء شیمیایی می باشند (۱۹).

روش های زیستی کاملاً دوست دار طبیعت بدون ایجاد آلودگی های زیست محیطی، ارزان، آسان و در تولید نانوذرات می باشد و اغلب نانوذرات تولیدی به روش های زیستی از پایداری خوبی برخوردار می باشد و احتیاج به استفاده از عوامل پایدار کننده نمی باشند (۱۴). با توجه به کاربردهای فراوان نانوذرات پالادیم در علوم دندانپزشکی، ساخت ابزارهای نوری، الکترونیک و بویژه کاتالیست ها در این تحقیق برای اولین بار در ایران هدف تولید بیونانوذرات پالادیم توسط باکتری فلزدوست *Cupriavidus necator*، اثبات نانومتری بودن و بررسی شرایط مؤثر در تولید این نانوذرات می باشد.

به ذرات جامد کلئیدی که اندازه ای در محدوده ۱۰۰-۱ نانومتر دارند نانوذره اطلاق می شود (۱۷، ۱۶، ۱). خواص ذرات بستگی به اندازه ذرات دارد. در اندازه های نانومتری ذرات خواص الکترونیکی، مغناطیسی، نوری و کاتالیستی منحصر به فرد به خود می گیرند و همچنین نسبت سطح به حجم افزایش می یابد (۱۳، ۹).

از بهترین نانوذرات می توان به نانوذرات فلزی اشاره نمود که کاربردهای وسیعی در علوم مختلف دارند. نانوذرات پالادیم دارای قدرت جذب سطحی بالای ترکیبات آلی و غیرآلی هستند و از این نانوذرات در حذف آلودگی های زیستی استفاده می شود علاوه بر این نانوذرات پالادیم به عنوان کاتالیست های مؤثر برای حذف آلودگی های مثل تری کلرواتن و حذف آلودگی های تراکلریدکربن موجود در آب های زیر زمینی آلوده شناخته شده اند (۲۰، ۱۹، ۱۱، ۱۰، ۵). علت اهمیت نانوذرات گروه پالادیم پایداری قابل ملاحظه در درجه حرارت های بالا و پایداری در برابر اکسیداسیون است از این رو اخیراً محققین توجه زیادی را به نانوذرات پالادیم به علت اثر و کاربرد برجسته این نانوذرات به عنوان کاتالیست مبدول داشته اند (۵، ۷).

تولید نانو ذرات گروه پلاتین از جمله پالادیم به روش های احیاء شیمیایی، رسوب دهی الکتروشیمیایی، روش های چگالش بخار و روش های فوتوشیمیایی صورت گرفته است. این روش ها دارای معایبی از جمله: میزان بالای آلودگی، هزینه های گزاف، غیریکنواختی در اندازه ذرات، ناپایداری نانوذرات، عدم کنترل رشد نانوکریستال ها و تجمع نانوذرات حین ساخت می باشد (۸). در این روش ها برای افزایش پایداری نانوذرات و جلوگیری از تجمع نانوذرات احتیاج به عوامل پایدار کننده مانند پلیمر ها، پلی اکترولیت ها و یا استفاده از لیگاند های پایدار کننده می باشد (۱۲).

در روش های بیولوژیکی، تولید نانوذرات با استفاده از موجودات زنده تک سلولی و پر سلولی صورت می گیرد اخیراً مشخص شده است میکروارگانیسم ها علاوه بر این

مواد و روش ها

سنتز بیونانوذرات پالادیم توسط بیوماس زنده و کشته شده سلولی

باکتری (*Cupriavidus necator* H16 (DSM428))

از کلکسیون کشت میکروبی و سلولی آلمان (DSMZ) تهیه شد. باکتری مورد نظر به محیط نوترینت برات تلقیح در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور ۱۲۰rpm به مدت ۲۴ ساعت گرماخانه گذاری شد. سلول های باکتری مورد نظر را به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ نموده و مایع رویی را دور ریخته و بیوماس سلولی حاصل را ۳ مرتبه با بافر MOPS_NaOH, pH=7 شستشو داده شد.

علاوه بر بیوماس زنده، بیوماس سلولی کشته شده (توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه) تهیه شد. سپس بیوماس سلولی زنده و کشته شده را در محلول ۰/۰۱ مولار اسید نیتریک pH=۲ مخلوط و کدورت سوسپانسیون مورد نظر در (OD_{۶۰۰} = ۱/۳) تنظیم و به لوله های بی هوای هانگیت استریل منتقل گردید. سوسپانسیون، مورد نظر به مدت ۱۰ دقیقه توسط گاز نیتروژن بی هوای شد. به سوسپانسیون بی هوای مورد نظر محلول تتراکلرو دی سدیم پالادات (Na₂PdCl₄) با غلظت نهایی ۲ میلی مولار و فرمات به عنوان الکترون دهنده با غلظت نهایی ۲۵ میلی مولار افزوده شد.

نمونه های شاهد شامل: ۱- سوسپانسیون باکتریای و فرمات (کنترل بدون پالادیم) ۲- سوسپانسیون باکتریای و سدیم تترا پالادات (کنترل بدون فرمات) ۳- فرمات و سدیم تترا پالادات (کنترل بدون بیوماس سلولی) تهیه شد. تمامی نمونه ها مورد نظر در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور ۱۲۰rpm به مدت ۲۴ ساعت گرماخانه گذاری شدند.

بررسی تولید بیونانوذرات پالادیم توسط اسفروپلاست

تولید بیونانوذرات توسط اسفروپلاست مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور اسفروپلاست باکتری مورد نظر را طبق روش Dengler و همکاران (۲۰۰۸) تهیه نموده و سپس به سوسپانسیون بی هوای اسفروپلاست محلول تتراکلرو دی سدیم پالادات (Na₂PdCl₄) با غلظت نهایی ۲ میلی

مولار و فرمات به عنوان الکترون دهنده با غلظت نهایی ۲۵ میلی مولار افزوده شد.

تولید نانو ذرات پالادیم توسط سطوح غیر زنده پلی استیرنی آمین دار و کربوکسیل دار

میکروپارتیکل های با گروه آمین دار^۲ و کربوکسیل دار^۳ را از شرکت GmbH Micrparticle آلمان تهیه شد. غلظت ۰/۰۷۴٪ از میکروپارتیکل کربوکسیل دار و غلظت ۰/۰۹۸٪ از میکروپارتیکل آمین دار در اسید نیتریک ۰/۰۱ مولار در لوله ای بی هوای هانگیت تهیه نموده و سوسپانسیون حاصل توسط گاز نیتروژن بیهوای شدند. به سوسپانسیون بی هوای مورد نظر محلول سدیم تترا پالادات (Na₂PdCl₄) با غلظت نهایی ۲ میلی مولار و فرمات با غلظت نهایی ۲۵ میلی مولار افزوده شد.

بررسی مورفولوژی و ترکیب شیمیایی بیونانوذرات

میزان ۱ میلی لیتر از نمونه های ۲۴ ساعته را پس از سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ pm و شستشو با آب در محلول ۰/۰۴٪ گلو تار آلدهید به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت شد. برای حذف گلو تار آلدهید، نمونه های مورد نظر را ۳ مرتبه با آب مقطر دیونیزه شستشو داده شد. میزان ۱۰ ماکرو لیتر از نمونه تثبیت شده را بر روی صفحات مشبک از جنس نیکل در دمای اتاق خشک نموده و مورفولوژی نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (CM Philipd 20) مورد بررسی قرار گرفت.

همزمان با تهیه عکس میکروسکوپ الکترونی از نمونه های تثبیت شده، با استفاده از دستگاه طیف سنج پراش انرژی^۴ نصب شده بر روی میکروسکوپ الکترونی ترکیب شیمیایی نانوذرات را مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

محلول کهربایی رنگ تتراکلرو دی سدیم پالادات در حضور باکتری *C. necator* و فرمات طی ۱ ساعت کاهش پیدا کرد و منجر به ایجاد رسوبات به رنگ قهوه ای تیره و یا سیاه در محلول مورد نظر شد. در حالیکه هیچ گونه تغییر رنگی در نمونه های شاهد مشاهده نگردید.

شکل ۱، تصویر میکروسکوپ الکترونی از نمونه های تثبیت شده است که نانومتری بودن بیونانوذرات تشکیل

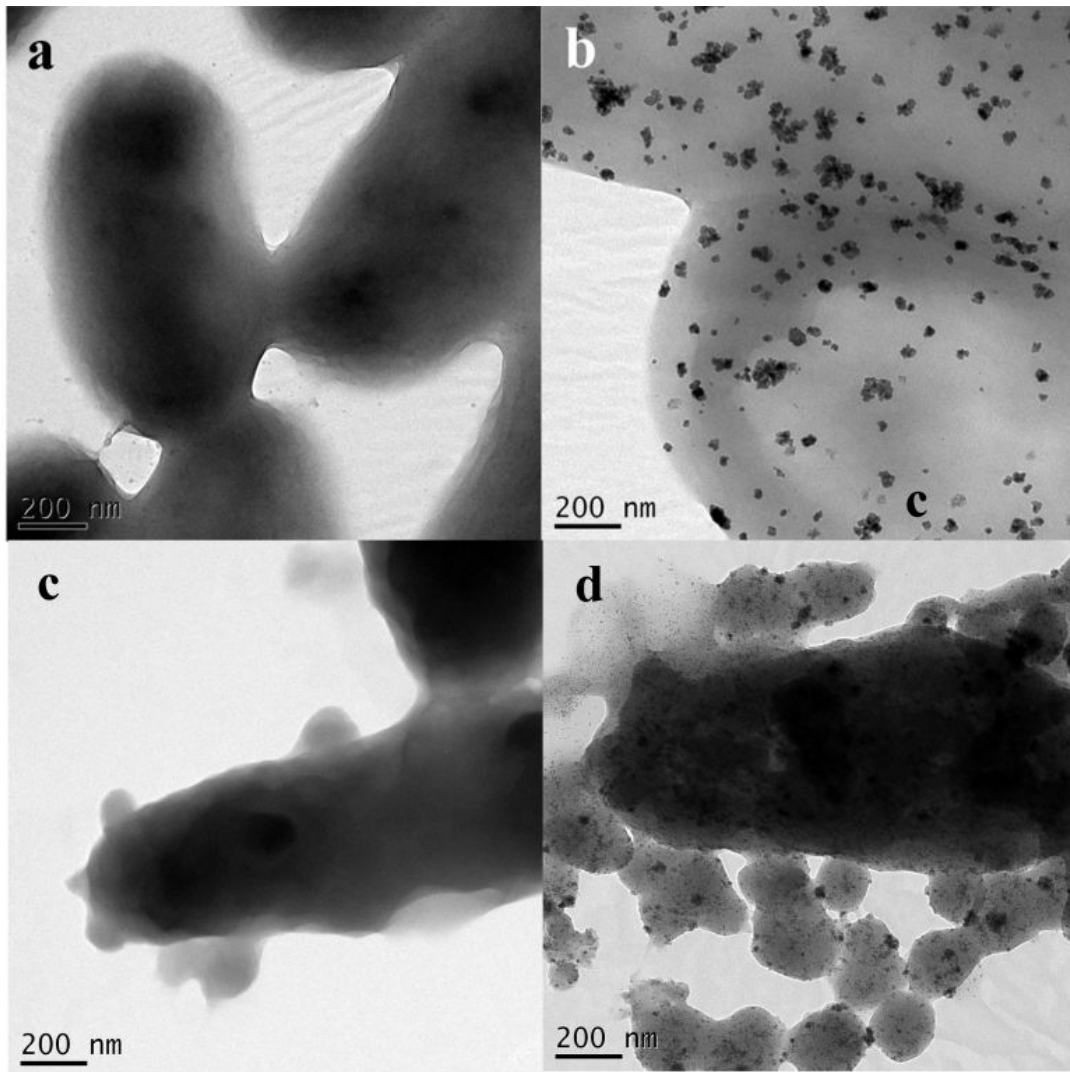
²Amino polystyren beads (APS)

³Carboxyl polystyren beads (CPS)

⁴y dispersive spectrEnergy(EDS)

و بدون بیوماس سلولی نانو ذره ای مشاهده نشد و در نتیجه، حضور بیوماس باکتری و فرمات برای تشکیل نانو ذرات ضروری می باشد.

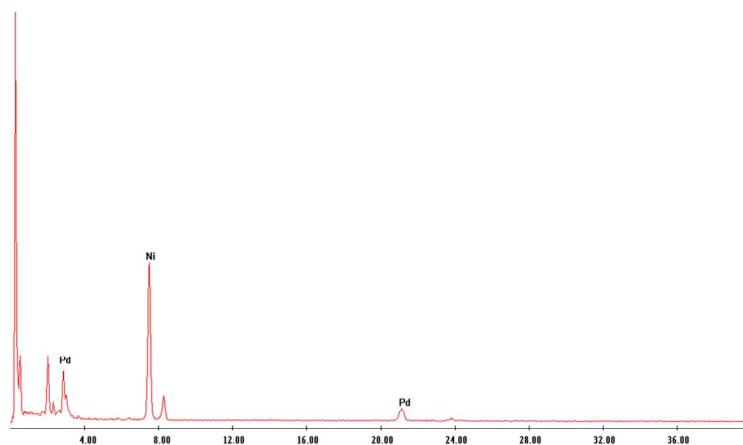
شده توسط باکتری زنده در حضور فرمات را اثبات می کند و همچنین مرفولوژی نانوذرات با این روش قابل بررسی می باشد. در نمونه های کنترل بدون فرمات (شکل a- ۱)



شکل ۱: تصویر میکروسکوب الکترونی نانوذرات پالادیم تشکیل شده در سطح باکتری زنده و کشته شده *C. necator* (b) تشکیل بیو نانوذرات در حضور ۲۵ میلی مولار فرمات و ۲ میلی مولار تتراکلرو دی سدیم پالادات توسط باکتری زنده. شاهد مورد نظر شامل: (a) عدم حضور فرمات. (d) تشکیل بیو نانوذرات در حضور ۲۵ میلی مولار فرمات و ۲ میلی مولار تتراکلرو دی سدیم پالادات توسط باکتری کشته شده. شاهد مورد نظر شامل: (c) عدم حضور فرمات.

شد . با این روش وجود پالادیم (*) را در بیو نانو ذرات اثبات کرد (شکل ۲).

برای اثبات وجود فلز پالادیم در نقاط نانومتری ایجاد شده در سطح باکتری از تکنیک طیف پراش انرژی استفاده

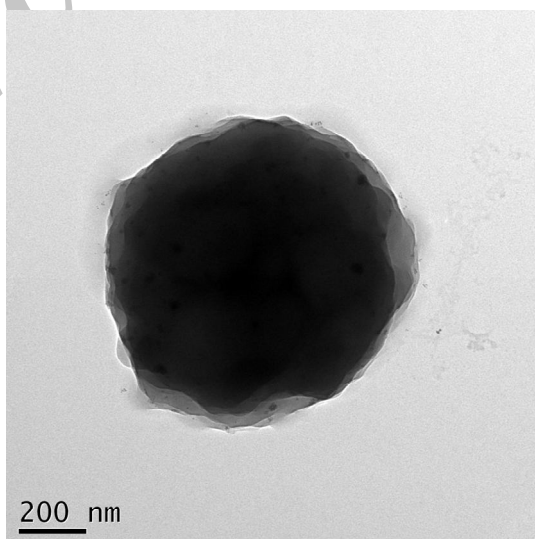


شکل ۲: طیف سنج پراش انرژی (EDS) از نانوذرات پالادیم تشکیل شده در سطح باکتری *C necator* در حضور بیوماس، ۲ میلی مولار تتراکلرو دی سدیم پالات و ۲۵ میلی مولار

در این تحقیق، بعد از تهیه اسفروپلاست، احیاء و تولید بیو نانو ذرات مورد بررسی قرار گرفت. اسفروپلاست سلولی است که دیواره سلولی تقریباً به صورت کامل از دست رفته است. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می شود تشکیل نانوذرات توسط اسفروپلاست صورت نگرفت. بدین ترتیب می توان نتیجه گرفت که دیواره سلولی نقش اصلی در جذب سطحی و هسته گذاری فلز پالادیم می باشد که با از دست رفتن دیواره، نانوذرات پالادیم شکل نگرفتند.

بررسی مکانیسم تولید بیو نانوذرات پالادیم توسط باکتری *C. necator*

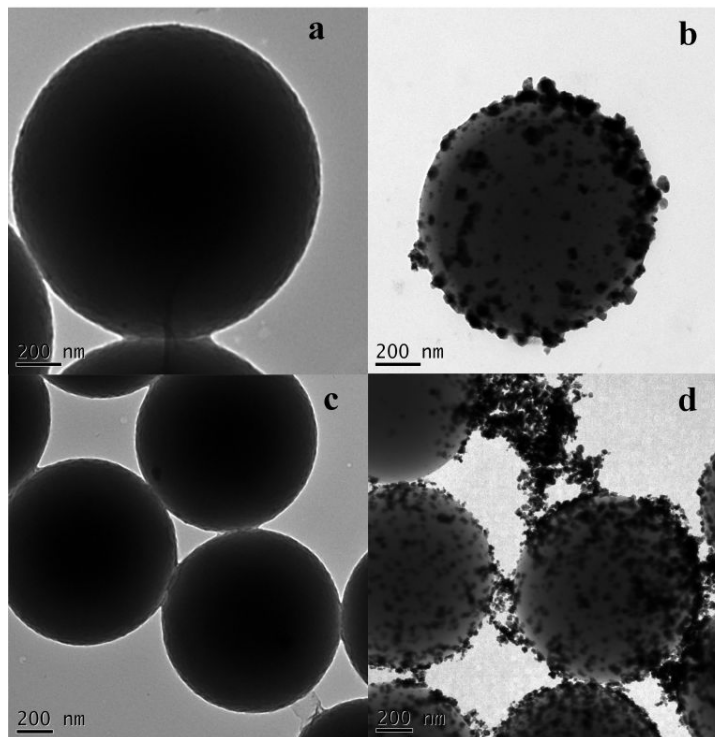
سلولهای غیر زنده همچنین توانای تولید بیونانوذرات را داشتند (شکل d-۱) و این نشان دهنده نقش غیر فعال باکتری در تولید بیو نانوذرات می باشد. در این حالت وجود فرمات ضروری و در عدم حضور فرمات هیچگونه نانوذره ای در سطح سلول مشاهده نشد (شکل c-۱).



شکل ۳: تصویر میکروسکوپ الکترونی اسفروپلاست باکتری *C necator* در حضور ۲۵ میلی مولار فرمات و ۲ میلی مولار تتراکلرو دی سدیم پالات

در حضور فرمات صورت پذیرفت. میکروپارتیکل های با گروه آمین توانای بیشتری در سنتز نانوذرات دارد و میتوان نتیجه گرفت که گروه آمین موجود در دیواره سلولی نقش بسیار مهمی در سنتز و احیاء نانوذرات پالادیم دارد.

برای شبیه سازی سطح باکتری و تعیین عاملهای مؤثر در تشکیل نانوذرات از میکروپارتیکل های با گروه آمین دار و کربوکسیل دار استفاده شد. همان طور در شکل ۴ مشاهده می شود تولید نانوذرات پالادیم توسط این میکروپارتیکل ها



شکل ۴: تصویر میکروسکوپ الکترونی تولید نانوذرات پالادیم توسط میکروپارتیکل های با گروه کربوکسیل در (CPS) در عدم حضور فرمات (a) و حضور فرمات (b) ، تولید نانوذرات پالادیم توسط میکروپارتیکل های با گروه آمین در (APS) در حضور فرمات (d) و عدم حضور فرمات (c)

بحث:

پالادیم می باشد. Coker و همکاران (۲۰۰۹) از روش سنج پراش انرژی برای اثبات وجود پالادیم در نانوذرات تولید شده توسط باکتری *Geobacter sulfurreducens* استفاده نمودند (۲). Dokoutchaev و همکاران (۱۹۹۹) از میکرواسفرهای گروه های آمین دار و کربوکسیل دار شده برای تولید نانوذرات طلا، پلاتین و پالادیم استفاده نمودند و آنها ذکر نمودند بر هم کنش های الکتروستاتیکی بین گروه عاملی سطح میکرواسفرها و این فلزات منجر به سنتز نانوذرات

یافته های این مطالعه نشان داد که باکتری فلز دوست *C. necator* توانایی سنتز بیونانوذرات پالادیم را دارا می باشد. طبق گزارشات Jia و همکاران ۲۰۰۹، تشکیل رسوبات قهوه ای تیره و سیاه نشان دهنده احیاء پالادیم (II) و تشکیل پالادیم (۰) می باشد ما همچنین به صورت چشمی این تغییر رنگ را مشاهده کردیم (۱۱). مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان داد که نقاط رسوب یافته بر روی سطح سلول نانومتری می باشد که با تکنیک طیف سنج پراش انرژی اثبات شد که این نانوذرات حاوی

Shewanella و *Desulfovibrio desulfuricans* *oneidensis* در حضور مواد الکترون دهنده‌ای همچون پیروات، لاکتات، فرمات و هیدروژن اشاره نمودند (۱۸،۱۵). یکی از مهمترین اهداف نانوتکنولوژی توسعه روش‌های در سنتز نانوذرات با پایدار بالا و بهبود مواد پایدار کننده که مانع از تجمع نانوذرات می باشد. Bunge و همکاران (۲۰۱۰) ذکر نموده اند که در سنتز نانوذرات میکروبی سطح باکتری به عنوان پایدار کننده عمل می کند. در این مطالعه موفق به سنتز بیو نانوذرات در سطح باکتری با پایداری بالا شدیم (۱۴).

نتیجه گیری:

از آنجائی که نانوذرات دارای ساختارهای سطحی و میان کنش‌های متفاوت و فعال تری نسبت به ذرات با اندازه های بزرگتر دارند و همچنین توانایی و گرایش بیشتری برای اتصال و چسپندگی و تجمع دارند از این رو دست یابی به روش های در کنترل ساخت و پایداری نانوذرات حائز اهمیت می باشد. در این تحقیق تولید بیونانوذرات پالادیم به روشی کاملاً زیستی دوست دار طبیعت، ارزان، آسان و سریع تهیه شدند و همچنین سطح سلول باکتری به عنوان یک پایدار کننده عمل نموده و در نتیجه احتیاج به استفاده از پایدار کننده‌ای نمی باشد که این نکته از لحاظ علم نانوتکنولوژی بسیار حائز اهمیت می باشد. نانومتری بودن و ویژگی های این ذرات با روش های میکروسکوب الکترونی و طیف سنج پراش انرژی مورد بررسی قرار گرفت.

شده است. در این تحقیق برای شبیه سازی سطح سلول از این میکروپارتیکل ها استفاده شد و مشاهده شد که تولید نانوذرات پالادیم توسط میکروپارتیکل ها بویژه نوع آمین دار امکان پذیر است (۳).

Fein و Fowle (۲۰۰۱) گزارش نمودند که گروه‌های عاملی موجود در دیواره سلولی مکان‌های مناسبی برای هسته گذاری و جذب سطحی فلزات می باشند و این عملکرد مستقل از فعالیت متابولیسی سلول بوده و در نتیجه سلول های مرده و حتی قطعاتی از دیواره سلول قادر به جذب فلزات خواهند بود و بعد از عمل هسته گذاری فلز، عمل احیاء فلز توسط مکانیسم های متفاوت از جمله حضور یک عامل الکترون دهنده صورت می گیرد (۶). در این تحقیق عدم تشکیل بیونانو ذرات در حضور اسفروپلاست باکتری و نتایج حاصل از شبیه سازی توسط میکروپارتیکل ها اثبات نمود که تشکیل بیونانوذرات مستقل از فعالیت آنزیمی و متابولیسی سلول می باشد و در نتیجه میانکش الکتروستاتیکی میان گروه های عاملی آمین و کربوکسیل دار موجود در سطح دیواره سلول می باشد (۴). Lengke و همکاران (۲۰۰۷) از سلول‌های کشته شده سیانوباکتری *Plectonema boryanum* برای سنتز نانوذرات استفاده نمودند. آنها همچنین اشاره به عملکرد غیر آنزیمی این سیانوباکتری در رسوب این نانوذرات در سطح سلول نموده‌اند و ذکر نمودند که رسوب نانوذرات در ارتباط با مواد ارگانیک مشتق شده از سطح سلول می باشد (۱۲). در حالیکه طی مطالعات دیگری به مکانیسم کاملاً متفاوتی مبنی بر عملکرد و نقش فعال باکتری و آنزیم دهیدروژناز در سنتز نانوذرات توسط باکتری های

فهرست مراجع:

- ۱) کرمانشاهی ر، حسین خانی ب. ۱۳۸۷. نانوبیوتکنولوژی با دیدگاه میکروبیولوژی. چاپ دوم. نشر دانشگاه اصفهان. شابک ۹-۵۷-۸۶۵۸-۹۶۴-۲۰-۶۳.
- 2) Coker VS, Bennett JA, Telling ND, Henkel T, Charnock JM, Laan G, and Lloyd JR. Microbial Engineering of Nanoheterostructures: Biological Synthesis of a Magnetically Recoverable Palladium Nanocatalyst. *Americ Chem Soc* 2010; 4 (5) : 2577-2584.
- 3) Dokoutchaev A, James JT, Koene ShC, Pathak S, Prakash GK and Thompson. ME. Colloidal Metal Deposition onto Functionalized Polystyrene Microspheres. *Chem Mater* 1999; 11: 2389-2399.

- 4) Denger K, Weinitzschke, S, Smits THM, Schlehec kD and Cook AM.. Bacterial sulfite dehydrogenases in organotrophic metabolism: separation and identification in *Cupriavidus necator H16* and in *Delftia acidovorans SPH-1*. *Microb* 2008; 154:256–263.
- 5) Deplanche K, Woods RD, Mikheenko IP, Sockett RE and Macaskie LE. Manufacture of Stable Palladium and Gold Nanoparticles on Native and Genetically Engineered Flagella Scaffolds. *Biotech and Bioeng* 2008; 1(101): 873-880.
- 6) - Fowle, DA and Fein JB. Quantifying the Effects of *Bacillus subtilis* Cell Walls on the Precipitation of Copper Hydroxide from Aqueous Solution *Geomicro J* 2001; 1(18):77–91.
- 7) Gerick M and Pinches A. Biological synthesis of metal nanoparticle. *Hydro*2006;83:132-140.
- 8) Govender Y, Riddin T., Gericke M and Whiteley CG. Bioreduction of platinum salts into nanoparticles: a mechanistic perspective. *Biotechnol Lett* 2009;31:95–100.
- 9) Habibi H, Nasr-Esfahani M, Emtiazi G; Hosseinkhani B. Nanostructure Thin Films of Titanium Dioxide Coated on Glass and Its Anti UV Effect for Living Organisms. *Curt Nanosci* 2010; 6: 324-329.
- 10) Humphries AC, Nott KP, Hall LD and Macaskie LE. Continuous removal of Cr(VI) from aqueous solution catalysed by palladised biomass of *Desulfovibrio vulgaris*. *Biotechnol Lett* 2004;26: 1529–1532.
- 11) Jia L, Zhang Q, Li Q and Song H. The biosynthesis of palladium nanoparticles by antioxidants in *Gardenia jasminoides Ellis*: long life time nanocatalysts for *p*-nitrotoluene hydrogenation. *Nanotech* 2009; 20: 385601-385610.
- 12) Lengke MF , Fleet ME and Southam G. Synthesis of palladium nanoparticles by reaction of filamentous cyanobacterial biomass with a palladium (II) chloride complex. *Langmuir*2007;23: 8982-8987.
- 13) Mandal D, Bolander ME, Mukhopadhyay D, Sarkar G and MukherjeeP.. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Appl Microb and Biotechnol*2006; 69:485–492.
- 14) Bunge M, Søbberg L S., Rotar A, Gauthier, D Lindhardt AT, Hause G, Finster K, Kingshott P SkrydstrupT, Meyer RL. Formation of Palladium(0) Nanoparticles at Microbial Surfaces. *.Biotechnol and Bioeng*2010; 107 (2):1-11
- 15) Mikheenko IP, Rousset M, Dementin S and Macaskie LE. Bioaccumulation of Palladium by *Desulfovibrio fructosivorans* Wild-Type and Hydrogenase-Deficient Strains. *Appl and Envirol Microbio* 2008; 74: 6144–61461.
- 16) Mohanpuria P, Nisha K and Kumar Y. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *J of Nano Research*2006; 10:507–517.
- 17) Sastry M, Ahmad A, IslamKhan M and KumarR. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr Sci*. 2003;85: 162-170.
- 18) Windt WD , Boon N , Bulcke JV, Rubberecht L, Prata F, Mast J , Hennebel T , Verstraete W. Biological control of the size and reactivity of catalytic Pd(0) produced by *Shewanella oneidensis* .*Antonie van Leeuwenhoek* 2006; 90:377–389
- 19) Yong P, Farr JPG, Harris IR and Macaskie LE 2. Palladium recovery by immobilized cells of *Desulfovibrio desulfuricans* using hydrogen as the electron donor in a novel electrobioreactor. *Biotechnol Lett*.2002; 24: 205–212.
- 20) Yong P, Beedle, MP, Mikheenko IP and Macaskie L E. From biomineralisation to fuel cells: biomanufacture of Pt and Pd nanocrystals for fuel cell electrode catalyst. *Biotechnol Lett* 2007; 29:539–544.