



سنتز زیستی نانوذرات تلوریم بوسیله سویه‌ی باکتری *Brevibacillus* sp.

TR2211 جداسازی شده به‌عنوان بیوکاتالیست

مراحم آشنگرف*، سیده زهرا میرزایی

علوم زیستی، علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، کردستان

چکیده: نانوذرات تلوریم کاربردهای قابل توجه درمان بیماری‌های عفونی، تصویربرداری، سامانه تحویل هدفمند دارو، اثرات ضدانعقادی، اثرات ضدالتهابی و درمان انواع تومورها دارند. در این پژوهش، پتانسیل سویه‌های باکتری آزری به‌عنوان زیست کاتالیست در کاهش زیستی اکسی‌آنیون تلوریت به تلوریم عنصری مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات تلوریم سنتز شده بوسیله‌ی روش‌های آنالیز دستگاهی مانند طیف‌سنجی UV-visible، طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس، طیف‌سنجی فرسرخ تبدیل فوریه و میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. در این راستا، ۱۳ سویه‌ی باکتری مقاوم نسبت به اکسی‌آنیون تلوریت براساس روش غنی‌سازی جداسازی شدند. از میان ۱۳ سویه‌ی باکتری جداسازی شده، سویه‌ی TR2211 دارای توان بالا در تهیه برون‌سلولی نانوذرات تلوریم بود. سویه‌ی مذکور از نظر صفات فنوتیپی و مولکولی شناسایی و در جنس *Brevibacillus* (شماره دسترسی در بانک ژنی MK719235) رده بندی شد. در نهایت، تولید برون سلولی نانوذرات تلوریم سنتز شده تحت شرایط بهینه‌ی واکنش بررسی شد. نتایج نشان داد، نانوذرات سنتزی با میانگین اندازه‌ی ۳۱ نانومتر در غلظت بهینه تلوریت ۱/۵ میلی‌مولار، غلظت زیست توده ۴۰ گرم در لیتر، pH بهینه برابر ۷/۵ و دمای بهینه ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و پس از ۱۲۰ ساعت گرماگذاری تحت شرایط سلول در حال استراحت تولید شدند. پژوهش حاضر نخستین گزارش از تهیه برون‌سلولی نانوذرات کروی شکل تلوریم عنصری با سویه‌ی باکتری TR *Brevibacillus* 2211sp. است.

واژگان کلیدی: سنتز برون سلولی، نانوذرات تلوریوم، طیف سنجی، *Brevibacillus* 2211sp. TR

m.ashengroph@uok.ac.ir; mrhashengroph@gmail.com

شود [۱]. تلوریم در انفجار کلاهک‌ها، خنک کردن و سخت شدن فولاد و به صورت گسترده‌ای در سرامیک‌ها و سلول‌های فتوولتائیک استفاده می‌شود و به‌عنوان رنگ در شیشه‌ها کاربردهای فراوانی دارد. همچنین، به‌عنوان یک معرف (تلوریم کلرید و تلوریم دی‌اکسید) در تولید رنگ سیاه برای رنگ کردن وسایل نقره‌ای استفاده می‌شود [۲ و ۳]. نانوذرات تلوریم عنصری در درمان بیماری‌های عفونی از جمله بیماری جذام، سل، بیماری‌های پوستی، عفونت‌های شدید چشمی، ویژگی ضدباکتریایی برای باکتری‌ها در حالت بیوفیلیم‌ها و درمان کیست-ها کاربرد دارند. نانوساختارهای تلوریم در برچسب زدن،

۱- مقدمه

تلوریم عنصری به‌عنوان یک شبه‌فلز کاربردهای قابل توجهی در دستگاه‌های خانگی و فرآورده‌های صنعتی به دلیل ویژگی حرارتی، نوری و نیم‌رسانا بودن دارد. تلوریم وسیعی در مدارهای الکترونیکی و دستگاه‌ها، باتری‌های قابل شارژ، مواد ترموالکترونیک، دستگاه‌های خنک کننده و پانل‌های خورشیدی دارد. علاقه‌ی زیاد به تلوریم باعث شده که گزارش‌های زیادی در مورد منحصر به فرد بودن ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و کاربردهای بالقوه‌ی آن در زمینه‌ی فناوری زیست محیطی ثبت

تصویبررداری، سامانه تحویل هدفمند دارو، ویژگی ضدقارچی، آنتی‌باکتریال، آنتی‌اکسیداتی و کاهش مقدار سطح لیپیدهای غشا نقش دارند. از کاربردهای دیگر نانوساختارهای تلوریم می‌توان به اثرات ضد انعقادی در آئمی سلول‌های داسی شکل، سندرم نقص ایمنی، سرطان‌ها، مهارکننده‌ی کاسپازها و کاتپسین‌ها، تاثیرات ضد‌آنژیوگرام و بازدارنده‌ی اینترلوکین-۱۰ (حساسیت‌تومورها به شیمی‌درمانی) اشاره کرد. افزون‌بر موارد ذکر شده ویژگی مانند، اثرات ضدالتهابی، ضد تصلب شریان و دیگر کاربردهای آن، محافظت سلولی، محافظت کبد در برابر تماس شدید با استامینیفن است [۴]. نانوذرات تلوریم بر آنزیم اسکوالن مونواکسیژناز که یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوستنز کلاسترول، ارگوسترول و فیتواسترول در سنتز لیپیدهای مهم غشای پلاسمایی سلول‌های مخمر و کپک قارچی هستند، اثرات بسزایی دارند. بیماری‌هایی که در معرض مخمر *Candida albicans* قرار گرفته‌اند که باعث اختلالات پوستی، مخاطی و یا عفونت‌های سیستمیک می‌شود، نانوذرات تلوریم باعث بازدارندگی رشد این قارچ به وسیله‌ی تعامل با متابولیسم استرول‌های غشایی می‌شود [۵]. انواع روش‌های متفاوت فیزیکی و شیمیایی برای سنتز نانوذرات فلزی از جمله تلوریم وجود دارد. در روش‌های سنتزی شیمیایی ما نیازمند مواد شیمیایی قوی و عوامل حفاظتی مانند سدیم‌بوروهیدرات، سدیم‌سیترات و الکل هستیم که بیشتر سمی و قابل اشتعال بوده و به علت مسائل زیست محیطی به آسانی قابل دفع نیستند. به‌عنوان مثال، در سنتز نانوذرات با استفاده از روش پلی‌آل که یک روش سنتزی مبتنی بر فاز مایع در الکل‌های چند بنیانی با نقطه جوش بالا است و از متانول و اتانول استفاده می‌شود. همچنین، در بسیاری از روش‌های شیمیایی از جمله روش تخریب حرارتی سنتز نانوذرات در چند مرحله و در دماهای بسیار بالا انجام می‌شود. روش‌های فیزیکی نیز به دما و فشار بالا برای روند تولید نانوذرات نیاز دارند. هرچند در سنتز نانوذرات روش‌های شیمیایی و فیزیکی رایج‌تر هستند اما به دلیل استفاده از مواد شیمیایی سمی، کاربردهای زیست پزشکی این نانوذرات به‌خصوص در زمینه‌های بالینی را به شدت محدود می‌کند [۶]. این در حالی است که در روش‌های زیستی به هیچ وجه از مواد سمی و خطرناک استفاده نمی‌شود و سازگار با محیط زیست است. همچنین، مقدار کاهش یون‌های فلزی با استفاده از

عوامل زیستی بسیار سریع‌تر بوده و در شرایط دما و فشار محیط انجام می‌شود. استفاده از زیست توده برای سنتز نانوذرات فرایندی بسیار ساده بوده و به راحتی در محیط زیست دفع می‌شود و همچنین، پردازش پایین دست زیست‌توده بسیار آسان است. نکته حایز اهمیت دیگر این است که روش زیستی یک روش ارزان و باصرفه اقتصادی است زیرا در روش زیستی با استفاده از فرایند آنزیمی، استفاده از مواد شیمیایی گران قیمت حذف می‌شود. همچنین، انرژی مصرفی در این روش بسیار کم‌تر از روش‌های شیمیایی است. بنابراین، با توجه به نکات بالا، هرچند با روش‌های شیمیایی و فیزیکی می‌توان مقدار زیادی نانوذره با اشکال متفاوت تولید کرد اما این روش‌ها قدیمی، پیچیده و پرهزینه هستند و باعث تولید ضایعات سمی می‌شوند که نه تنها به محیط زیست بلکه به سلامت انسان نیز آسیب می‌رسانند [۷]. در نهایت با توجه به مشکلات بیشتری که در روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای ساخت نانوذرات وجود دارد، استفاده از میکروارگانیسم‌های متفاوت به‌عنوان نانوکارخانه‌های بالقوه سبز برای تولید نانوذرات همسو و سازگار با محیط زیست، پایدار و مقرون به صرفه از لحاظ اقتصادی پیشنهاد شده است. اگرچه سنتز زیستی نانوذرات فلزی از جمله آهن، مس، نقره، طلا، پلاتین، پالادیم، کادمیم، روی و غیره در طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها انجام شده است [۸]. با این حال، تولید زیستی نانوذرات تلوریم تنها در تعداد محدودی از سویه‌های قارچی از جمله *Aspergillus welwitschiae* [۹] و *Penicillium chrysogenum* [۱۰] و سویه‌های باکتری شامل *Basilus sp. strain BZ* [۴]، *Lactobacillus plantarum* [۱۱] و همچنین، *Bacillus selenitireducens* [۱۲] گزارش شده است. این پژوهش بر جداسازی سویه‌های باکتریایی بومی با قابلیت تحمل پذیری بالا به یون سمی تلوریت و امکان استفاده از آنها به‌عنوان کاتالیست‌های زیستی برای سنتز نانوذرات تلوریم متمرکز شده است.

۲- بخش تجربی

۲-۱- روش غنی‌سازی

برای غنی‌سازی سویه‌های باکتری آبزی بومی مقاوم به یون سمی تلوریت، نمونه‌گیری از عمق ۱۵ تا ۳۰ سانتیمتری از

باکتریایی در غلظت مشخصی از تلوریت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند [۱۴].

۳-۲- بررسی توانایی تولید برون سلولی نانوذرات تلوریم با سویه منتخب

بررسی توانایی تولید برون سلولی نانوذرات تلوریم سویه‌ی باکتریایی با مقاومت بالا به اکسی‌آنیون تلوریت تحت فرایند سلول‌های رویشی مورد بررسی قرار داده شد. ابتدا، یک لوپ از کلنی باکتری تازه رشد یافته بر محیط کشت جامد لوریابرتانی آگار (کشت ۲۴ ساعته) را در ارلن حاوی محیط مایع لوریا برتانی تلقیح کردیم. پس از گذشت ۴۸ ساعت رشد در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰rpm، اکسی‌آنیون تلوریت در غلظت نهایی ۰/۵ میلی مولار افزوده شد. سپس، مایع رویی از توده زیستی با استفاده از سانتریفیوژ کردن (۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) جدا شد. در انتها، جذب نمونه‌ها در گستره‌ی مربوط به پیک جذبی نانوذرات تلوریم (۵۰۰-۷۰۰ نانومتر) با روش طیف‌سنجی گرفته شد و مورد مقایسه قرار گرفت [۹]. بطور همزمان از محلول تلوریت پتاسیم (بدون تلقیح توده‌ی زیستی) در شرایط مشابه، به عنوان محیط کنترل استفاده شد.

۴-۲- بررسی توانایی تولید برون سلولی نانوذرات تلوریم با سویه منتخب

بررسی توانایی تولید برون سلولی نانوذرات تلوریم سویه‌ی باکتریایی با مقاومت بالا به اکسی‌آنیون تلوریت تحت فرایند سلول‌های رویشی مورد بررسی قرار داده شد. ابتدا، یک لوپ از کلنی باکتری تازه رشد یافته بر محیط کشت جامد لوریابرتانی آگار (کشت ۲۴ ساعته) را در ارلن حاوی محیط مایع لوریا برتانی تلقیح کردیم. پس از گذشت ۴۸ ساعت رشد در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ rpm، اکسی‌آنیون تلوریت در غلظت نهایی ۰/۵ میلی مولار افزوده شد. سپس، مایع روئی از توده زیستی با استفاده از سانتریفیوژ کردن (۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) جدا شد. در انتها، جذب نمونه‌ها در گستره‌ی مربوط به پیک جذبی نانوذرات تلوریم (۵۰۰-۷۰۰ نانومتر) با روش طیف‌سنجی گرفته شد و مورد مقایسه قرار گرفت [۹]. بطور

آب‌های جمع‌آوری شده از مناطق متفاوت ایران (اهواز، خراسان، رشت، خرم‌آباد، اصفهان، شهرکرد، سرپل ذهاب از استان کرمانشاه) انجام شد. نمونه‌های آب در ظروف درب دار استریل جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا هنگام استفاده نگهداری شدند. بیست میلی لیتر از نمونه‌های آب جمع‌آوری شده به لوله‌های فالكون ۴۵ میلی لیتری استریل منتقل و در دور ۴۵۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، محلول رویی را دور ریخته و مقدار یک میلی لیتر از مایع تحتانی به محیط‌های کشت غنی شده و انتخابی لوریابرتانی آگار (تریپتون ۱۰ گرم در لیتر، عصاره مخمر ۵ گرم در لیتر، نمک سدیم کلرید ۵ گرم در لیتر و آگار ۲۰ گرم در لیتر) منتقل شد. به محیط‌های کشت گفته شده، یون تلوریت در غلظت نهایی ۰/۵ میلی مولار، پس از استریل شدن با فیلترهای سرسرنگی ۰/۲۵ میکرونی، افزوده شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. کلنی‌های باکتری با استفاده از ویژگی‌های ظاهری مشخص شدند. به منظور خالص سازی سویه‌های باکتری غنی شده، هر کلنی باکتری به محیط‌های کشت لوریا برتانی آگار حاوی ۰/۵ میلی مولار تلوریت منتقل و به روش خطی کشت داده شد. تجدید کشت تا به دست آوردن اطمینان از خالص بودن سویه‌های باکتری انجام شد [۱۳].

۲-۲- تعیین الگوی مقاومت سویه‌های باکتری نسبت به اکسی‌آنیون تلوریت

الگوی مقاومت سویه‌های باکتری نسبت به یون سمی تلوریت با روش رقت در آگار تعیین شد. برای این منظور به ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر از لوریا برتانی آگار ذوب شده، غلظت‌های مشخصی از یون تلوریت (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵، ۸، ۸/۵، ۹، ۹/۵، ۱۰، ۱۰/۵، ۱۱، ۱۱/۵، ۱۲ و ۱۲/۵ میلی مولار) افزوده و سپس داخل پلیت‌ها ریخته شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر از کشت باکتریایی (کدورت معادل استاندارد نیم مک فارلند) مورد نظر را به صورت نقطه‌ای بر هر یک از پلیت‌ها کشت داده و برای جلوگیری از آلودگی دور هر پلیت را به وسیله پارافیلیم مسدود کرده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از این دوره زمانی، پلیت‌ها برای بررسی مقدار مقاومت سویه‌های

همزمان از محلول تلوریت پتاسیم (بدون تلقیح توده‌ی زیستی) در شرایط مشابه، به‌عنوان محیط کنترل استفاده شد.

۲-۵- شناسایی فنوتیپی و ملکولی سویه‌ی منتخب

تشخیص اولیه سویه‌ی باکتری منتخب براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی اعم از بررسی شکل میکروسکوپی سلول با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، تست‌های کاتالاز و اکسیداز، کاهش نیترات، واکنش متیل رد-وژپروسکوئر، تولید اسید از منابع کربوهیدراتی (فروکتوز، مالتوز، سوکروز، تری‌هالوز، مانیتول، آرابینوز، سلوبیوز و اینوزیتول)، رشد در دماهای متفاوت، رشد در pHهای متفاوت، رشد در درصد‌های متفاوت نمک سدیم کلرید، آبکافت ژلاتین و اوره طبق دستورالعمل Simbert and Krieg (۱۹۹۴) سنجیده شد [۱۵]. در ادامه، با هدف تعیین هویت دقیق سویه باکتری منتخب، از روش مولکولی و آنالیزهای فیلوژنتیکی استفاده شد. برای این منظور، ابتدا DNA ژنومی سویه‌ی باکتری منتخب با کیت استخراج DNA و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. تکثیر قطعه ژنومی 16S rDNA سویه باکتری Cu25 با استفاده از پرایمرهای همگانی fd1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) و rp2 (ACGGCTACCTTGTTACGACTT) انجام شد [۱۶]. فراورده تکثیری ژن 16S rDNA طبق روش آشنگرف و همکاران شناسایی شد [۱۳]. فراورده خالص PCR برای تعیین توالی به کمپانی ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. نتایج تعیین توالی با استفاده از الگوریتم BLAST در سایت NCBI مقایسه و ردیف‌سازی شده و نزدیک‌ترین توالیها به آن به‌عنوان توالی مرجع انتخاب شد. در نهایت، درخت فیلوژنتیکی برای سویه‌ی مذکور با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 و براساس روش Neighbor-joining و با بوت استرپ ۱۰۰ تکرار ترسیم شد. همچنین، فاصله‌ی ژنتیکی بر پایه‌ی روش Kimura-2-Parameter محاسبه شد [۱۷].

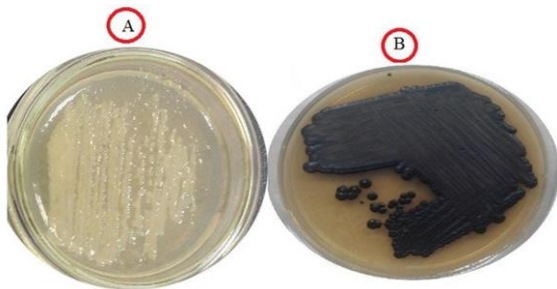
۲-۶- بهینه‌سازی فرایند سنتز نانوذرات تلوریم با سویه‌ی باکتری منتخب تحت فرایند سلول در حال استراحت

به منظور بهبود بازده سنتز برون سلولی نانوذرات تلوریم در سویه-ی باکتری منتخب، اثر چندین پارامتر شامل غلظت‌های اولیه یون تلوریت در مخلوط واکنش (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌مولار)، غلظت‌های اولیه توده زیستی سلول (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ گرم در لیتر)، اثر pHهای متفاوت (۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵، ۸ و ۸/۵)، اثر دماهای متفاوت (۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) و اثر دوره‌ی انکوباسیون (۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت) در مخلوط واکنش زیست تبدیلی تحت فرایند سلول در حال استراحت مورد بررسی و بهینه‌سازی تک عاملی (تغییر یک پارامتر با ثابت نگه داشتن سایر پارامترها) قرار گرفت. آزمایش‌ها در داخل ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتری آب دمین استریل و تحت شرایط سلول‌های در حال استراحت انجام شد. به منظور تهیه سلول‌های در حال استراحت سویه‌ی باکتری جداسازی شده و استفاده از آن‌ها به‌عنوان زیست کاتالیست در آزمایشات کاهش زیستی اکسی‌آنیون تلوریت به نانوذرات تلوریم، سلول‌های باکتری در محیط مایع لوریا برتانی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر rpm ۱۵۰ به مدت ۲۸ ساعت (تا رسیدن به انتهای فاز رشد لگاریتمی) کشت داده شدند. سپس، توده سلولی به کمک سانتریفیوژ برداشت و پس از شستشوی سلول‌ها در بافر فسفات، از سلول‌های برداشت شده به‌عنوان کاتالیست در آزمایش‌ها زیست تبدیلی استفاده شد [۱۸ و ۱۹]. همه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد.

۲-۷- تعیین ویژگی نانوذرات تلوریم سنتز شده با روش‌های دستگاهی و طیف‌سنجی

به منظور تایید سنتز زیستی برون سلولی نانوذرات تلوریم افزون بر بررسی مشخصات ظاهری (تغییر رنگ مایع روئی)، از بررسی‌های دستگاهی شامل طیف‌سنجی UV - visible (Specord 210 ساخت آلمان)، طیف‌سنج پراش انرژی پرتوایکس یا EDX (مدل Mira 3-LMu ساخت کمپانی TESCAN کشور چک)، دستگاه طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل

TR1122 که دارای بالاترین مقاومت (بالتر از ۱۲ میلی مولار) همراه با کاهش تلوریت پتاسیم به تلوریم عنصری بود انتخاب و جهت ارزیابی سنتز برون سلولی نانوذرات تلوریم مورد آزمایش قرار گرفت. براساس منابع معتبر [۲۰] ایجاد کلنی‌های سیاه رنگ در محیط حاوی تلوریت بیان‌گر پتانسیل ذاتی سویه‌ی باکتری مذکور در کاهش اکسی‌آنیون سمی تلوریت به فرم تلوریم عنصری است که نتایج در شکل ۱ آورده شده است.



شکل ۱: (A) کلنی سویه باکتری TR2211 در محیط کشت لوریا برتانی پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری و (B) کلنی سویه باکتری TR2211 در محیط کشت لوریا برتانی آگار حاوی ۰/۵ میلی مولار اکسی‌آنیون تلوریت

در ادامه، پتانسیل ذاتی سلول‌های رویشی کشت باکتری THR12 در کاهش اکسی‌آنیون تلوریت به نانوذره‌ی تلوریم با استفاده از مشاهدات چشمی (تغییر رنگ سوپرناتانت کشت باکتری عاری از توده‌ی زیستی) و آنالیزهای طیف‌سنجی جذبی UV-vis طیف‌سنجی مشخص شد. آنالیز نمونه‌ها با طیف‌سنجی UV-vis، یک پیک جذبی مشخص را در طول موج ۵۸۰ نانومتر (پیک اختصاصی برای نانوذرات تلوریم عنصری) نشان داد که بیان‌گر وجود نانوتلوریم عنصری در مخلوط واکنش زیست‌تبدیلی است. براساس منابع معتبر بیشینه‌ی پیک جذبی نانوذرات تلوریم عنصری در طول موج‌های ۵۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر است. در محلول کنترل در طول موج‌های بین ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر هیچ پیک جذبی مشاهده نشد (شکل ۲).

فوریه یا FTIR (مدل Bruker, VECTOR 22 ساخت کشور آلمان)، هیستوگرام و منحنی نرمال مربوط به دامنه پراکنش اندازه نانوذرات تلوریم و همچنین، الکترومیکروگراف‌های تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی یا SEM (مدل Mira 3-LMu ساخت کمپانی TESCAN کشور چک) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا سوپرناتانت عاری از توده زیستی باکتری از فیلترهای سرنگی ۰/۲۵ میکرونی عبور داده شد. سپس، با هدف رسوب نانوذرات تلوریم عنصری، از سانتریفیوژی با دور بالا (۱۵۰۰۰× g) به مدت ۴۵ دقیقه) استفاده می‌شود. رسوب حاصل با آب دو بار تقطیر استریل شست و شو داده و در نهایت نانوذرات حاصل در دستگاه فریز درایر به مدت ۲۴ ساعت خشک شده و سپس، آنالیزهای EDX، Particlesize analyzer، SEM و FTIR با هدف تعیین وضعیت نانوکریستال‌های تشکیل شده و بررسی شکل و اندازه‌ی و پایداری نانوذرات سنتز شده انجام شد.

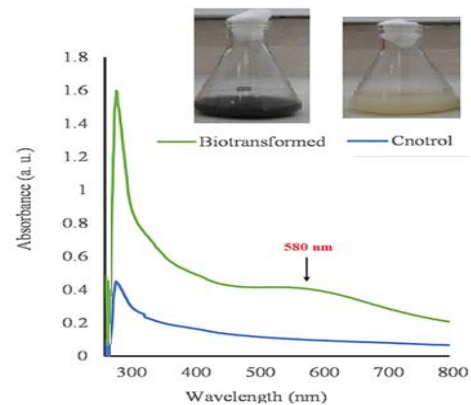
۳- نتایج و بحث

۳-۱- غربال‌گری سویه‌های باکتری مقاوم به تلوریت

با پتانسیل کاهش تلوریت به تلوریم عنصری

با توجه به سمیت بالای یون تلوریت بر سلول‌های باکتری، شناسایی باکتری‌های مقاوم به غلظت‌های بالای اکسی‌آنیون سمی تلوریت گام نخست در انتخاب سویه‌هایی است که قادر به کاهش تلوریت و تبدیل آن به نانوذره‌ی تلوریم عنصری بوده و می‌تواند ما را به انتخاب سویه‌ی برتر هدایت کند. در این راستا پس از جمع‌آوری نمونه‌های آبی مناطق متفاوت، در محیط غنی‌کننده‌ی لوریا برتانی آگار حاوی نیم میلی‌مولار یون تلوریت، با کشت چمنی و کشت خطی یک مجموعه‌ی میکروبی تهیه شد. در مجموع ۱۳ سویه‌ی باکتری آبی مقاوم به تلوریت جداسازی شد. پس از چند بار پاساژ دادن متوالی و به دست آوردن کلنی تک، از خالص‌سازی سویه‌ها اطمینان حاصل شد. مقاومت ذاتی همراه با کاهش اکسی‌آنیون تلوریت در سویه‌های باکتری آبی جداسازی شده به وسیله‌ی روش رقت در آگار تعیین شد. براساس نتایج به دست آمده، ۱۳ سویه‌ی باکتری آبی جداسازی شده، مقاومت ذاتی بین ۰/۵ تا ۱۲ میلی مولار نسبت به اکسی‌آنیون سمی تلوریت از خود نشان دادند. در این میان، سویه باکتری

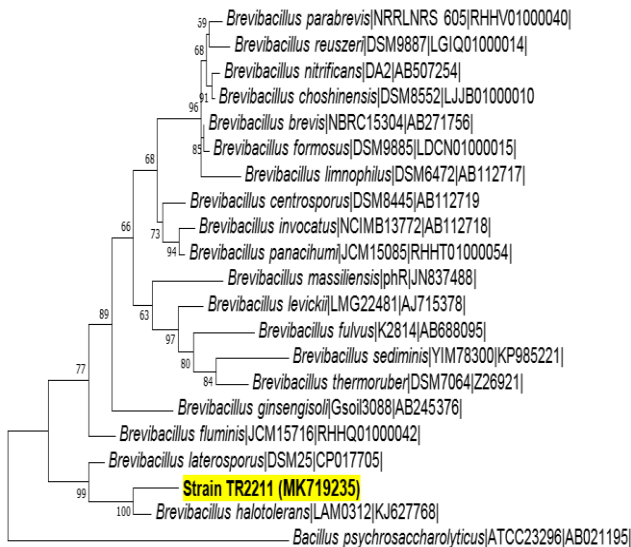
این سویه دارای مشابهت ۹۷/۹۱ درصدی با سویه‌های متعلق به گونه‌ی باکتری *Brevibacillus halotolerans* strain LAM0312 (شماره دسترسی در بانک ژنی NR_156834) می‌باشد. تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک نیز تأیید کرد که سویه‌ی مورد نظر به احتمالاً به گونه‌ی باکتری *Brevibacillus halotolerans* تعلق دارد. درخت فیلوژنی (شکل ۳) که بر اساس آنالیزهای تکثیر ژن 16S rDNA و به روش neighbor-joining به دست آمده است، موقعیت سویه‌ی THR12 در میان گونه‌های متعلق به جنس *Brevibacillus* نشان داده شده است.



شکل ۲: مشاهدات چشمی و طیف‌های طیف سنجی محیط‌های کنترل (بدون تلقیح سویه‌ی باکتری) و بیوترانسفورم شده (استوک تلوریت حاوی باکتری تلقیح شده) برای نشان دادن توانایی سنتز نانوذرات تلوریم با سویه‌ی باکتری TR2211

۲-۳- شناسایی ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و ملکولی سویه باکتری TR2211

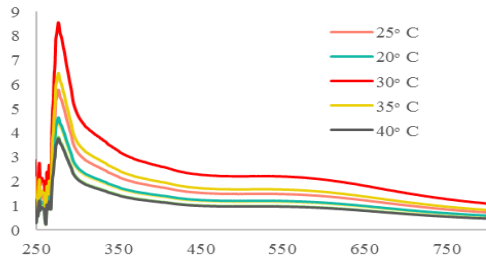
سویه TR2211 گرم منفی، میله‌ای شکل، اکسیداز و کاتالاز مثبت، متحرک، تست کاهش نیترات مثبت، تست متیل رد منفی، تست وژپروسکوئر مثبت، آبکافت ژلاتین و اوره منفی، تولید اسید از فروکتوز، سلوبیوز، مالتوز، تری‌هالوز و مانیتول منفی و تولید اسید از آل-آرابینوز، اینوزیتول، سوکروز و گلیسرول مثبت، رشد در نمک سدیم کلراید تا ۱۰ درصد وزنی/حجمی، رشد در دماهای متفاوت (۱۵ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد) و رشد در pH های متفاوت (۵ تا ۸). از نظر ریخت‌شناسی بصورت‌های منفرد، جفت و خوشه‌ایی دیده می‌شود. براساس مطالعات فوتویی و مقایسه ویژگی‌های این باکتری با کتاب‌های مرجع و مقالات منتشره در این ارتباط [۲۱]، سویه گفته شده، بطور موقت در جنس *Brevibacillus* قرار گرفت. در ادامه و با هدف تعیین هویت دقیق سویه‌ی باکتری TR2211، ابتدا DNA ژنومی استخراج و سپس، ژن حفاظت شده‌ی 16S rDNA از طریق آغازگرهای عمومی fd1 و rp2 مورد واکنش PCR قرار گرفت. فرآورده PCR مناسب در ناحیه‌ی ۱۵۰۰ جفت بازی نمایان شد که بیان‌گر خلوص DNA مورد استفاده جهت تعیین توالی می‌باشد. پس از مشخص شدن توالی نواحی نوکلئوتیدی 16S rDNA سویه‌ی گفته شده و بلاست کردن آن در سایت اینترنتی NCBI، سویه‌ی باکتری مورد نظر شناسایی شد. براساس نتایج حاصل از بلاست،



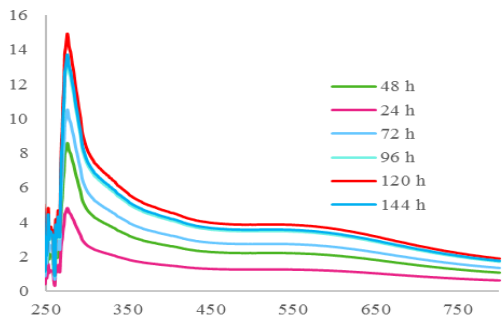
شکل ۳: درختچه فیلوژنی سویه باکتریایی TR2211 با استفاده از روش neighbor-joining و براساس تکثیر ژن 16S rDNA

۳-۳- نتایج تاثیر پارامترهای متفاوت بر روی سنتز نانوذرات تلوریم با استفاده از sp. strain TR2211 Brevibacillus تحت فرایند سلول در حال استراحت

همان‌گونه که در شکل (۴ قسمت‌های A تا E) نشان داده شده است، بیشترین تولید نانوذرات تلوریم در غلظت ۱/۵ میلی مولار تحت فرایند سلول در حال استراحت به دست آمده است. در غلظت‌های بالاتر از ۱/۵ میلی مولار یون تلوریت، به احتمال به دلیل سمیت یون تلوریت بازده تولید کاهش پیدا کرده است. با



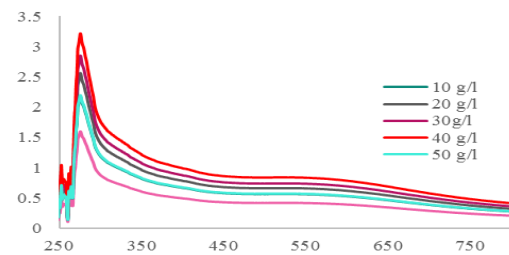
D



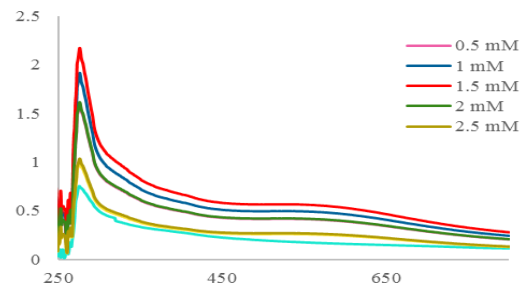
E

شکل ۴: نمودار تعیین تاثیر فاکتورهای بهینه بر سنتز برون سلولی نانوذرات تلوریم توسط باکتری *Brevibacillus sp. strain TR2211* تحت فرایند سلول در حال استراحت. (A) اثر غلظت اولیه یون تلوریت (B) اثر غلظت اولیه ی بیومس سلول باکتری (C) اثر pH (D) اثر دما و (E) اثر زمان انکوباسیون.

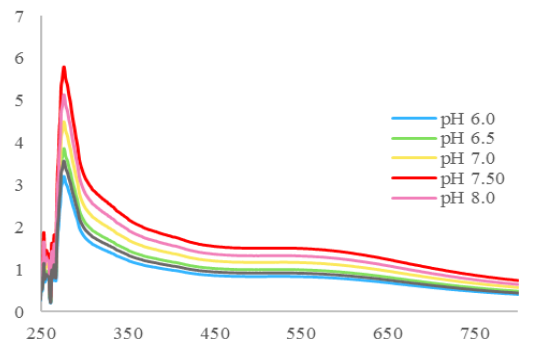
افزایش غلظت توده‌ی زیستی باکتری از ۱۰ تا ۵۰ گرم در لیتر، یک افزایش تدریجی در طیف جذبی مرتبط با تشکیل نانوذرات تلوریم تحت شرایط غلظت بهینه‌ی ۱/۵ میلی مولار از یون تلوریت و در شرایط دمایی ۲۵ درجه‌ی سانتی گراد، pH برابر ۷ و دور شیکر ۱۵۰ rpm مشاهده شد. با این حال، بیشترین تولید نانوذرات تلوریم مربوط به وزن ۴۰ گرم در لیتر بیومس باکتری است که همان وزن بیومس بهینه است. اثرات pH، دما و دوره‌ی گرماگذاری تحت شرایط بهینه شده (غلظت ۱/۵ میلی مولار یون تلوریت، وزن ۴۰ گرم در لیتر بیومس سلول در مخلوط واکنش زیست تبدیلی مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج بدست آمده حداکثر طیف جذبی نانوذرات تلوریم در pH بهینه برابر ۷/۵، دمای بهینه برابر ۳۰ و دوره انکوباسیون بهینه ۱۲۰ ساعت بدست آمد.



A



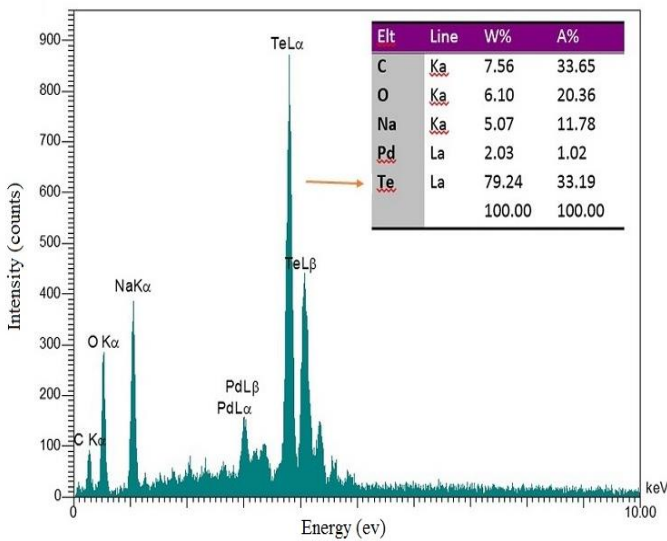
B



C

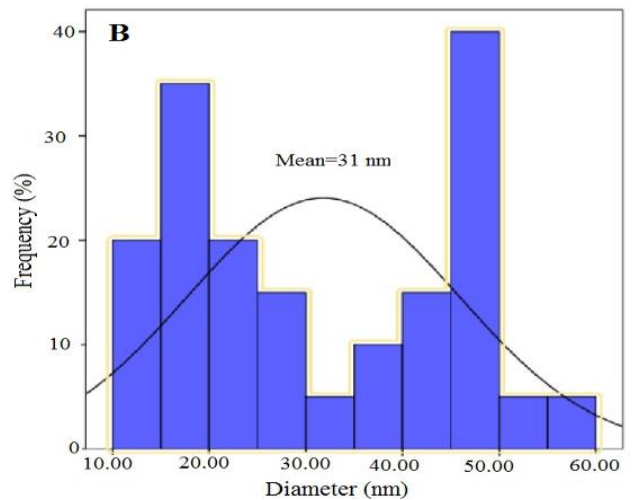
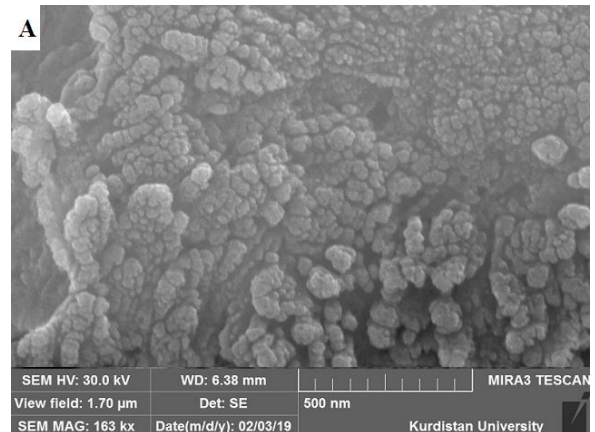
۳-۴- نتایج آنالیزهای میکروسکوپی و طیف سنجی نانوذرات تلوریم سنتز شده

نانوذرات تلوریم سنتزی به وسیله‌ی فرایند سلول در حال استراحت تحت شرایط بهینه، پس از استخراج و خشک کردن با دستگاه فریز درایر، برای آنالیزهای SEM و پراکنش اندازه‌ی ذرات، استفاده شد که نتایج در شکل (۵) آورده شده است. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، میکروگراف‌های حاصل، سنتز نانوذرات تلوریم کروی تا بیضوی شکل با متوسط اندازه‌ی ۳۱ نانومتر را نشان داد.



شکل ۶: آنالیز EDX نانوذرات تلوریم سنتز شده با استفاده از زیست توده باکتری *Brevibacillus* sp. strain TR2211

در ادامه و با بررسی نتایج آنالیزهای FTIR می‌توان گفت که پیک پهن ظاهر شده درمگستره‌ی موجی 3200 cm^{-1} تا 3500 cm^{-1} می‌تواند مربوط به گروه N-H، گروه OH حلال آب، فنولی و یا کربوکسیلیک اسیدش باشد. اما از آنجایی که در گستره $1680-1810\text{ cm}^{-1}$ که مربوط به گروه C=O است، هیچ گونه پیکی مشاهده نشد، دخالت عامل کربوکسیلیک اسید منتفی است. پیک موج در گستره‌ی 2900 cm^{-1} می‌تواند مربوط به کشش پیوند C-H آلیفاتیک باشد. گستره‌ی $1640-1690\text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه C=N و گستره‌ی $1475-1600\text{ cm}^{-1}$ مربوط به حلقه‌ی بنزن است. همچنین، ناحیه‌ی $1500-2000\text{ cm}^{-1}$ به جذب پیوندهای دوگانه‌ی کششی C=N، C=C و C=O مربوط است. ناحیه‌ی پایین‌تر از 1500 cm^{-1} به ناحیه‌ی اثر انگشت (Fingerprint region) مشهور بوده که جذب‌های متعلق به ارتعاش پیوندهای ساده C-O، C-N، و C-C در این ناحیه قرار دارند. توجه به داده‌های حاصله می‌توان گفت که گروه‌های فنولی، هیدروکسیلی و آمینی در سنتز نانوذرات نقش داشته اند (شکل ۷).



شکل ۵: تصاویر SEM و آنالیز توزیع ذرات نانوذرات تلوریم سنتز شده تحت شرایط بهینه و در حضور سلول‌های در حال استراحت *Brevibacillus* sp. strain TR2211

در ادامه و با هدف تجزیه و تحلیل ساختاری و مشخص نمودن ترکیب عنصری نمونه‌ی نانوذره‌ی زیستی سنتز شده آنالیز EDX انجام شد (شکل ۶). هر یک از پیک‌های نشان داده شده مختص یک عنصر هستند. این آنالیز وجود مقادیر قابل توجهی از عنصر تلوریم (Te) را در ترکیب نانوذرات درون سلولی سنتز شده با سویه‌ی باکتری TR2211 را تایید کرد.

مراجع

[1] E. J. Espinosa-Ortiz, E. R. Rene, F. Guyot, E. D. Hullebusch, P. N. L. Lens, "Biomining of tellurium and selenium-tellurium nanoparticles by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*," International Biodeterioration and Biodegradation, 124, 258-266, 2017.

[2] D. Zannoni, F. Borsetti, J. J. Harrison, R.J. Turner, "The bacterial response to the chalcogen metalloids Se and Te," Advances in Microbial Physiology, 53, 1-71, 2008.

[3] C.L. Zhong, B.Y. Qin, X.Y. Xie, Y. Bai, "Antioxidant and antimicrobial activity of tellurium dioxide nanoparticles sols," Journal of Nano Research, 25, 8, 2013.

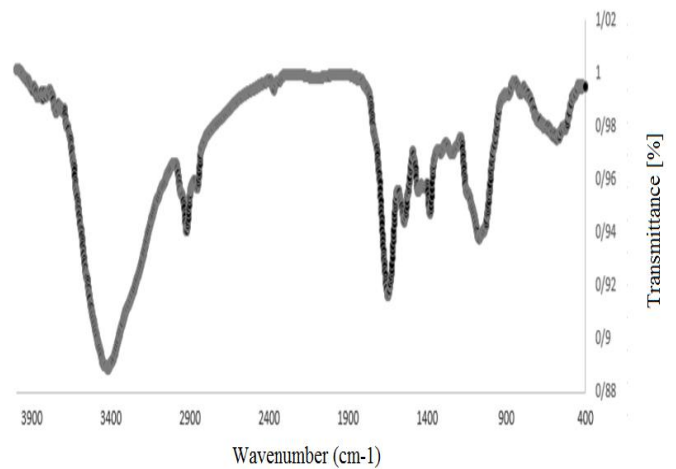
[4] B. Zare, M.A. Faramarzi, Z. Sepehrizadeh, M. Shakibaie, S. Rezaie, A. R. Shahverdi, "Biosynthesis and recovery of rod-shaped tellurium nanoparticles and their bactericidal activities," Materials Research Bulletin. 47, 3719-3725, 2012.

[5] B. Zare, Z. Sepehrizadeh, M. A. Faramarzi, M. Soltany-Rez-ae-rad, S. Rezaie, A. R. Shahverdi, "Antifungal activity of biogenic tellurium nanoparticles against *Candida albicans* and its effects on squalene monooxygenase gene expression," Biotechnology and Applied Biochemistry, 61, 395-400, 2014.

[6] S. Hasan. A review on nanoparticles: their synthesis and types. Research Journal of Recent Sciences, 4, 1-3, 2015

[7] D. Schaming, H. Remita, "Nanotechnology: from the ancient time to nowadays," Foundations of Chemistry, 17(3), 187-205, 2015.

[8] K.N. Thakkar, S.S. Mhatre, R.Y. Parikh, "Biological synthesis of metallic nanoparticles," Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine, 6(2), 257-262, 2010.



شکل ۷: طیف FTIR از نانوذرات تلوریم سنتز شده با استفاده از سلول‌های در حال استراحت *Brevibacillus* sp. strain TR2211

۴- نتیجه‌گیری

فرایند کاهش یون‌های فلزی و تبدیل آن‌ها به فرم نانو با استفاده از میکروارگانیسم‌ها در واقع نوعی سمیت‌زدایی برای حفظ بقای سلول میکروبی است که در طی آن میکروارگانیسم با تبدیل یون فلزی به فرم نانو، بر سمیت آن غلبه می‌کند. نانوذراتی که به صورت درون‌سلولی ساخته شده‌اند، برای استخراج به مراحل اضافی مانند تیمار با امواج اولتراسونیک یا واکنش با دترجنت‌ها مناسب نیاز دارند. این در حالی است که در سنتز برون‌سلولی می‌توان به تولید سریع بدون نیاز به مراحل پیچیده‌ی استخراج دست یافت. در این پژوهش، برای نخستین بار تولید نانوذرات تلوریم در سویه‌ی باکتری آبزی *Brevibacillus* sp. strain TR2211 گزارش شد. غربالگری میکروارگانیسم‌های بومی جدید با قابلیت تولید نانوذرات فلزی می‌تواند جایگاه استفاده از روش‌های میکروبی در تولید نانومواد را بهبود بخشیده و آینده مناسب‌تری را ترسیم کند. با توجه به دست‌یابی به سنتز سبز برون‌سلولی نانوذرات تلوریم و بهینه‌سازی شرایطی مانند: pH، دما و زمان گرماگذاری، غلظت زیست توده و غلظت یون تلوریت، می‌توان امیدوار بود که امکان استفاده از روش‌های زیستی را برای ساخت نانوذرات تلوریم در مقیاس بزرگ و کاربردهای صنعتی فراهم شود.

Filipski, S. Kumar, "MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0," *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729, 2013.

[۱۸] مراحم آشنگرف، ایرج نحوی، "استفاده از سلولهای در حال استراحت *Halomonas salina* HSL5 بعنوان زیست واکنشگر برای تولید بیولوژیک اسید وانیلیک" مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (زیست شناسی ایران)، سال ۱۳۹۳، جلد ۲۷، شماره ۱، صفحات ۱-۱۳.

[19] M. Ashengroph, "A novel strain of *Aureobasidium* sp. TeO12 for theophylline production from caffeine," *3 Biotech*, 7, 176, 2017.

[20] M. A. Amoozegar, M. Ashengroph, F. Malekzadeh, M. Reza Razavi, S. Naddaf, M. Kabiri, "Isolation and initial characterization of the tellurite reducing moderately halophilic bacterium, *Salinicoccus* sp. strain QW6," *Microbiological Research*, 163, 456–465, 2008.

[21] J. Song, Y. Wang, Y. Song, B. Zhao, H. Wang, S. Zhou, D. Kong, X. Guo, Y. Li, M. He, K. Ma, Z. Ruan, Y. Yan, "*Brevibacillus halotolerans* sp. nov., isolated from saline soil of a paddy field," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 772–777, 2017.

[9] M. M. Eloud, O. E. A. Al-Hagar, E.S. Abdelkhalek, N. M. Sidkey, "Synthesis and investigations on tellurium myconanoparticles," *Biotechnology Reports*, 15, 18: e00247, 2018.

[10] H. Barabadi, F. Kobarfard, H. Vahidi, "Biosynthesis and characterization of biogenic tellurium nanoparticles by using *Penicillium chrysogenum* PTCC 5031: A Novel approach in gold biotechnology," *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 17, 87-97, 2018.

[11] R. Mirjani, M. A. Faramarzi, M. Sharifzadeh, N. Setayesh, M. R. Khoshayand, A. R. Shahverdi, "Biosynthesis of tellurium nanoparticles by *Lactobacillus plantarum* and the effect of nanoparticle-enriched probiotics on the lipid profiles of mice," *IET Nanobiotechnology*, 9(5), 300-305, 2015.

[12] M. Baesman, T.D. Bullen, J. Dewald, D. Zhang, S. Curran, F. S. Islam, T. J. Beveridge, R. S. Oremland, "Formation of tellurium nanocrystals during anaerobic growth of bacteria that use Te oxyanions as respiratory electron acceptors," *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7), 2135–2143, 2007.

[۱۳] مراحم آشنگرف، ارسلان خالدی، " سنتز سریع و برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم توسط *Pseudomonas Cd11 pseudoalcaligenes* و بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن " مجله پژوهش های سلولی مولکولی، سال ۱۳۹۷، شماره ۴، صفحات ۶۶۲-۶۷۲

[14] J.A. Washington, V.L. Sutter, Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution procedures. In: Lennette EH, Balows A, Hausler JR, WJTruant J. editors. *Manual of clinical microbiology*, 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1980, p.453-458.

[15] R.M. Simbert, N.R. Krieg, Phenotypic characterization. In: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR (eds) *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington, DC, 607–654, 1994.

[16] W.G. Weisburg, S.M. Barns, D. A. Pelletier, D. J. Lane, "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study," *Journal of Bacteriology*, 173, 697–703, 1991.

[17] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A.



Biological synthesis of tellurium nanoparticles by isolated *Brevibacillus* sp. strain TR2211 as biocatalyst

M. Ashengroph*, S.Z. Mirzaei

Department of Biological sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj

Abstract: Tellurium nanoparticles have broad significant applications including treatment of infectious diseases, imaging, drug delivery systems, anti-inflammatory drug research, anti-inflammatory, anticoagulant drugs and treat many kinds of tumors. In the current study, potential of marine bacteria as biocatalysts were used for the biological reduction of tellurite oxyanion into to tellurium nanoparticles. The prepared tellurium nanoparticles were examined using UV-visible spectroscopy analysis, Energy dispersive x-ray spectroscopy (EDS), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and Scanning electron micrograph analysis. In this context, we isolated 13 tellurite-resistant bacteria were isolated using the enrichment technique. Among them, the strain TR2211 had a great potential for extracellular synthesis of tellurium nanoparticles. The isolated strain selected and characterized *Brevibacillus* sp. strain TR2211 (GenBank accession number MK719235) based on phenotypic and molecular characteristics. Finally, the extracellular synthesis of tellurium nanoparticles was investigated under optimized reaction conditions. Our results show that the extracellular spherical-shaped tellurium nanoparticles with average size of 31 nm were formed in an optimal tellurite concentration of 1.5 mM, optimal initial biomass concentration 40 g/l at the optimal pH 7.5 and optimal temperature of 30° C after 120 h of incubation under resting cell conditions. This is the first report on biosynthesis of tellurium nanoparticles by *Brevibacillus* sp. strain TR2211.

Keywords: Extracellular synthesis, Tellurium nanoparticles, Spectroscopy, *Brevibacillus* sp. strain TR2211