



بیوستنز نانوذره مس توسط باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا

زهرا امیرپور^۱، منیر دودی^{۲*}، غلامرضا امیری^۳

^۱ کارشناس ارشد، گروه میکروپ شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، ^۲ استادیار، گروه میکروپ شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، ^۳ استادیار، گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: فلزات سنگین از آلاینده های پایدار و با دوام محیط زیست هستند که به یک مشکل جهانی تبدیل شده اند. با توجه به این که میکروارگانیسم ها مقاومت بالایی نسبت به فلزات دارند و موجب پاک سازی محیط زیست و تولید نانو ذرات می شوند، پژوهش حاضر به منظور تولید نانو ذره مس از باکتری های مقاوم به این فلز از پساب دو کارگاه مسگری در اصفهان برنامه ریزی شد.

مواد و روش ها: از پساب دو کارگاه مسگری در شهر اصفهان به صورت مقطعی نمونه برداری شد. عوامل فیزیوشیمیایی پساب ها، حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری ها (MIC) به مس و مقاومت آنها نسبت به چند آنتی بیوتیک بررسی گردید. در ادامه آزمون های شناسایی مورفولوژی، بیوشیمیایی و مولکولی بر روی نمونه ها انجام شد. سپس به منظور ارزیابی ساخت نانوذرات مس، بیومس باکتری مقاوم به مس به محلول ذخیره سولفات مس افزوده شد و نتایج توسط دستگاه طیف سنج فرابنفش- مرئی (UV-VIS)، تفرق اشعه ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: از میان باکتری های مورد بررسی، باکتری باسیلوس تویونسسیس سویه NE2 با MIC = ۳/۵ mM و آرتروباکتر آزیلیس سویه NE1 با MIC = ۴ mM از پساب مسگری شماره ۲ و باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۵۶۳۳ با MIC = ۶ mM از پساب مسگری شماره ۱ جداسازی شدند. از این میان تنها باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۵۶۳۳ قادر به سنتز نانوذرات مس بود. پیک های ایجاد شده در محدوده ۲۵۰-۴۳۰ نانومتر، تایید کننده ذرات مس (Cu) و اکسید مس (CuO) بودند.

نتیجه گیری: یافته های این پژوهش نشان داد که باکتری جداسازی شده می تواند کاندید مناسبی به منظور حذف مس از پساب ها و همچنین تولید کننده زیستی نانو ذره مس باشد.

واژگان کلیدی: بیوستنز، نانوذره مس، UV-VIS، XRD، TEM.

پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹۶

دریافت مقاله: آبان ماه ۹۶

مقدمه

اما معایب روش های شیمیایی در این است که بسیار هزینه انرژی بالایی دارند و به دلیل استفاده از مواد شیمیایی سمی طی فرآیند سنتز آنها، بسیار خطرناک هستند (۱). در روش های فیزیکی راحتی عملکرد، آنالیز، خلوص بالای محصول تولیدی و همچنین ایجاد فیلم نازک و پوشش دهی نیز وجود دارد. اما از معایب این روش ها نیز می توان به هزینه بالا، بازده کم و همچنین نیاز به کنترل دمای بالا (به دلیل انجام واکنش در دمای بالا و گرما زا بودن واکنش اکسیداسیون) اشاره نمود. به همین

امروزه تولید زیستی نانوذرات به دلیل پاک و غیر سمی بودن برای محیط زیست مورد توجه و اهمیت فراوانی قرار گرفته است. به طور کلی سه روش شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی برای تولید نانوذرات فلزی وجود دارد. روش های شیمیایی قادر به تولید مقادیر زیادی از نانو ذرات در زمان کوتاه هستند.

* آدرس برای مکاتبه: اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، گروه میکروپ شناسی.
تلفن: ۰۳۱۳۷۴۲۰۱۳۴ پست الکترونیک: doudi@iaufala.ac.ir

این حضور برخی پلی ساکاریدها و مواد آلی تولیدی توسط میکروارگانیسم‌ها در درون سلول‌ها و نیز درون محیط کشت سبب تولید نانوذرات فلزی می‌گردد. این مواد آلی از طریق گروه‌های عملکردی خود مانند سیستین، هیستیدین، آلدئید، کتون‌ها و ... موجب احیای یون‌های فلز به نانوذرات فلزی می‌شوند. فرآیند احیای فلزات توسط میکروارگانیسم‌ها به دو صورت درون و بیرون سلولی می‌باشد. جایگاه احیا یون‌ها و در نتیجه تولید نانوذرات بر اساس نوع میکروارگانیسم و نوع آنزیم‌های درگیر در فرآیند احیا که در درون یا بیرون سلول قرار داشته باشند تعیین می‌گردد (۵).

جذب زیستی فلزات سنگین یکی از روش‌های مؤثر و مهم در انتقال فلزات سنگین از پساب‌های صنعتی و آب‌های طبیعی است. بر اساس نتایج تحقیقات مختلف، به دلیل سمی بودن و حضور گسترده فلزات در محیط، میکروب‌ها راه کارهای عجیب و بی‌مانندی برای مقابله با فلزات ایجاد می‌کنند و انواع مختلف سازوکارهای مقاومتی در حضور فلزات سنگین از خود نشان می‌دهند.

فلزات به طور مستقیم و یا غیر مستقیم بر رشد و متابولیسم میکروب‌ها اثر می‌گذارند. به طوری که در حضور این آلاینده‌ها، میکروارگانیسم‌ها آنها را به طور فعال (جذب زیستی) و یا به صورت غیرفعال (تجمع زیستی) جذب می‌کنند. این روش‌ها برتری‌هایی نسبت به روش‌های معمول فیزیکی - شیمیایی به کار گرفته شده دارند (۶).

مس یکی از فلزات سنگین است که از راه‌های مختلف مانند آبکاری، استخراج معادن، ذوب مواد معدنی و فلزات، تولید لوازم الکتریکی و ... وارد پساب می‌شود و توسط میکروارگانیسم‌هایی که مقاوم به فلز هستند جذب شده و برخی از اوقات تولید نانوذرات فلزی با اشکال، اندازه و ساختارهای مختلفی را می‌نماید (۷). مطالعات زیادی در این زمینه در ایران و جهان صورت گرفته است.

به عنوان نمونه میرهندي (Mirhendi) و همکاران در ایران تولید نانوذرات آهن، روی و مس را با استفاده از بیوفیلم میکروبی و کشت خالص از باکتری‌های تولیدکننده گزارش دادند. همچنین

دلیل روش‌های استفاده از روش‌های زیستی برای سنتز نانوذرات اهمیت بیشتری دارند. زیرا این منابع برای تولید نانوذرات از لحاظ اقتصادی ارزان‌تر، از لحاظ انرژی به صرفه‌تر و همچنین باعث تولید نانو ذرات فلزی غیر سمی می‌شوند. از دیگر فواید بیوستز نانوذرات زیستی، عدم استفاده از فشار بالا، انرژی، دما و مواد شیمیایی سمی است (۲).

با توجه به کاربرد‌های بسیار زیاد نانوذرات به ویژه در پزشکی، صنعت، الکترونیک، کشاورزی، حسگرها، پژوهش برای کشف و استخراج بیشتر باکتری‌ها و قارچ‌های تولیدکننده نانوذرات ضرورت دارد. از طرف دیگر نانوذرات زیستی را می‌توان به طور گسترده‌ای نه تنها در صنعت و کشاورزی استفاده نمود، بلکه حتی در پزشکی به عنوان عوامل ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد انگلی نیز از آنها استفاده می‌شود (۳).

یکی از جالب‌ترین ویژگی‌های نانوذرات فلزی، خواص نوری آن‌ها بوده که متناسب با شکل و اندازه نانوذرات تغییر می‌کند. در نانو ذرات فلزی تشدید پلاسمون سطحی مسئول خواص نوری منحصر به فرد آن‌هاست که تحت تأثیر فاکتورهایی مانند اندازه نانو ذرات، شکل نانوذرات، فاصله آن‌ها از یکدیگر و ضریب شکست محیط پیرامون تغییر می‌کند. خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، منابع بالقوه‌ای برای جداسازی سویه‌های مقاوم به فلزات سنگین و نانو اکسیدهای فلزی می‌باشند. درک اساس ژنتیکی مقاومت به فلزات سنگین در باکتری‌ها می‌تواند به استفاده بهتر از این مکانیسم‌های طبیعی جهت بهبود محیط زیست همه موجودات زنده منجر شود (۴).

یکی از دلایل تولید نانوذرات فلزی توسط میکروارگانیسم‌ها، کاهش اثرات سمی یون‌های فلزی موجود در محیط رشد میکروب‌ها می‌باشد. این امر موجب شده که میکروارگانیسم‌ها بتوانند بر روی غلظت‌های بالایی از یون‌های فلزی رشد نموده و زنده بمانند. میکروارگانیسم‌ها این عمل را از طریق احیای بیولوژیکی یون‌های فلزی سمی (با استفاده از آنزیم‌هایی مانند NADH ردوکتاز و یا نیترات ردوکتاز) به عناصر فلزی کمتر سمی انجام می‌دهند. علاوه بر

مقدار ۵ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ (شارلو، اسپانیا) به آن اضافه گردید و بر روی حمام بخار به آرامی تبخیر شد. عمل هضم تا رسیدن به محلول شفاف ادامه یافت و از خشک شدن نمونه ها در طول هضم جلوگیری گردید. هنگامی که میزان نمونه به ۱۰ تا ۲۰ میلی لیتر کاهش یافت، جدار بالن با آب مقطر شستشو و نمونه به حجم رسانده شد. سپس به وسیله دستگاه جذب اتمی میزان فلز مس قرائت گردید (۱۱).

ب) جداسازی باکتری ها از پساب: پس از تهیه محیط کشت II PHG آگار استریل تهیه گردید و در هنگام رسیدن حرارت محیط کشت به ۵۵ درجه سلیسیوس، میزان مناسب محلول فلزی تا رسیدن به غلظت نهایی ۰/۵ میلی مولار به محیط کشت افزوده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از رقت های مختلف پساب (10^{-1} تا 10^{-6}) به روش انتشار در آگار بر سطح محیط کشت II PHG آگار کشت و در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شد. پس از گرماگذاری کلنی های رشد یافته بر سطح پلیت به عنوان باکتری های مقاوم به فلز مس انتخاب شدند (۱۲).

ج) جداسازی و خالص سازی باکتری های مقاوم به مس: برای این منظور از روش رقت در آگار (Agar dilution) استفاده شد. ابتدا نمونه های باکتریایی جداسازی شده از پساب ها در محیط کشت پایه فلزی II PHG آگار (پپتون: ۴ گرم، عصاره مخمر: ۱ گرم، گلوکز: ۲ گرم، آگار: ۱۵ گرم) (مرک، آلمان) با غلظت ۰/۵ میلی مولار از فلز سولفات مس پنج آب ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (مرک، آلمان) مجدداً کشت داده شد. رشد کلنی های باکتریایی در مدت زمان ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس در گرمخانه مورد بررسی قرار گرفت. کلنی هایی که از نظر ظاهر به هم شباهت داشتند به منظور غنی سازی نهایی انتخاب شدند و در محیط کشت II PHG برات، با غلظت ۰/۵ میلی مولار از سولفات مس کشت داده شدند. نمونه ها به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس قرار گرفتند. به منظور خالص سازی باکتری ها از روش کشت خطی در محیط کشت II PHG آگار با غلظت ۰/۵ میلی مولار از فلز مس استفاده شد. کلنی های خالص رنگ آمیزی گرم شدند. باکتری ها از نظر

عبود (Aboud) و همکاران بیوستز نانوذرات اکسید مس تولید شده با استفاده از جلبک قهوه ای را اعلام نمودند (۸ و ۹).

گرس (Grass) و همکاران در سال ۲۰۱۰ باکتری های هتروتروفیک هوازی را از سکه های آلیاژ مسی به عنوان یک نمونه از سطوح مسی جداسازی کردند و موفق به جداسازی پاتوژن های فرصت طلبی مانند گونه های کورینه باکتریوم (*Corynebacterium*)، استافیلوکوکوس اورئوس (*S. aureus*) و باسیلوس (*Bacillus*) شدند. در کشور آلمان و پرتغال، ۲۹۴ سویه از این گونه های باکتریایی نیز جداسازی کردند که قادر به جذب یون های فلز مس بودند. اما تعداد محدودی از این سویه ها قادر به تولید نانوذره مس بودند. این محققان اعلام کردند، از آن جایی که سطوح مسی خشک زیستگاه هایی نیستند که باکتری ها بتوانند بر روی آنها رشد کنند و تکثیر شوند احتمال رشد و زنده ماندن باکتری ها می تواند ناشی از آلوده شدن سکه های مسی با مواد ارگانیک باشد (۱۰).

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری های مقاوم به فلز مس از پساب دو کارگاه مسگری در شهر اصفهان بود. همچنین نانوذرات مس تولید شده توسط برخی از این باکتری ها از نظر فیزیکی با استفاده از UV-VIS، XRD و TEM مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری: نمونه های پساب دو کارگاه مسگری در شهر اصفهان به صورت مقطعی جمع آوری شد. نمونه ها در بطری های دهان گشاد پلاستیکی استریل جمع آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه تحقیقاتی واحد فلاورجان منتقل شدند. دما، BOD (اکسیژن خواهی زیستی)، COD (اکسیژن خواهی شیمیایی)، EC (هدایت الکتریکی آب) و میزان فلز مس با استفاده از دستگاه جذب اتمی (American, Perkin elmer-800) تعیین گردید. به منظور ارزیابی میزان pH از دستگاه pH متر (Metrohm 827 Swiss) استفاده شد. برای اندازه گیری میزان فلز مس موجود در نمونه های پساب، ابتدا ۵۰ تا ۱۰۰ میلی لیتر از نمونه پساب به بالن ۲۰۰ میلی لیتری انتقال یافت.

برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR دارای حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و شامل ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (10X)، ۰/۷۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ میکرومولار) (سیناژن، ایران)، ۰/۲ میکرولیتر از Taq DNA پلی‌مراز (سیناژن، ایران)، ۱۸/۵ میکرولیتر از آب مقطر تزریقی و DNA الگو بود (۱۴). واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Applied biosystems, USA) و با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل ۴۵ ثانیه واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس، اتصال در دمای ۵۸ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۱ درصد واجد اتیدیوم بروماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. محصولات PCR پس از توالی‌یابی با داده‌های موجود در بانک جهانی ژن (GenBank) مورد مقایسه قرار گرفتند. کروماتوگرام با BLAST در پایگاه (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLA>) از نظر همولوژی بررسی و گونه‌های مورد نظر شناسایی شدند (۱۱).

ز) بررسی توانایی باکتری‌ها در تولید نانوذره مس: در این مرحله، کشت ۲۴ ساعته از باکتری مورد نظر به محیط کشت PHG II برات (pH ۷/۲) که فاقد سولفات مس بود تلقیح و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس و ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس برای خالص سازی توده زیستی باکتری، ۳ مرتبه با آب دیونیزه شستشو داده شد. جداسازی توده زیستی باکتری توسط سانتریفیوژ با ۵۰۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت. در ادامه یک گرم از توده زیستی باکتری به محلول ذخیره واجد ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه و ۰/۰۱ مولار سولفات مس ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) اضافه گردید و مجدداً در گرمخانه ۳۰ درجه سلیسیوس به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت با ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد (۱۵). ح) سنجش ماکزیمم جذب UV نانوذرات توسط دستگاه

مورفولوژی و آزمون‌های بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۲).

د) تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC): برای این منظور از روش رقت در آگار استفاده شد. ابتدا محیط‌های PHG II آگار با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷ و ۸ میلی مولار از محلول سولفات مس تهیه گردید. کلنی‌های مقاوم به صورت شعاعی بر روی سطح پلیت کشت داده شدند و در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت قرار گرفتند. بر اساس میزان رشد یا عدم رشد باکتری‌ها، غلظت‌های بینابینی نیز انتخاب و رشد باکتری‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در تمام مراحل این روش سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک فارلند تهیه شد. در نهایت حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری‌ها (MIC) و حداقل غلظت کشنده باکتری‌ها (MBC) تعیین گردید (۱۳).

ه) تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک: میزان تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های مقاوم به فلز مس با استفاده از آزمون انتشار دیسک در آگار (به روش کربی-بائر) بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار (کیولب، کانادا) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین ($30 \mu g/ml$)، اریترومايسين ($15 \mu g/ml$)، آموکسی سیلین ($25 \mu g/ml$)، سولفامتوکسازول ($25 \mu g/ml$)، کلرامفنیکل ($30 \mu g/ml$)، جنتامایسین ($10 \mu g/ml$)، وانکومايسين ($30 \mu g/ml$)، پنی سیلین ($10 \mu g/ml$)، سفوکسیتین ($25 \mu g/ml$) و سفیکسیم ($30 \mu g/ml$) ارزیابی شد. قطر هاله عدم رشد ایجاد شده بر اساس معیار CLSI مورد سنجش قرار گرفت (۱۴).

و) شناسایی مولکولی: در این مطالعه نمونه‌هایی که بیشترین MIC را نسبت به فلز مس از خود نشان دادند به کمک روش کلنی-PCR (واکنش زنجیره ای پلی‌مراز) شناسایی مولکولی شدند. به منظور تکثیر ژن *16S rDNA* از آغازگرهای طراحی شده شامل F: ($5'-ACACACGTGCTACAATGG-3'$) و R: ($5'-TAAACCACATGCTCCACC-3'$) استفاده شد (۱۴). ابتدا مقداری از کلنی خالص شده با استفاده از لوپ استریل در ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل حل و به عنوان الگو

نسخه نوزدهم نرم افزار SPSS و آنالیز آماری ANOVA استفاده شد. همچنین از نرم‌افزار Excel برای مقایسه نتایج و تعیین فاصله اطمینان توافقی یا خطای استاندارد استفاده گردید.

یافته ها

الف) نمونه برداری: عوامل فیزیکی شیمیایی و بیولوژیکی پساب های مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. همان طور که مشخص است پساب مسگری ۲، اکسیژن خواهی زیستی (BOD)، اکسیژن خواهی شیمیایی (COD) و دمای بالاتری نسبت به پساب مسگری ۱ داشت. همچنین دارای هدایت الکتریکی آب و pH کمتر و نزدیک به خنثی بود. همچنین میزان فلز مس موجود در این پساب کمتر از پساب مسگری ۱ بود.

ب) نتایج آزمون های بیوشیمیایی: جدول ۲ نتایج آزمون های بیوشیمیایی سه جدایه Cuw. 1، Cuw. 2 و Cuw. 3 را نشان می دهد.

ج) ویژگی مورفولوژیکی و حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد: همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است، باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۵۶۳۳ جدا شده از پساب مسگری ۱ با MIC= ۶ میلی مولار بالاترین میزان تحمل به فلز مس و باکتری باسیلوس توبیونسس سویه NE1 از پساب مسگری ۲ با MIC= ۳/۵ میلی مولار کمترین مقاومت را نسبت **جدول ۱:** عوامل فیزیکی شیمیایی و بیولوژیکی اندازه گیری شده در پساب های مورد مطالعه.

نوع پساب ها	BOD (mg/l)	COD (mg/l)	EC (ds/m)	pH	دما (°C)	میزان فلز مس (ppm)
مسگری ۱	۳۲	۱۱۶	۷۷۳	۸/۹۶	۱۵	۴/۶۳
مسگری ۲	۴۵	۱۶۸	۵۱۳	۷/۳۳	۱۹/۳	۲/۸۸

جدول ۲: نتایج آزمون های بیوشیمیایی مورد استفاده برای شناسایی سویه های مورد مطالعه

نام جدایه	گرم	اندول	تولید گاز	احیا نیترات	MR	VP	اسپور متورم	اسپور لستیناز	اسپور معمولی	حرکت	H ₂ S	اوره	سیترات	اکسیداز	کاتالاز	TSI
Cuw. 1	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	K/K
Cuw. 2	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	*	*	*	*	*
Cuw. 3	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	*	*	*	*	*

علامت (+): در جدول نشانه مثبت بودن تست و علامت (-): نشانه منفی بودن تست و علامت (*): بی مفهوم بودن تست ها می باشد.

اسپکتروفتومتر UV-VIS (طیف سنج فرابنفش-مرئی): بیومس تغییر رنگ یافته باکتری ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته، سه مرتبه به کمک آب دیونیزه شستشو داده شد. جداسازی توسط سانتریفیوژ با ۵۰۰۰ دور در دقیقه صورت گرفت. ماکزیم جذب UV نانوذرات مس به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی (Shimadzu Japan, UV-2600 (TCC240A) در طول موج ۶۰۰-۲۰۰ نانومتر بررسی شد (۱۶).

ط) تعیین صفات مورفولوژیکی و فیزیکی شیمیایی نانوذرات تشکیل شده: در این مرحله توده زیستی باکتری در فور ۱۰۰ درجه سلیسیوس به مدت ۶-۵ ساعت خشک شد و درون کوره الکتریکی با دمای ۵۰۰ درجه سلیسیوس قرار داده شد. سپس سه مرتبه با آب دیونیزه شستشو داده شد. جداسازی توسط سانتریفیوژ با ۵۰۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت. در نهایت نانوذرات مس تولید شده برای بررسی صفات مورفولوژیکی و فیزیکی شیمیایی توسط دستگاه تفرق اشعه ایکس (Philips, 1X 1800) و میکروسکوپ الکترونی گذاره 208S (Philips, 100kw) به سازمان انرژی اتمی اصفهان ارسال گردید. پس از مشخص شدن ساختار و شکل نانوذرات، اندازه آن ها به وسیله فرمول دبی-شرر (Debye-Scherrer) محاسبه گردید (۱۷).

ی) اثبات تک فاز یا چند فاز بودن نانوذرات توسط آنالیز XRD: در این مرحله پودر تهیه شده از بیومس باکتری در دمای ۵۰۰ درجه سلیسیوس در دمای ۱۱۰۰ درجه سلیسیوس کوره الکتریکی قرار داده شد. سپس سه مرتبه با آب دیونیزه شستشو گردید و جهت آنالیز تفرق اشعه ایکس (Bruker, D8 advance) به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه اصفهان منتقل شد (۱۸).

ک) تجزیه و تحلیل داده ها: به منظور آنالیز آماری داده ها از

جدول ۳: ویژگی های ماکروسکوپی، میکروسکوپی، MIC و MBC باکتری های مقاوم به فلز مس در این پژوهش

نوع پساب	نتایج ماکروسکوپی و میکروسکوپی ایزوله ها	نام جنس و گونه و کد اختصاصی باکتری ها	غلظت مس (mM)																			
			۸	۷	۶	۵	۵	۴	۳	۲	۱	۰	۰									
مسگری ۱	کلنی های لزج با سایز متوسط کرم رنگ روی محیط MC باسیل گرم منفی	استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه (Cuw.1) 5633	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
مسگری ۲	کلنی های صاف با سایز متوسط کرم رنگ روی محیط NA باسیل گرم مثبت	باسیلوس تویونسیس سویه NE2 (Cuw. 2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
مسگری ۳	کلنی های خشک با سایز متوسط کرم رنگ روی محیط NA باسیل گرم مثبت	آرتروباکتر آزیلیس سویه NE1 (Cuw. 3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ رشد در غلظت مشخص شده، - عدم رشد، MIC: حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری، MBC: حداقل غلظت کشنده باکتری.

به فلز مس داشت. درجه سلسیوس به رنگ های سفید و آبی مشاهده گردید. این مساله نشان دهنده چند فازي بودن نانوذرات می باشد. مراحل تولید نانوذرات مس در شکل ۲ نشان داده شده است.

(ز) طیف سنجی UV-VIS باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۵۶۳۳: بر اساس نمودار ۱ پیک های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته متصاعد شده از بیومس خشک باکتری مورد نظر نشان داد که نمونه ۲۴ ساعته در محدوده ۳۷۰ و ۴۳۰ نانومتر، نمونه ۴۸ ساعته در محدوده ۲۵۰، ۳۷۰ و ۴۳۰ نانومتر، نمونه ۷۲ ساعته در محدوده ۳۰۰ و ۴۰۰ نانومتر و پیک هایی که از بیومس باکتری در دمای ۵۰۰ درجه سلسیوس حاصل شد در محدوده ۳۰۰ و ۳۵۰ نانومتر بودند.

(ح) XRD باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۵۶۳۳: نتایج XRD اولیه در دمای ۵۰۰ درجه سلسیوس در نمودار ۲ پیک هایی در زاویه ۷۷° و ۶۴° داشت و به ترتیب سطوح (۱۱۳) و (۰۰۴) را نشان داد که شامل CuO بود. با استفاده از فرمول ۱ اندازه نانوذرات تشکیل شده ۴۰ نانومتر محاسبه شد که

د) حساسیت میکروبی: نتایج نشان داد که باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۵۶۳۳ در برابر تمام آنتی بیوتیک های مورد بررسی مقاومت داشت و تنها در برابر سولفامتوکسازول (SXT) حساسیت نشان داد (جدول ۴).

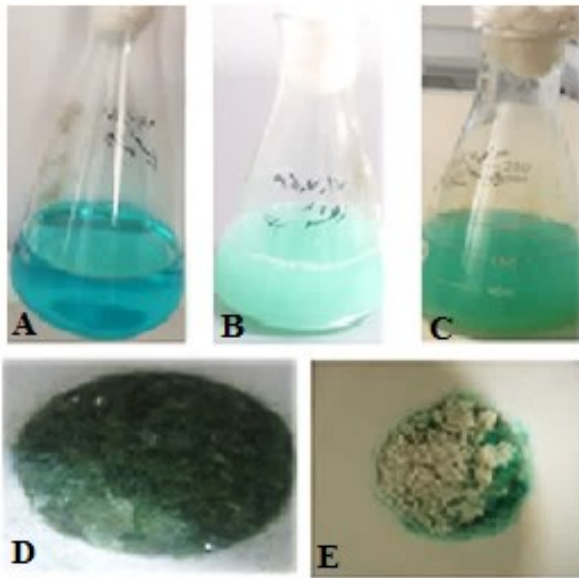
ه) تکنیک کلنی-PCR: نتایج شناسایی مولکولی سه سویه Cuw. 1، Cuw. 2 و Cuw. 3 جداسازی شده از دو پساب مسگری ۱ و ۲ و سویه های استاندارد آن ها در کلکسیون باکتری ها و قارچ های صنعتی ایران به عنوان شاهد در شکل ۱ ارائه شده است.

و) تولید نانوذرات مس توسط سویه ها: از میان باکتری های شناسایی شده تنها باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۵۶۳۳ توانایی تولید نانوذرات مس را داشت. این سویه محیط کشت آبی رنگ حاوی سولفات مس پنج آبه و یک گرم بیومس باکتری را پس از ۲۴ ساعت به رنگ سبز-آبی تغییر داد. سپس در دمای ۵۰۰ درجه سلسیوس به رنگ سبز و در دمای ۱۱۰۰

جدول ۴: حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری های جداسازی شده ی مقاوم به فلز مس .

نام باکتری	V	TE	CFM	P	GM	FOX	SXT	AMX	E	C	آنتی بیوتیک
											نام باکتری
استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه 5633	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس ۲۳ mm	مقاوم	مقاوم	مقاوم	استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه 5633
باسیلوس تویونسیس سویه NE2	حساس ۱۹/۳ mm	حساس ۲۸ mm	مقاوم	مقاوم	حساس ۱۹/۶ mm	حساس ۳۸ mm	مقاوم	مقاوم	حساس ۱۴/۶ mm	حساس ۲۳ mm	باسیلوس تویونسیس سویه NE2
آرتروباکتر آزیلیس سویه NE1	نیمه حساس ۱۱ mm	حساس ۴۰/۳ mm	مقاوم	مقاوم	حساس ۲۴/۶ mm	مقاوم	حساس ۳۸ mm	حساس ۲۷/۳ mm	نیمه حساس ۲۱/۶ mm	مقاوم	آرتروباکتر آزیلیس سویه NE1

تراسایکلین (TE)، اریتروماسین (E)، آموکسی سیلین (AMX)، کلرامفنیکل (C)، وانکوماسین (V)، پنی سیلین (P)، جتاماسین (GM)، سولفامتوکسازول (SXT)، سفوکسیتین (FOX)، سفیکسیم (CFM).

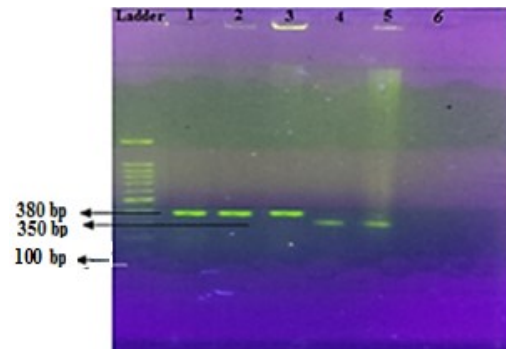


شکل ۲: مراحل تولید نانوذرات مس توسط باکتری استنتوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه 5633. (A) محلول ذخیره سولفات مس (۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه و ۰/۰۱ مولار سولفات مس پنج آبه)، (B) اضافه کردن یک گرم بیومس باکتری مورد نظر به محلول ذخیره سولفات مس، (C) تغییر رنگ محیط پس از ۲۴ ساعت و تولید نانوذرات مس، (D) نانوذرات مس تولید شده در دمای ۵۰۰ درجه سلیسیوس، (E) نانوذرات مس تولید شده در دمای ۱۱۰۰ درجه سلیسیوس.

(ط) ارزیابی TEM باکتری استنتوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه 5633: نتایجی که از اندازه، مورفولوژی و یکنواختی توزیع نانوذرات مس تولید شده در دمای ۵۰۰ درجه سلیسیوس توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) به دست آمد نشان داد که ذرات به طور عمده به شکل کروی و در برخی نواحی به صورت کلوخه ایی، انباشته یا پراکنده کنار هم قرار دارند و قطر آن‌ها ۴۰ نانومتر برآورد شد (شکل ۳).

بحث

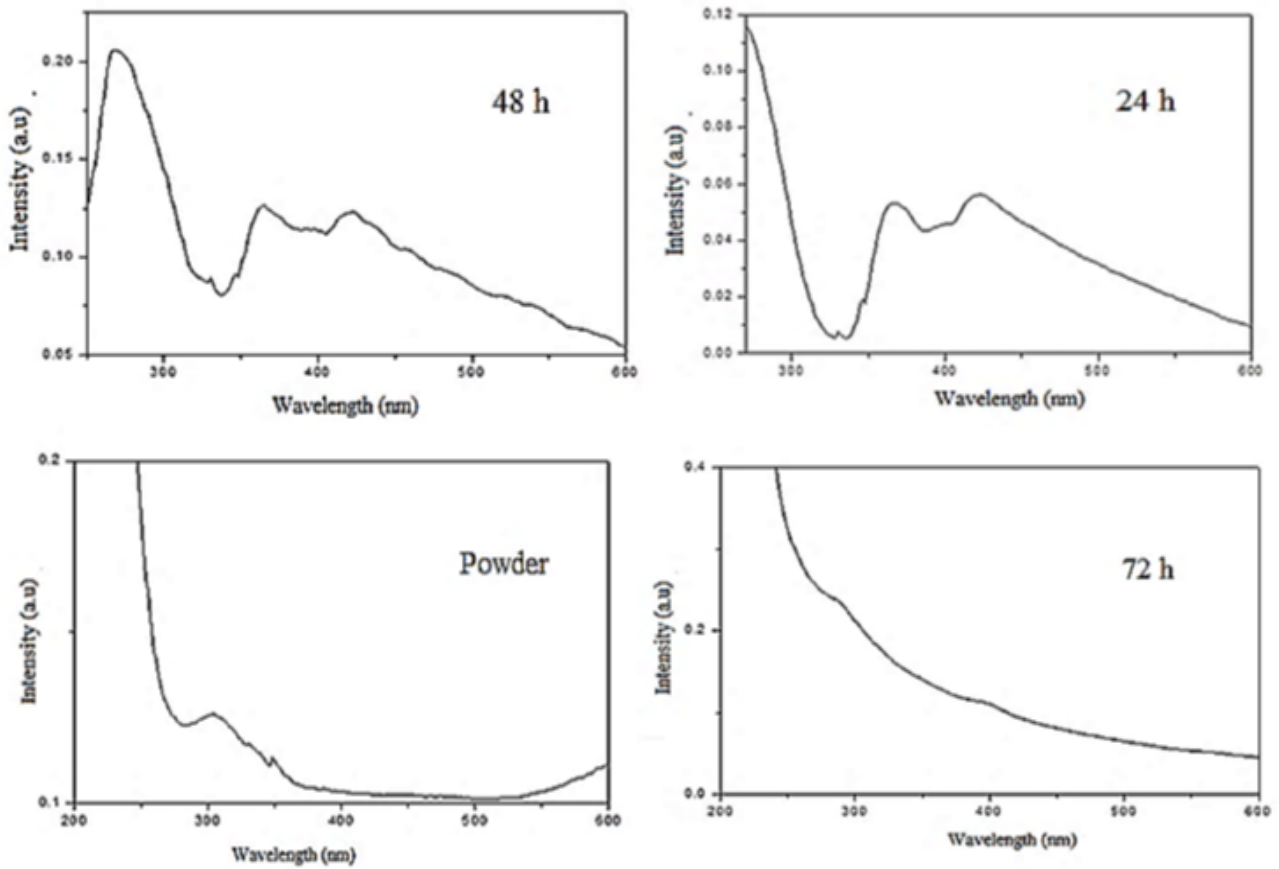
حضور فلزات سنگین با ایجاد مقاومت در محیط ارتباط دارد به طوری که میکروارگانیسم‌ها در حضور فلزات مکانیسم‌های مقاومتی را ایجاد می‌کنند که موجب انتخاب هم زمان گونه‌های مقاوم با قابلیت تحمل فلزی بالا می‌گردد (۱۹). در جمعیت باکتری‌هایی که تحت تأثیر آلاینده‌هایی مانند فلزات سنگین باشند، ژنوتیپ‌های جدید (ژنوتیپ‌های مقاوم) به نسل‌های



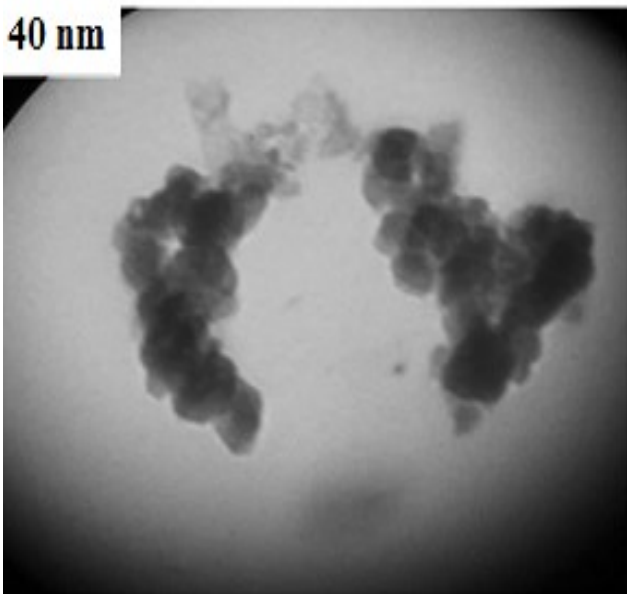
شکل ۱: الکتروفورز محصول ژن 16S rDNA باکتری‌های مقاوم به فلز مس. (Ladder) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون (۱) باسیلوس تویونسیس سویه NE2 (۳۸۰ جفت بازی، ستون ۲) کنترل مثبت ۳۸۰ جفت بازی (باسیلوس استونرسیس ۱۷۲۶)، ستون (۳) باکتری استنتوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه 5633 (۳۸۰ جفت بازی، ستون ۴) آرتروباکتر آریلیس سویه NE1 (۳۵۰ جفت بازی، ستون ۵) کنترل مثبت ۳۵۰ جفت بازی (آرتروباکتر سویه ۱۳۵۱)، ستون (۶) کنترل منفی.

با نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) و نتایج به دست آمده از بررسی طیف سنجی اسپکتروفتومتری مرئی-فرابنفش (UV-VIS) مطابقت داشت. نتایج XRD دوم در دمای ۱۱۰۰ درجه سلیسیوس در نمودار ۲ پیک‌هایی در زاویه‌های 21° ، 24° ، 23° ، 35° ، 42° ، 52° ، 56° ، 64° ، 71° ، 72° و 77° در سطوح (۶۰۰)، (۵۵۱)، (۱۱۰)، (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۰۲۰)، (۱۱۳)، (۲۲۰) و (۰۰۴) داشت که تمامی سطوح CuO را نشان دادند. به جز سطح 24° و 21° که مربوط به Cu بود و در زاویه 42° قرار داشت. اندازه نانوذرات تشکیل شده در مرحله دوم با توجه به فرمول دبای-شرر، ۶۲ نانومتر برآورد شد. نتایج XRD در مرحله دوم چند فاز بودن نانوذرات را مشخص کرد. نتایج مرحله اول و دوم با XRD با کارت مرجع نانوکریستال‌های مس (JCPDS NO. 45-0397)، (JCPDS NO. 65-2309) و (JCPDS No. 04-0836) همخوانی داشت.

فرمول دبای-شرر (فرمول ۱): $D = 0.9\lambda / \beta \cos\theta$
 در این فرمول D: اندازه دانه‌های بلوری، λ : طول موج اشعه X، β : پهنای پیک‌ها در نصف ارتفاع ماکزیمم، θ : زاویه بین پرتو تابش و بازتابش است.



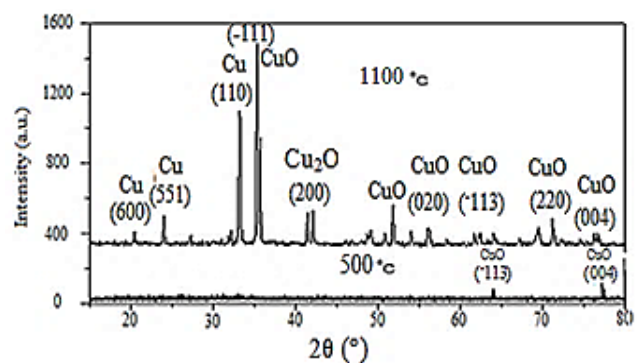
نمودار ۱: طیف اسپکتروفوتومتری فرابنفش-مرئی باکتری استنتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۵۶۳۳ در حضور سولفات مس ۰/۰۱ مولار در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و پودر حاصل از بیومس باکتری در دمای ۵۰۰ درجه سلیسیوس.



شکل ۳: تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره نانوذرات مس تولید شده توسط باکتری استنتروفوموناس مالتوفیلیا سویه 5633 در دمای ۵۰۰ درجه سلیسیوس، اندازه ذرات = ۴۰ نانومتر.

بعدی به ارت می‌رسند (۲۰).

منشاء مقاومت میکروبی به فلزات ناشی از تماس های ابتدایی با فلزات سمی و تداوم این تماس ها با آلاینده های محیطی است. پلاسمیدهای باکتریایی اغلب



نمودار ۲: تفرق پرتو ایکس نانوذرات مس تولید شده توسط باکتری استنتروفوموناس مالتوفیلیا سویه 5633.

ترکیبات آلی مقاوم به تجزیه و حضور یون های فلزی فعال در انواع پساب ها است (۱۲). در مطالعات سیگر (Seeger) و همکاران در سال ۲۰۱۲، شش سویه باکتریایی مقاوم به فلز مس از خاک آلوده به مس جداسازی شد. حداقل غلظت ممانعت کننده رشد در این باکتری‌ها در محدوده ۳/۱ تا ۴/۷ میلی مول بر لیتر بود (۲۲). در پژوهش انجام شده توسط گرس (Grass) و همکاران در سال ۲۰۱۰ میزان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد در جدایه ها در محدوده ۰/۷۵ تا ۳/۵ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد (۲۳).

ویرندر (Virender) و همکاران در سال ۲۰۱۰ چندین سویه مقاوم به فلز مس را از پساب یک کارخانه صنعتی در هند جداسازی نمودند که چهار سویه توانستند مس را در غلظت ۱۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر و چهار سویه دیگر مس را در غلظت بین ۲۲۰ تا ۲۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر تحمل کنند. همگی این باکتری‌ها متعلق به گونه *اشریشیا کلی* بودند (۲۴).

اگبیبی (Egbebi) و فاموروا (Famurewa) در سال ۲۰۱۱ از نمونه های بالینی بیماران (شامل نمونه های ادرار، خون، واژینال، گوش، بینی، بزاق، چرک، مایع مغزی-نخاعی، مایع منی و مدفوع) در ۵ بیمارستان در جنوب غرب نیجریه باکتری های مقاوم به فلز مس را جداسازی کردند. تمامی باکتری های جداسازی شده نسبت به غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر از فلز مس مقاوم بودند (۲۵).

وارنیام (Varenyam) و همکاران در سال ۲۰۱۴ با بررسی رودخانه یانگ تسه کیانگ چین، موفق به جداسازی ۶ باکتری مقاوم به فلز سنگین مس شدند. بالاترین میزان MIC برای فلز مس ۷/۵ میلی مولار گزارش گردید (۲۶).

این یافته از نظر میزان MIC با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر شباهت داشت. این تشابه به این صورت قابل توجه است که اولاً هر دو تحقیق بر روی پساب های صنعتی بوده است. در حالی که مطالعه اگبیبی و فاموروا بر روی فاضلاب های پزشکی و مطالعه سیگر و همکاران بر روی خاک های آلوده به مس بوده است. از آن جایی که نه تنها میکرو فلور انواع فاضلاب ها بلکه حتی میکرو فلور باکتریایی

دارای ژن های مقاومت به بسیاری از یون های سمی فلزات سنگین شامل Zn^{2+} ، Co^{2+} ، Hg^{2+} ، Ni^{2+} ، Ag^{+} ، Cd^{2+} ، Pb^{2+} و Cu^{2+} هستند. اما گاهی سیستم های مرتبط با مقاومت در ارگانیزم ها توسط ژن های کروموزومی تعیین می شوند. باکتری ها برای بقا در شرایط سخت محیطی به ویژه حضور فلزات سنگین مکانیزم های متعددی برای تحمل این فلزات دارند. به هر حال فشار انتخابی فلزات در محیط باعث ایجاد و تکامل مکانیزم های مختلفی در میکروارگانیزم ها برای مقاومت در برابر تنش فلزات سنگین می گردد. از این مکانیزم ها می توان به ممانعت از نفوذپذیری، جداسازی سلولی داخلی و خارجی، انتقال فعال، پمپ های برون ریز، سمیت زدایی آنزیمی و کاهش حساسیت هدف های سلولی به یون های فلزی که آنها را برای بقا در شرایط سخت محیطی امکان پذیر می سازد اشاره کرد (۱۲).

در این پژوهش، میزان فلز مس در پساب های مورد مطالعه کمتر از استانداردهای بین المللی و معادل ۴ میلی گرم بر لیتر بود. بنابراین با توجه به استانداردهای محیط زیست که توسط بخش کنترل آلودگی (PCD) ارائه شده است، پساب های مورد مطالعه در گروه پساب هایی با آلودگی ناچیز قرار می گیرد (۲۱).

آلبوغیش (Alboghobeysh) و همکاران در سال ۲۰۱۳ برای جداسازی باکتری های مقاوم به فلزات از پساب فاضلاب شهری و پساب مسگری استفاده کردند. محققین یاد شده غلظت مس در فاضلاب شهری را ۰/۲۶۸ میکروگرم بر لیتر و در پساب مسگری ۰/۱۳ میکروگرم بر لیتر گزارش نمودند (۱۲). در مطالعه حاضر، باکتری *باسیلوس تویونسیس* سویه NE2 کمترین میزان مقاومت را نسبت به فلز مس (۳/۵ میلی مولار) از خود نشان داد. بالاترین میزان MIC (۶ میلی مولار) مربوط به باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* سویه ۵۶۳۳ بود.

مطالعات نشان داده است که وجود بار منفی فراوان در سطح باکتری ها موجب جذب یون های مثبت می گردد. همچنین کاهش نسبت BOD به COD دلیل بر افزایش بیش از حد

سنگین به طور مستقیم بر توان جذب میکروارگانیسم ها در آب، سیستم های فاضلاب یا خاک مؤثر است. میزان جذب نه تنها به حیات میکروارگانیسم ها بلکه به زیستگاه میکروبی نیز وابسته است (۲۷).

آنیانو (Anyanwu) و نوآچوکو (Nwachukwu) در سال ۲۰۱۱ با بررسی تعدادی از خاک های آلوده و غیر آلوده، میکروارگانیسم های مقاوم به فلزات سرب، کروم و مس را جداسازی نمودند. سویه های جداسازی شده شامل از جنس های باسیلوس، کورینه باکتریوم، سودوموناس، آسیتوباکتر و تیوباسیلوس بودند (۲۸).

وانگ (Wang) و همکاران در سال ۲۰۱۳ در تحقیقات خود موفق به جداسازی ۱۱ باکتری مقاوم به فلزات سنگین سرب و مس از خاک معدن شدند. از میان باکتری های جداسازی شده گونه های باسیلوس و آرتروباکتر (*Arthrobacter*) بیشترین مقاومت را در برابر این دو فلز نشان دادند (۲۹). در پژوهش حاضر نیز از میان سه جنس جداسازی شده، دو جنس باسیلوس و آرتروباکتر نسبت به جنس استنتوتروفوموناس مقاومت کمتری را در برابر فلز مس از خود نشان دادند.

مطالعات نشان داده است که عواملی از جمله حضور ترکیبات غیرآنتی بیوتیکی مانند انواع ضد عفونی کننده ها، حشره کش ها، آفت کش ها و فلزات سنگین در محیط می تواند موجب مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها گردد. زیرا شاخص های ژنتیکی مقاومت به فلزات سنگین و آنتی بیوتیک ها اغلب در کنار یکدیگر بر روی پلاسمیدها و ترانسپوزون ها قرار گرفته اند. پلاسمیدها معمولاً برای بقای سلول میزبان ضروری نیستند. اما در شرایط خاص (مثلاً قرار گرفتن در برابر عوامل ضد میکروبی) قادر به ایجاد مقاومت و تضمین بقای سلول هستند. با توجه به این که فلزات سنگین اثرات نامطلوب فراوانی برای محیط زیست دارند، اما وجود باکتری های مقاوم به این فلزات که قادر به حذف آن ها از محیط باشند نقش مهمی در سم زدایی محیط زیست از این ترکیبات سمی و جلوگیری از اثرات نامطلوب آن ها بر موجودات زنده دارد. بنابراین می توان گفت که میان تحمل فلز و مقاومت به

اکوسیستم های خاک، آب و هوا با یکدیگر بسیار متفاوت می باشد، بنابراین می توان نتیجه گیری کرد که برای مقایسه باکتری های مقاوم به انواع فلزات سنگین و بررسی میزان MIC، گذشته از پساب باید موقعیت های فیزیکوشیمیایی، جغرافیایی محل مورد بررسی نیز یکسان باشند تا بتوان در میزان باکتری های مقاوم به فلزات سنگین قضاوت نمود.

در این پژوهش، بیشترین جنس باکتری های جداسازی شده از نوع گرم مثبت و تمامی باکتری ها از نوع باسیل بودند. نتایج مقاومت این باکتری ها در برابر فلز مس و تعداد زیادی از آنتی بیوتیک ها می تواند تا حدود زیادی مربوط به دیواره سلولی مقاوم این باکتری ها باشد که حدوداً از ۴۰ لایه پپتیدوگلیکان و بخش دیگری به نام تايكوئیک اسید تشکیل شده است. همچنین بیشتر باسیلوس ها اسپودار هستند. تمامی این ویژگی ها می تواند موجب مقاومت بودن این باکتری ها را در برابر انواع فلزات سنگین و آنتی بیوتیک ها توجیه نماید.

باکتری های گرم مثبت به دلیل ساختار دیواره سلولی ساده تر و داشتن میزان چربی کمتر، کنترل کمتری نسبت به ورود مواد خارجی نشان می دهند. در صورتی که باکتری های گرم منفی به دلیل دیواره سلولی و ساختار پروتئینی و لیپیدی پیچیده تری که دارند ورود و جذب آلاینده های معدنی موجود در محیط بیرونی این باکتری ها، از جمله فلزات سنگین با کنترل بیشتر و به میزان کمتری صورت می گیرد. مطالعات نشان داده است که غشای خارجی باکتری های گرم منفی ماهیت لیپیدی داشته که باعث می شود مولکول های آبدوست از آن دور نگه داشته شوند. البته مولکول های با وزن مولکولی کم در این نوع از باکتری ها با پروتئین های پورین به داخل سلول وارد می شوند. اما مولکول های بزرگ به آهستگی و کمتر به آن ها نفوذ می کنند و بنابراین مقاومت بالایی به آنها نشان می دهند (۲۷).

به طور کلی میکروارگانیسم ها به واسطه واکنش های بین یون های فلزی و سطوح باردار منفی میکروبی به فلزات اتصال می یابند. در این بین باکتری های گرم مثبت تمایل بیشتری برای اتصال به یون ها دارند. همچنین عوامل محیطی مانند رشد، وضعیت باکتری، چگونگی و مقدار سمی بودن فلز

شده عواملی هستند که به اندازه نانو ذرات وابسته اند. به عبارت دیگر ویژگی های نوری نانو ذرات مس به شدت وابسته به قطر نانوذرات است. طیف سنجی UV-VIS می تواند روشی ساده و قابل اعتماد برای نظارت بر پایداری محلول های نانوذرات مورد استفاده قرار گیرد. اما زمانی که نانوذرات بی ثبات شوند پیک اصلی به دلیل تخلیه نانوذرات پایدار به شدت کاهش می یابد (۸).

پیک های XRD نشان دهنده سطح متفاوتی از احیای سولفات مس توسط باکتری مورد نظر بود. نانو ذرات تولید شده به صورت کریستالی توسط دستگاه XRD تأیید شدند. اما در صورت متلاشی شدن باکتری ها در اثر تجمع نانوذرات و به دنبال آن آزاد شدن این ذرات در محیط مایع، تمامی نانوذرات آزاد شده به همراه لاشه باکتری ها در محیط مایع به فرم آمورف تبدیل می شوند. به همین دلیل توسط دستگاه XRD غیرقابل تشخیص می باشند. دلیل این امر به احتمال زیاد ساختار آمورف این نانوذرات و یا اتصال بقایای آلی آمورف محیط کشت به این ذرات است که مانع از ردیابی ساختار کریستالی آن ها با دستگاه XRD می شود (۳). اندازه متوسط نانوذرات در این پژوهش مطابق با نتایج XRD اول ۴۰ نانومتر و در XRD دوم ۶۲ نانومتر برآورد شد.

امیری (Amiri) و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش کردند که بزرگ تر شدن اندازه نانوذرات در مرحله دوم می تواند به دلیل حرارت بالا باشد. همچنین تک فاز یا دوفاز بودن نانوذرات را با بالا بردن دما می توان مشخص نمود (۱۸).

در مطالعه میرهندی و همکاران نانو ذرات مس تولید شده توسط انواعی از میکرو ارگانیسم ها تک فاز بودند و به رنگ زرد مشاهده شدند که با نتایج این تحقیق مطابقت نداشت (۸).

در تحقیق رحمان (Rahman) و همکاران در سال ۲۰۰۹ نانو ذرات مس تولید شده توسط فورمیدیوم سیانوباکتریوم (*Phormidium cyanobacterium*) از نظر شکل و رنگ با پژوهش حاضر مطابقت داشت (۱۵). به طوری که اندازه نانوذرات ۴۰-۱۰ نانومتر بود و به صورت دوفاز Cu_2O و CuO مشاهده شد. نتایج XRD در این مطالعه با گزارش آچارپولو

آنتی بیوتیک ها ارتباط وجود دارد. به همین دلیل حضور فلز سنگین در محیط به عنوان یک آلاینده نه تنها باعث افزایش باکتری های مقاوم به فلز بلکه باعث افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی نیز می گردد (۱۲ و ۳۰).

در این مطالعه ارتباط مستقیمی بین تحمل فلز و مقاومت بالا در برابر تعدادی از آنتی بیوتیک های رایج مورد استفاده در باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۵۶۳۳ مشاهده شد. از طرف دیگر این باکتری بالاترین جذب فلز مس را در بین سویه های شناسایی شده داشت.

نتایج حاصل از این پژوهش در مقایسه با یافته های سایر محققین نشان داد که با توجه به این که ژن های مقاومت به فلزات سنگین و در مقابل آن ژن های مربوط به مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها اکثراً بر روی یک پلاسمید کد می شوند، اما در باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا ارتباط منطقی بین تولید نانوذره مس توسط این باکتری و مقاومت بالای آن در برابر فلز مس و آنتی بیوتیک های مورد مطالعه وجود داشت.

از طرف دیگر بسیاری از محققان نشان داده اند که مکانیسم تولید نانو ذرات توسط میکروارگانیسم ها یک فرآیند آنزیمی پیچیده است که در این واکنش در واقع یک سیستم دفاعی در برابر اثرات سمی یون های فلزات در محیط می باشد. آنزیم های احیاکننده (ردوکتاز) با انتقال الکترون به یون فلزی در محیط، آن را احیا نموده و به شکل ذرات با اندازه نانو رسوب می دهند (۶).

همچنین بررسی ها نشان داده است که آنزیم های گلوکز اکسیداز و کاتالاز موجود در باکتری ها عوامل احیا کننده ایی تولید می کنند که نقش مهمی در احیا فلزات به نانوذرات بر عهده دارند (۳۱). نتایج طیف سنجی UV-VIS در این پژوهش پیک هایی را بین ۲۵۰ تا ۴۳۰ نانومتر نشان داد.

میرهندی (Mirhendi) در سال ۲۰۱۲ نشان داد داشت که نانوذرات مس بین ۳۲۰ تا ۴۳۰ نانومتر جذب نور دارند و جذب نوری نانو ذرات در محدوده های مختلف، سنتز بیشتر نانو ذرات را نشان می دهند (۸). جا به جا شدن پیک ها و تغییر در شدت آن ها و ایجاد تغییرات در رنگ های مشاهده

سورفکتانت مناسب، نانوساختارهای کلوخه ای را از یکدیگر جدا نمود (۱۷).

نتیجه گیری

در این پژوهش با استفاده از سنتز زیستی، نانو ذرات مس توسط باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۵۶۳۳ جدا شده از پساب مسگری ۱ به دو صورت Cu و CuO در اندازه های ۴۰ و ۶۲ نانومتر و به شکل کروی تولید شد. این روش به دلیل سازگاری با محیط زیست از اهمیت بالایی برخوردار است. نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که این سویه توانایی تولید نانو ذرات مس چند فازی را دارد و برای کاربرد این نانو ذرات در صنعت و پزشکی، باید اقدام به جداسازی ترکیبات و تک فاز کردن این نانو ذرات نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، به ویژه پرسنل محترم آزمایشگاه تحقیقاتی این دانشگاه به دلیل فراهم سازی امکانات آزمایشگاهی و همچنین از همکاری و مساعدت پرسنل شرکت دانش بنیان تالی ژن پارس واقع در شهرک علمی تحقیقاتی اصفهان کمال امتنان را دارند.

(Acharyulu) و همکاران در سال ۲۰۱۴ که استفاده از فیلاتنتوس آماروس (*Phyllanthus amarus*) موفق به تولید CuO شدند، هم خوانی داشت (۳۲).

شفیعی (Shafiei) و همکاران در سال ۲۰۱۴ بیوستز CuO را توسط باکتری آئروموناس هیدروفیلا گزارش کردند که نتایج XRD آن ها با مطالعه حاضر شباهت داشت (۳۳). در این پژوهش به منظور مقایسه اندازه، مورفولوژی و یکنواختی توزیع نانو ذرات تولید شده تصویر TEM تهیه شد و ذرات به شکل کروی مشاهده شدند. همچنین نانو ذرات در برخی از نواحی مانند نتایج محصلی (Mohaseli) و پورسیدی (Pourseyedi) در سال ۲۰۱۲ به صورت انباشته یا پراکنده کنار هم قرار داشتند (۳). افتخاری (Eftekhari) در سال ۲۰۱۶ نشان داد که یکی دیگر از ویژگی های فیزیکی بسیار مهم نانو ذرات، شکل آنها است که می تواند پاسخ های سلولی نسبت به ذرات را تحت تأثیر قرار دهد (۳۴).

قرایلو (Qrayelu) و معین درباری (Moein darbari) در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که کلوخه ای شدن ذرات یا تجمع نانوساختارها به دلیل وجود نیروی جاذبه واندروالس میان نانوساختارها می باشد که باعث می شود این مواد بتوانند به سمت یکدیگر جذب و به یکدیگر بچسبند. می توان از طریق تغییر در دما، pH، قدرت یونی محلول و اولتراسونیک و افزودن

References

1. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. J Nanotech Bio Med. 2010; 6(2): 257-262.
2. Mandal D, Bolander ME, Mukhopadhyay D, Sarkar G, Mukherjee P. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. J Appl Microbiol Biotech. 2006; 69(5): 485-492.
3. Mohaseli T, Pourseyedi SH. Synthesis green and silver nanoparticle characterization using aqueous extracts of sesame plant. J Biotech Tarbiat Modarres Uni. 2012; 6(1): 10-20. [In Persian]
4. Emtiazi G. 2013. Investigation of the effective genes in the resistance of heavy metals and steel nano oxides in isolated *Pseudomonads* and their biological control by microbial antagonists. Faculty Basic Sciences Isfahan University.

5. Pourali P, Baseri Salehi M, Afsharnezhad S, Behravan J. Biological production and assessment of the antibacterial activity of gold nanoparticles. J Microbial World. 2013; 6(3): 198-211. [In Persian]
6. Hosseini MR, Shaffie M. Kinetic study of the biological copper removal from a copper sulfate solution in the form of copper sulfide nanoparticles. J Sep Sci Eng. 2013; 4(2): 75-82. [In Persian]
7. Suleiman M, Mousa M, Hussein A. Wastewater disinfection by synthesized copper oxide nanoparticles stabilized with surfactant. J Mat Env Sci. 2015; 6(7): 1924-1937.
8. Mirhendi M. 2012. Production of iron, zinc and copper nanoparticles by microbial biofilm and pure culture. Faculty Basic Sciences Isfahan University.
9. Abboud Y, Saffaj T, Chagraoui A, El Bouari A, Brouzi K. Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles (CONPs) produced using brown *alga* extract (*Bifurcaria bifurcata*). J Appl Nanosci. 2014; 4: 571-576.
10. Grass G, Stanto CE, Morais PV. Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic copper surfaces. Appl Environ Microbiol. 2010; 5: 134-1348.
11. Shahsanaie Ganirani M, Ahadi AM, Doudi M. Biosorption of silver by bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* strains MS8 from the wastewater treatment plant in Isfahan silver. J Microbial World. 2015; 8(2): 158-167. [In Persian]
12. Alboghobeys H, Tahmourespour A, Doudi M. Antibiotic resistance in isolated bacteria from urban sewage and copper smeltery industrial wastewater. J Gorgan Uni Med Sci. 2013; 15(1): 95-102. [In Persian]
13. Rajbanshi A. Study on heavy metal resistant bacteria in Guheswori Sewage treatment plant. J Our Nature. 2008; 6(1): 52-57.
14. Ahrabi M, Hosseini F, Akhavan Sepahi A. Isolation and identification of bacteria with potential environmental cleanup selenite salts of environmental resources. J Biotech Cell Molecule Bio. 2013; 4(13): 86-91. [In Persian]
15. Rahman A, Ismail A, Jumbianti D, Maghalena S, Sudrajat H. Synthesis of copper oxide nanoparticles by using *Phormidium cyanobacterium*. Indonesia J Chem. 2009; 9(3): 355-360.
16. Vashney R, Bhadauria S, Gaur MS, Pasricha R. Characterization of copper nanoparticles synthesized by a novel microbiological method. J Min Met Mat Society. 2010; 62(12): 102-104.
17. Qrayelu D, Moein darbari M. Factors contributing to the spread of appropriate samples for laboratory imaging TEM. Iran J Lab Know. 2013; 1: 30-36. [In Persian]
18. Amiri GHR, Yousefi MH, Abolhassani MR, Manouchehri S, Keshavarz MH, Fatahian S. Magnetic properties and microwave absorption in Ni-Zn and Mn-Zn ferrite nanoparticles synthesized by low-temperature solid-state reaction. J Mag Mag Mater. 2010; 323(6): 730-734.
19. Laila MA, Wagdy KB, Thanaa HA, Karima FM. Heavy metal resistance and gene expression analysis of metal resistance gene in Gram-negative and Gram-positive bacteria present in

- Egyptian soil. J Appl Sci Env Sanit. 2011; 6(2): 201-211.
20. Edward raja C, Selvam GS, Omine K. Isolation, identification and characterization of heavy metal resistant bacteria from sewage. Int J Sym Geo disaster prevent Geo Asia. 2009; 205-211.
 21. Sengupta S, Chattopadhyay MK. Antibiotic resistance of bacteria: A global challenge. J Sci Ed. 2012; 17(2): 177-191.
 22. Seeger M, Altimira F, Bravo G, Gonzalez M, Rojas LA, Yanez C. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. J Bio Med Cent Microbiol. 2012; 12(193): 1-12.
 23. Grass G, Morais PV, Santo CE. Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic Copper surfaces. J Appl Env Microbiol. 2010; 77(5): 1341-1348.
 24. Virender S, Chauhan PK, Kanta R, Dhewa T. Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to heavy metal contaminants. Int J Pharmacol Sci Rev Res. 2010; 3(2): 164-167.
 25. Egbebi AO, Famurewa O. Heavy metal resistance among *Klebsiella* isolates in some parts of southwest Nigeria. Asia J Med Sci. 2011; 3(5): 183-185.
 26. Vareniam A, Qiuzhuo Z, Wei-Ning X, Duanchao W. Identification of heavy metal resistant bacteria isolated from Yangtz River, China. Int J Agri Bio. 2014; 16(3): 619-623.
 27. Nasr Azadani A, Tahmourespour A, Hoodaji M. Determination of the threshold of bacterial tolerance to lead, zinc and cadmium in three types of industrial wastewater. J Ecol. 2010; 36 (56): 75-86. [In Persian]
 28. Anyanwu CU, Nwachukwu ON. Heavy metal resistance in bacteria isolated from contaminated and uncontaminated soils. Int J Res Chem En. 2011; 1(1): 173-178.
 29. Wang G, Shi Z, Cao Z, Qin D, Zhu W, Wang Q, Li M. Correlation models between environmental factors and bacterial resistance to antimony and copper. Plos One. 2013; 8(10): 1-11.
 30. Akhavan SA, Sharifian S, Zolfaghari MR, Khalili DM. Evaluation of resistance in intestinal coli forms isolated from industrial wastewater, domestic wastewater and various parts of the wastewater treatment system of Arak city. J Cell Mol Res. 2014; 27(2): 167-178. [In Persian]
 31. Zayats AV, Smolyaninov I, Maradudin A. Nano-optics of surface plasmon polaritons. J Phy Rep. 2005; 408(3): 131-314.
 32. Acharyulu NPS, Dubey RS, Swaminadham V, Kalyani RL, Kollu P, Pammi SVN. Green synthesis of CuO nanoparticles using *Phyllanthus amarus* leaf extract and their antibacterial activity against multidrug resistance bacteria. Int J Eng Res Tech. 2014; 4(3): 639-641.
 33. Shaffiey SF, Ahmadi M, Shaffiey SR, Shapoori M, Varshoie H, Azari F. Synthesis of copper oxide (CuO) nanoparticles and surveying its bactericidal properties against *Aeromonas hydrophila* bacteria. J Fasa Uni Med Sci. 2014; 5(1): 36-43. [In Persian]
 34. Eftekhari BS. The physical properties of nano-systems approach in the design of drug delivery. J Month Nanotech. 2016; 15(3): 32-35. [In Persian]



Biosynthesis of copper nanoparticles by *Stenotrophomonas maltophilia*

Zahra Amirpoor¹, Monir Doudi², Gholamreza Amiri³

¹M.Sc, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

²Assistant Professor, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

³Assistant Professor, Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Heavy metals are environmentally sustainable and durable pollutants that have become a world problem. As microorganisms show high resistance to heavy metals and can purify the environment and produce nanoparticles, the present study was designed to produce copper nanoparticles from copper-resistant bacteria isolated from wastewater of two copper workshops in Isfahan.

Materials & Methods: In this cross-sectional study, wastewater samples were collected from two copper workshops in Isfahan. The physicochemical factors of the wastewater, the minimum inhibitory concentration of bacteria (MIC) to copper and their resistance to several antibiotics were investigated. Morphological, biochemical and molecular identification tests were carried out on samples. Then the biomass of copper-resistant bacteria was added to the copper sulfate pentahydrate stock ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) and the results were evaluated by Ultraviolet-Visible spectrophotometer (UV-VIS), X-ray diffraction (XRD) and Transient Electron Microscopy (TEM).

Results: Among the studied bacteria, the *Bacillus toyonensis* strain NE2 with the MIC of 3.5 mM and *Arthrobacteragilis* NE1 with MIC of 4 mM from copper workshop 2 and *Stenotrophomonas maltophilia* strain 5633 with the MIC of 6 mM from copper workshop 1 were isolated. Among these isolates, only *S. maltophilia* strain 5633 was able to synthesize copper nanoparticles. Peaks created in the range of 250-430 nm confirmed the presence of Copper (Cu) and Copper Oxide (CuO) particles.

Conclusion: The findings of this study showed that the isolated bacteria could be a good candidate to remove copper from wastewater and to biosynthesize copper nanoparticle.

Keywords: Biosynthesis, Copper nanoparticles, UV-VIS, XRD, TEM.

Correspondence to: Monir Doudi

Tel: +98 3137420134

E-mail: doudi@iaufala.ac.ir

Journal of Microbial World 2018, 11(1): 73-87.