Archive of SID

فصلنامه بیماری های عفونی و گرمسیری وابسته به انجمن متخصصین بیماری های عفونی و گرمسیری
سال بیست و چهارم ، شماره ۸۴، صفحات ۲۳ تا ۳۱ ، بهار۹۸

تولید نانوذرات نقره با استفاده از بیوفیلم باسیلوس لیکنی فورمیس توسط دیسک های چرخان زیستی و خاصیت ضد باکتریایی آن

بابک خیرخواه[۱]، عباس ابراهیمی زرندی[۲] ، کیومرث امینی[۳]*، پریسا مبصری[۴]

۱. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران
۲. کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران
۳. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران
۴. دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

نشانی برای مکاتبه: Dr_kumarss_amini@yahoo.com، تلفن ۰۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴
دریافت مقاله: آبان نود و هفت پذیرش برای چاپ: دی نود و هفت

چکیده

سابقه و هدف *: نانوذرات خواص تغییر شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی منحصر به فرد و قابل توجهی را در مقایسه با ترکیبات شیمیایی مشابه به علت نسبت بالای سطح به حجم آنها نشان می دهند. سنتز بیولوژیکی نانوذرات نقره با استفاده از میکروارگانیسم ها به دلیل توانایی آنها برای تولید نانوذرات با اندازه های مختلف، شکل و مورفولوژی، علاقه فراوانی به خود جلب کرده است.*

روش کار: جدایه ها از مناطق مختلف خاک های کشاورزی کرمان جمع آوری شد. برای شناسایی و تشخیص کشت، مورفولوژی (رنگ، شکل و اندازه کلنی) و آزمایش های بیوشیمیایی انجام شد. کشت سوپرناتانت و بیومس مرطوب باکتری با نیترات نقره مخلوط شدند. سپس مخلوط ها بر روی یک شیکر دوار در دمای اتاق برای مدت ۲۴-۴۸ ساعت تحت تاریکی و نور مرئی نگهداری شدند. برای بیوسنتز نانوذرات نقره از دیسک های چرخان زیستی استفاده شد. سنتز نانوذرات نقره در ابتدا با ظهور تغییر رنگ از زرد متمایل به سبز به قهوه ای مشاهده شد. در مخلوط و با استفاده از طیف سنجی UV-Visible مشخص شد. تشکیل نانوذرات نقره توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) بررسی شد. فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره با استفاده از *اشریشیاکلای، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش انتشار چاهک بررسی شد.

یافته ها: *طیف UV-vis از محیط آبی حاوی یون نقره، پیک را در ۴۲۰ نانومتر نشان داد که مربوط به جذب پلاسمون سطحی نانوذرات نقره است. میکروگراف TEM نشان دهنده تشکیل نانوذرات نقره در محدوده ۲ تا ۱۰۰ نانومتر و مورفولوژی آنها کروی بود. نانوذرات نقره اثرات ضد باکتریایی بیشتری علیه باکتری گرم مثبت نسبت به گرم منفی نشان دادند.*

نتیجه گیری: *نانوذرات نقره سنتز شده توسط باسیلوس لیکنی فورمیس تولید شده کاربرد زیست پزشکی بسیاری دارند و آینده ای برای برنامه های کاربردی درمانی و دارویی بیشتر هستند.*

واژگان کلیدی: ***باسیلوس لیکنی فورمیس*****، نانوذرات نقره، فعالیت ضد باکتریایی، دیسک های چرخان زیستی**

مقدمه

علم نانو و نانوتکنولوژی در طول چند سال اخیر به دلیل تاثیرات بالقوه آن در بسیاری از زمینه های علمی مانند انرژی، پزشکی، صنایع دارویی، الکترونیک و صنایع فضایی، توجه زیادی را به خود جلب کرده است(۱). انتظار می رود نانوتکنولوژی علم و جامعه را دگرگون سازد. نانوتکنولوژی شامل کارهای جالبی در سطوح اتمی، افزایش و کنترل مواد صد هزار برابر کوچکتر از یک رشته موی انسان برای ساخت مواد و وسایل مفید است(۲- ۱). نانوذرات به قطر ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند(۳). نانوذرات به طور کلی ویژگی های منحصر به فرد ذاتی خود را نشان می دهند، مانند ناحیه سطحی ویژه وسیع، انرژی سطحی بالا، ساختار اصلاح شده، محفظه فضایی، ترکیب سطحی کنترل شده و واکنش پذیری(۴، ۵). نانوذرات نقره به دلیل خاصیت های نوری، حرارتی، فیزیکی، شیمیایی، مگنتیک و بیولوژیکی توجه زیادی را به خود جلب کرده اند(۶-۸). نانوذرات دارای ویژگی های وابسته به اندازه و شکل هستند که برای برنامه های کاربردی از زیست سنجی و کاتالیزورهای اپتیک، فعالیت ضد میکروبی، ترانزیستورهای کامپیوتری، الکترومترها، سنسورهای شیمیایی، منطقه ای الکترونیکی بی سیم و طرح های حافظه، نشانگر زیستی، علوم زیست پزشکی، مکانیک، مغناطیس، علم انرژی، تصفیه آب مورد توجه بسیاری است(۹-۱۱، ۶).

www.SID.ir

Archive of SID

نقره یک ماده ضد باکتری غیرآلی است که برای قرن ها استفاده شده است و می تواند حدود ۶۵۰ نوع بیماری که توسط میکروارگانیسم ها ایجاد می شوند را از بین ببرد(۱۲). گزارش شده که نانوذرات نقره دارای فعالیت ضد قارچی، ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد آنژیوژنز، ضد باکتری و ضد ترومبولیت هستند(۱۳ و ۱۴). مکانیسم هایی که باعث می شود تا نانوذرات نقره بر روی باکتری ها عمل کنند هنوز کاملا مشخص نشده اند. با این حال، چهار نظریه رایج پیشنهادی عبارتند از: ۱- جذب یون نقره آزاد موجب اختلال در تولید ATP و تکثیر DNA می شود. ۲- نانوذرات نقره با پروتئین های غشایی ارتباط برقرار می کنند و در غشای سلولی انباشته می شوند که بر روی نقش صحیح و نفوذپذیری غشا تاثیر می گذارد. ۳- نانوذرات نقره و یون های نقره ای ROS تولید می کنند. ۴- نانوذرات نقره به طور مستقیم به غشاهای سلولی آسیب می رسانند(۱۵).

بخش مهمی از کار در فناوری نانو مربوط به سنتز نانوذرات با ترکیبات شیمیایی، اندازه، اشکال و پلی دیسپرسیتی مختلف است(۴). روشهای متعددی برای تولید نانوذرات نقره از قبیل کاهش شیمیایی، کاهش فتوشیمیایی یا کاهش پرتوی شیمیایی، انفجار سیم فلزی، روش سونوشیمیایی، روش پلاسما، تکنیک آئروسل و تابش لیزر استفاده شده است(۴و۵). سنتز بیولوژیکی دارای مزایایی است از جمله منابع کافی مواد، شرایط واکنش خفیف، پراکندگی خوب نانوذرات و همچنین تعداد کمی مواد افزودنی شیمیایی و محصولات جانبی سمی، ذرات واکنش کاتالیزوری بالاتری دارند، ناحیه سطحی خاص وسیع و تماس بهتر بین آنزیم و نمک فلزی، تبدیل مواد بالاتر و صرفه جویی در مصرف انرژی، مقرون به صرفه، سازگار با محیط زیست، به راحتی برای سنتز مقیاس بزرگ اندازه گیری می شود و در دمای و فشار نسبتا محدود اتفاق می افتد(۱۷، ۱۶، ۱۴ ،۴-۶). روش های بیوسنتز با استفاده از میکروارگانیسم ها یا عصاره های گیاهی به عنوان یک روش ساده و جایگزین روش های سنتتیک روش های شیمیایی و فیزیکی است(۱۸).

بسیاری از میکروارگانیسم ها مواد غیر آلی داخل یا خارج سلولی تولید می کند(۱۹). سنتز خارج سلولی مزایای زیادی را نسبت به فرایند سنتز داخل سلولی از نقطه نظر کاربرد دارد. از آنجایی که نانوذراتی که درون بیومس شکل گرفته اند، نیازمند مرحله بعدی پردازش برای انتشار نانوذرات از بیومس با درمان اولتراسوند یا واکنش با مواد شوینده مناسب دارند(۶). مجموعه ای از منابع بیولوژیکی موجود در طبیعت، از جمله باکتری ها، قارچ ها، مخمر ها، جلبک ها و گیاهان، می تواند برای سنتز نانوذرات استفاده شود(۱۹). باکتریها به عنوان یک کارخانه بیولوژی بالقوه برای سنتز نانو ذرات مانند طلا، نقره، پلاتین، پالادیوم، تیتانیوم، دی اکسید تیتانیوم، مگنتیت، سولفید کادمیوم و غیره در نظر گرفته می شوند(۱). *سودوموناس آنتراکتیکا، سودوموناس پروتئولیتیکا، سودوموناس مریدیانا، سودوموناس ستوتزری، آرتروباکتر کرگولنسیس گانگوترینسیس آرتروباکتر و باسیلوس ایندیکوس، باسیلوس سسمبنسیس، استافیلوکوکوس اورئوس، فائنروکائتا*

کریزیپوریوم، سالمونلا تیفی موریوم، سراشیا نماتوفیلوم، اشریشیا کلای، ویبریوکلرا برای سنتز نقره نانوذرات استفاده شده است(۱۲ ،۶-۵ ،۱).

دیسکهای چرخان زیستی (RBC) سازگاری منحصر به فرد از محیط متحرک متصل شده به سیستم رشدی بیوفیلم که یک جایگزین پروسه درمانی لجن فعال را ارائه می دهد. محیط در قالب چندین سطح بزرگ یا دیسک های شیاردار با بیوفیلم متصل به سطح آنها بر روی میله مشترک تقریبا در فاضلاب غرق شده اند و از طریق کانتور مخازن که در آن جریان فاضلاب مداوم است چرخش دارد(۲۰).

این مطالعه با هدف تعیین خاصیت ضد باکتریایی نانو ذرات نقره تهیه شده از بیوفیلم *باسیلوس لیکنی فورمیس* توسط دیسک های چرخان زیستی اجام شد.

روش کار

برای بررسی توانمندی باکتری های *باسیلوس لیکنی فورمیس* در تولید نانو ذرات نقره باکتری های مورد نیاز از بخش میکروبشناسی آزمایشگاه ایرانیان غذاآزما سازمان پژوهش های علمی و صنعتی و خاک های کشاورزی مناطق مختلف استان کرمان تامین شد. برای مطالعات بیوسنتز، ایزوله باکتریایی در فلاسک ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر مایع مغذی کشت شد. بطری های کشت شده در یک شیکر چرخان با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه برای ۴۸ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، کشت در ۳۰۰۰ دور در دقیقه برای ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و هر دو ماده بیومس و سوپرناتانت جمع آوری شده و جداگانه برای تولید نانوذرات نقره مورد استفاده قرار گرفتند. برای تولید خارج سلولی نانوذرات نقره، ۵ میلی لیتر از سوپرناتانت با ۵ میلی لیتر محلول فیلتر شده نیترات نقره با غلظت ۱ میلی مولار مخلوط شد. برای تولید داخل سلولی ۵ گرم از بیومس مرطوب باکتریایی در ۵ میلی لیتر از محلول آبی ۱ میلی مولار نیترات نقره در فلاسک ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری دوباره حل شد. سپس مخلوط ها بر روی یک شیکر چرخان (۲۰۰ دور در دقیقه) در دمای اتاق برای مدت ۴۸-۲۴ ساعت در تاریکی و نور مرئی نگهداری شدند. بیوسنتز نانوذرات نقره به صورت بصری مشاهده شد. تغییر رنگ از زرد به قهوه ای، شکل گیری نانوذرات نقره کلوئیدی را تعیین می کند. برای بررسی توانایی تولید نانو ذرات نقره توسط بیوفیلم های ایجاد شده روی دیسک های طراحی شده محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار داخل ظروف پلیمری ریخته شد و سپس دیسک ها که به آرامی با آب مقطر سطح آنها برای خارج شدن سلولهای آزاد (پلانکتونیک) شسته

www.SID.ir

Archive of SID

شده بود داخل محلول نیترات نقره فرو برده شد و در دور کم دستگاه شروع به چرخش کرده و در شرایط نوری تولید نانوذرات نقره و توانایی بیوفیلم ها در تولید بررسی گردید.

شکل گیری نانوذرات نقره توسط طیف سنجی UV-Vis در طیفی از طول موج ۳۵۰-۵۵۰ nm با وضوح ۱ nm ، با استفاده از اسپکتروفتومتر کنترل شد. نمونه ها قبل از هر اندازه گیری به طور مناسب با آب رقیق شدند. ظاهر رنگ قهوه ای شاهدی است که نانوذرات نقره در مخلوط واکنش تشکیل شده اند و کاهش کافی یون های نقره رخ می دهد. دانش درباره کاهش یون نقره و شکل گیری نانوذرات نقره هنوز روشن نیستند اما معتقدند که مولکولهای پروتئینی و آنزیم، از جمله آنزیم نیترات ردوکتاز به عنوان عامل تنظیم خوبی در سنتز نانوذرات نقره عمل می کند. محلول رنگی شکل گرفته شده اجازه اندازه گیری جذب در برابر طول موج مجزا برای تائید تشکیل نانوذرات نقره را ممکن می سازد. اندازه ذرات و تصویر شبکه ای نانوذرات نقره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) مورد بررسی قرار گرفت.

فعالیت ضد باکتریایی با استفاده از نانوذرات نقره ای سنتز شده با روش انتشار با باکتری گرم منفی(*اشریشیا کلای سودوموناس آئروژینوزا*) و باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) انجام شد. کشت های باکتریایی به منظور بررسی فعالیت ضد باکتری به محیط کشت مایع آورده شد. قطر چاهک حدود ۷ میلی متر بر روی صفحه آگار مولر هینتون با کمک مته استریل شده ساخته شد. کشت با استفاده از اسپری شیشه ای استریل به طور یکنواخت در محیط های کشت جامد پخش شد. ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذرات نقره ای سنتز شده به داخل چاهک ریخته شد و سپس صفحات به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ ℃ تحت انکوباسیون قرار گرفتند و مناطق مهار شده اندازه گیری شدند.

یافته ها

تشکیل نانوذرات نقره به طور عمده از طریق مشاهده بصری تغییر رنگ بیومس و سوپرناتانت در حضور یک میلی مولار نیترات نقره سنجیده شد. تغییر رنگ در لوله های حاوی کشت بیومس باکتری ها و سوپرناتانت با محلول یک میلی مولار نیترات در حضور نور مشاهده شد. علاوه بر این، کنترل های آزمایش مانند بیومس و کشت سوپرناتانت در حضور نیترات نقره و محلول نیترات نقره به تنهایی نیز هیچ تغییر رنگی نشان نداد. بنابراین، تغییر رنگ در نمونه هایی حاوی بیومس و کشت سوپرناتانت می تواند به عنوان نشانه ای از آن سنتز نانوذرات نقره استفاده شود. رنگ قهوه ای نتیجه تحریک رزونانس پلاسمون سطحی در نانوذرات فلزی و شکل معمول از نانوذرات نقره است. تغییرات مشابه در رنگ از زرد کم رنگ به قهوه ای قبلا برای بیومس *باسیلوس لیکنی فورمیس* به دلیل کاهش یون های نقره به نانوذرات نقره گزارش شده است. نانو ذرات نقره دارای یک سطح مشخص رزونانس پلاسمون سطحی در ۴۳۰nm هستند که می تواند با استفاده از طیف سنجی UV–vis اندازه گیری شود. طیف UV-vis یک پیک قوی و گسترده واقع در بین ۴۲۰ nm تا ۴۳۰ برای نانوذرات نقره تولید شده با استفاده از سوپرناتانت کشت مشاهده شد. مشاهده این پیک، اختصاص به پلاسمون سطحی، برای نانوذرات فلز مختلف با اندازه های بین ۲ nm تا ۱۰۰ ثبت شده است.

بررسی نتایج تولید نانو ذرات نقره توسط سوپرناتانت محیط های کشت *باسیلوس لیکنی فورمیس* نشان دهنده این است که در مجموع هر چهار سویه توانایی تولید نانو ذرات نقره را دارا بوده که بررسی تولید نانو ذرات نقره براساس خصوصیات ظاهری (ایجاد رنگ قهوه ای و تست نمک) و بررسی جذب در طول موج ۴۲۰ nm بوده است که نتایج در جدول ۱ در مورد هر سویه نشان داده شده است و تولید نانوذرات نقره در شرایط تاریکی در مورد هر چهار سویه منفی بود.

جدول ۱ نتایج جذب سوپرناتانت کشت نمونه های *باسیلوس لیکنی فورمیس* تهیه شده از بانک میکروبی در طول موج های مختلف

طول موج جدایه	۳۵۰	۴۰۰	۴۲۰	۴۵۰	۵۰۰
۱۳۳۱	۱/۴۴۲	۱/۲۱۱	۱/۱۷۲	۱/۰۵۳	**۰/۷۹۷**
۱۷۲۱	۱/۶۱۰	۱/۳۲۴	۱/۱۸۴	۰/۹۹۷	**۰/۷۱۹**
۱۳۲۰	۱/۸۳۳	۱/۶۱۷	۱/۵۲۸	۱/۲۹۶	**۰/۸۷۴**
۱۵۲۵	۱/۴۸۶	۱/۹۷۹	۰/۸۳۴	۰/۶۸۷	**۰/۵۰۷**

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی نتایج تولید نانو ذرات نقره توسط بیومس *باسیلوس لیکنی فورمیس* های تهیه شده از بانک میکروبی نشان دهنده این است که در شرایط نوری از بین چهار سویه بکار گرفته شده فقط یک سویه قادر به تولید نانو ذرات نقره بوده که نتایج در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲ نتایج جذب بیومس سویه ۱۳۲۰ *باسیلوس لیکنی فورمیس* تولیدکننده نانوذرات نقره در طول موج های مختلف

طول موج جدایه	۳۵۰	۴۰۰	۴۲۰	۴۵۰	۵۰۰
۱۳۲۰	۱/۴۳۱	۱/۲۴۷	۱/۱۷۹	۱/۰۵۸	**۰/۸۱۳**

با توجه به بررسی های انجام شده در خصوص توانایی توأم تولید نانوذرات نقره توسط بیومس و سوپرناتانت جدایه های بدست آمده در مرحله غربالگری، مشخص گردید که از بین دو سویه جداسازی شده فقط یکی از سویه ها بهتر از دیگری از این توانایی در شرایط نوری داشت که برای ادامه کار انتخاب شد که نتایج توانایی تولید نانوذرات نقره و نتایج اثبات نانوذرات تولیدی در جداول ۳و ۴ نشان داده شده است. در شرایط تاریکی نیز هیچ یک از دو جدایه توانایی تولید نانوذرات نقره را نداشتند.

جدول ۳ نتایج جذب بیوماس و سوپرناتانت دو جدایه تولیدکننده نانوذرات نقره در طول موج های مختلف

طول موج جدایه	۳۵۰	۴۰۰	۴۲۰	۴۵۰	۵۰۰
AEZ1s	۲/۷۵۷	۲/۱۹۱	۱/۹۰۶	۱/۵۲۲	**۰/۹۹۱**
AES1s	۲/۷۷۷	۲/۱۲۸	۱/۸۵۷	۱/۴۷۸	**۰/۸۸۲**
AEZ1b	۳/۱۱۹	۳/۵۱۲	۴/۰۶۳	۵/۰۳۱	**۴/۷۹۱**
AES1b	۳/۷۸	۳/۳۹۳	۳/۹۶	۴/۰۹	**۴/۴۲۷**

جدول ۴ نتایج جذب بیومس جدایه AEZb تولیدکننده نانوذرات نقره در طول موج های مختلف

طول موج جدایه	۳۵۰	۴۰۰	۴۲۰	۴۵۰	۵۰۰	۵۵۰
AEZb	۱/۶۵۸	۲/۲۳	۲/۲۸۹	۲/۲۷۹	۱/۹۱۴	**۱/۴۶**

در خصوص تولید نانوذرات توسط سوپرناتانت در دستگاه چرخان زیستی که مدت زمان بیشتری ۷ روز برای ایجاد بیوفیلم نگهداری شده بود نیز بیانگر توانایی تولید نانو ذرات نقره در شرایط نوری بوده است که نتایج در جدول ۵ نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵ نتایج جذب بیومس و سوپرناتانت جدایه AEZ1 تولیدکننده نانوذرات نقره در طول موج های مختلف

طول موج / جدایه	۳۵۰	۴۰۰	۴۲۰	۴۵۰	۵۰۰
AEZ1s	۳/۶۲۲	۲/۵۹۱	۱/۹۹۳	۱/۴۸۴	۰/۹۶۳
AEZ1b	۳/۰۱۵	۳/۲۷۶	۳/۳۵۵	۳/۵۴۷	۳/۶۹۷

نتایج بررسی تولید نانوذرات نقره در شرایط نوری توسط بیوفیلم های ایجاد شده روی صفحات پلیمری دستگاه دیسک های چرخان زیستی نشان دهنده توانایی روش بکار گرفته شده در تولید نانوذرات نقره بوده که نتایج در جدول ۶ نشان داده شده است.

جدول ۶ نتایج جذب بیومس و سوپرناتانت جدایه AEZ1 تولیدکننده نانوذرات نقره در طول موج های مختلف

طول موج / جدایه	**۳۵۰**	**۴۰۰**	**۴۲۰**	**۴۵۰**	**۵۰۰**	**۵۵۰**
AEZ1s	۰/۳۹	۰/۳۹۵	۰/۴۷۹	۰/۴۷۳	۰/۴۴	**۰/۴۲**
AEZ1b	۰/۸۳۸	۱/۵۵۴	۱/۷۱۸	۱/۶۵۹	۱/۶۰۷	**۱/۲۰۹**

جدول ۷ قطر هاله عدم رشد باکتری *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در روش چاهک گذاری بیومس و سوپرناتانت را نشان می دهد.

جدول ۷ قطر هاله عدم رشد باکتری *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در روش چاهک گذاری بیومس و سوپرناتانت بر حسب میلی‌متر

AES1b	۲۰	۲۷	۲۸
قطر هاله(mm) / جدایه	*اشریشیا کلای*	*سودوموناس آئروژینوزا*	*استافیلوکوکوس اورئوس*
AES2b	۲۳	۲۳	۲۷
AEZ1b	۲۱	۲۵	۲۷
AES1s	۱۴	۱۹	۱۸
AES2s	۱۶	۲۰	۲۰
AEZ1s	۱۷	۱۷	۱۸

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در سال های اخیر، توجه زیادی به میکروب ها، به منظور سنتز نانو فلزات توجه شده است به علت این واقعیت که سنتز نانوذرات توسط میکروب ها آسان تر از رویکردهای دیگر است. همچنین سویه های متفاوت باکتری موضوع مطالعات سنتز نانوذرات مانند نقره، آهن، طلا و غیره بوده است. علاوه بر این، باکتری ها به راحتی می توانند دستکاری ژنتیکی شوند و کنترلشان آسان است. در میان همه نانوذرات، یون نقره همیشه برای داشتن خواص ضد میکروبی عالی نشان داده شده است. گزارش های متعدد نشان می دهد که نانوذرات نقره دارای فعالیت ضد باکتریایی موثر در برابر تعدادی از باکتری های بیماری زا، قارچ ها و ویروس ها در غلظت بسیار کم است و بدون عوارض جانبی بر روی بدن انسان است (۱۸). بنابراین، چنین تاریخی در مورد قابلیت ها ما را برای این ایده استفاده از باسیلوس ترموفیلیک برای بیوسنتز نانوذرات نقره در مطالعه حاضر ترغیب کرده است. مطالعه حاضر در مورد بیوسنتز نانوذرات نقره با تغییرات در شدت رنگ از زرد به قهوه ای تیره اثبات شده است. این تغییر در رنگ ممکن است به علت تحریک رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) از نانوذرات نقره یا احیا نیترات نقره باشد(۲۲-۲۱). به طور کلی، نانوذرات نقره، به علت حضور گروه مشخص SPR در ۴۳۰ nm طیف سنجی UV-visible می تواند به عنوان یک شاخص برای اندازه گیری مقدار نانوذرات نقره اندازه گیری شود(۲۳). ظهور پیک های تیز در طول دوره توسعه رنگ به علت پلاسمون سطحی است که به خوبی برای نانو ذرات فلز مختلف با ذرات اندازه های بین ۲ nm تا ۱۰۰ مستند شده است(۲۴). در این اثر نانوذرات نقره را بر رشد هر دو ارگانیسم گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار گرفتند. Chudasama و همکاران و Ramgopal و همکاران گزارش کرده اند که *استافیلوکوکوس اورئوس* (گرم مثبت) یک فعالیت ضد باکتریایی بیشتر در مقایسه با *اشریشیا کلای* (گرم منفی) داشته است. Prakash و همکاران همچنین نتایج مشابهی را برای اثرات ضد باکتریایی از نانوذرات در باکتری های گرم منفی (*اشریشیا کلای*) و گرم مثبت (*استرپتوکوکوس پیوژنز*) گزارش کردند(۲۵-۲۷).

سیف الدین و همکاران یک روش ترکیبی سنتز برای بیوسنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از ترکیبی از کشت سوپرناتانت *باسیلوس سوبتیلیس* و تابش مایکروویو توصیف کردند. آنها بیوسنتز خارج سلولی از مونو دیسپرز نانوذرات نقره با استفاده از سوپرناتانت *باسیلوس سوبتیلیس* گزارش دادند، اما به منظور افزایش میزان احیا و کاهش تجمع نانوذرات تولید شده، آنها از تابش مایکروویو استفاده کردند که ممکن است حرارت یکنواخت را در اطراف نانوذرات فراهم کند و می تواند به تکامل ذرات بدون تجمع کمک کند. طیف سنجی UV-visible یک پیک قوی و گسترده باند پلاسمون سطحی نقره در طول موج ۴۱۰ nm را نشان داد. Kalishwaralal و همکاران سنتز خارج سلولی نانوذرات نقره در حدود ۴۰ nm توسط بیورداکشن یون های نقره محلول با کشت سوپرناتانت *باسیلوس لیکنی فورمیس* گزارش دادند. بیشتر، نانوکریستال نقره به خوبی پراکنده شده با استفاده از *باسیلوس لیکنی فورمیس* سنتز شده است. در مورد *باسیلوس فلکسوس*، نانوذرات نقره کروی و مثلثی شکل (۶۵~ nm-۱۲) با موفقیت بیوسنتز شدند. این نانوذرات اثربخشی ضد باکتریایی را علیه میکروارگانیسم های مقاوم چند دارویی جدا شده بالینی نشان دادند. Wei و همکاران سنتز نانوذرات نقره کریستالی کروی و مثلثی (۱۴/۶~ nm) با تابش خورشیدی از عصاره های بدون سلول *باسیلوس آمیلولیکوفسینس* و نیترات نقره را گزارش دادند. نانوذرات تولید شده نشان داده شده که فعالیت ضد میکروبی علیه *باسیلوس سوبتیلیس* و *اشریشیا کلای* در محیط مایع و جامد دارد. علاوه بر این، *باسیلوس سرئوس* جدا شده از *گراسینیا زانتوکیموس* برای بیوسنتز سبز نانوذرات نقره استفاده شد (۴۰~ nm-۲۰). نانوذرات تولید شده فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری های بیماریزا مانند *اشریشا کلای*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا تیفی* و *کلبسیلا پنومونیه* دارد(۱).

در مطالعه ای توسط Pugazhenthiran و همکاران از گونه *باسیلوس* برای سنتز نانوذرات نقره استفاده کردند. در تصویر TEM نانوذرات بیوژنیک با اندازه ۱۵-۱۰ nm در فضای پری پلاسمی سلول باکتری مشاهده شده است که بین غشای سلول خارجی و درونی است. با این حال، در مقایسه با بسیاری از گزارش های دیگر از باکتری های مقاوم به فلز، که خروج یون های سمی مهمترین مکانیسم سم زدایی است اکثر نقره انباشته شده در اینجا ذرات دانه مانند بین غشای خارجی و غشای پلاسمایی انباشته شده است. اندازه ذرات در نتایج وی بسیار کوچک (۱۵-۵ nm) با استفاده از *سودوموناس استوتزری* نسبت به مطالعات گذشته است(۱۷).

در مطالعه ای توسط Chun-Jing و همکاران از *رودوسودوموناس پالوستاریس* تشکیل و پایداری نانوذرات نقره در محلول کلوئیدی با استفاده از آنالیز طیف UV-vis تایید شد. یک پیک قوی و گسترده بین ۴۲۰ nm تا ۴۶۰ با استفاده از یک اسپکتروفتومتر UV مشاهده شد. افزایش شدت می تواند به دلیل افزایش تعداد نانو ذرات تشکیل شده در نتیجه کاهش یون های نقره موجود در محلول های آبی باشد. مورفولوژی نانوذرات ، با نانوذرات کروی مشاهده شده در میکروگراف بسیار زیاد متغیر است. میکروگراف TEM نشان داد که تنوع در اندازه ذرات وجود دارد. تقریبا ۷۵٪ ذرات در محدوده ۱۰nm تا ۱۵ هستند. اندازه ۱۰٪ نانوذرات مشاهده شده ۱۵ nm تا۲۰ است حدود ۱۵ درصد از نانوذرات در محدوده ۲ nm تا ۱۰ بودند. نانوذرات یکنواختی خوبی نشان دادند. تمام نانوذرات با تجمع

www.SID.ir

Archive of SID

پراکنده و تنوع کمی در سایز مورد توجه بودند. دارای فعالیت ضدباکتریایی در برابر *اشریشیا کلای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با حداقل غلظت کشندگی mg/L ۱۰۰ با روش دیسک دیفیوژن نشان دادند(۵).

در مطالعه ای توسط Kushwaha و همکاران از سوپرناتانت باکتری *اشریشیا کلای* برای سنتز نانوذرات استفاده کردند. نمونه ها زمانی که در معرض محلول نیترات نقره قرار گرفتند طیف وسیعی را در حدود nm ۴۰۰ نشان دادند. حضور رزونانس گسترده تجمع نانوذرات نقره در محلول را نشان می دهد. میکروگراف TEM نشان داد که نانوذرات نقره به خوبی پراکنده هستند و اندازه آنها بین ۲۰nm تا ۵۰ است. مورفولوژی نانوذرات اساسا کروی است و نشان دادند که نانوذرات دارای اثر ضدباکتریایی علیه *باسیلوس سوبتیلیس* و *کلبسیلا پنومونیه* دارند(۲).

در مطالعه ای توسط Paul و همکاران از سوپرناتانت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* برای سنتز نانوذرات استفاده کردند. مشاهده بصری از محیط کشت که با محلول نیترات نقره انکوبه شده است تغییر رنگ را از سبز مایل به زرد تا قهوه ای نشان داد. ظهور رنگ قهوه ای در محیط کشت نیترات نقره به علت کاهش یون های نقره موجب تشکیل نانوذرات نقره شد. این حقیقت را ثابت می کند که تغییر رنگ در آزمایشات مشاهده شده می تواند به عنوان نشانه ای از تشکیل نانوذرات نقره در نظر گرفته شود. در طیف سنجی UV-visible یک پیک قوی و گسترده در طول موج nm ۴۴۲ برای نانوذرات سنتز شده با سوپرناتانت کشت مشاهده شد. میکروسکوپ SEM اندازه ذرات را nm ۸۵-۵۰ و یکسان از نظر قطر نشان داد. نانوذرات نقره اثرات ضد باکتریایی را در برابر هر دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی را نشان دادند. بالاترین منطقه مهار شده در برابر *اشریشیا کلای* و پایین ترین میزان آن در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط نانوذرات سنتز شده ایجاد شده است. به طور کلی، یونهای نقره از نانوذرات به دیواره سلولی باکتری منفی متصل شده و آن را لیز می کنند، که منجر به دناتوراسیون پروتئین و در نهایت مرگ سلول می شود. (۸).

در مطالعه ای توسط Ajah و همکاران فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده توسط *هموفیلوس آنفولانزا* دارای اندازه متوسط ذرات nm ۹۵/۵ تا ۸۰ و کروی در برابر باکتری های بیماریزا، گرم منفی *اشریشیا کلای*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا*، *سراشیا* و باکتری های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس* و *مخمر کاندیدا آلبیکنس* با استفاده از روش دیفیوژن چاهک آگار تست شده است. حداکثر فعالیت نانوذرات نقره در نور برای *استافیلوکوکوس اورئوس* با mm ۳۱ منطقه مهار شده و به دنبال آن *سودوموناس آئروژینوزا* با mm ۳۰ بود. قطر منطقه مهار شده در برابر *کلبسیلا*، *اشریشیا کلای*، *استرپتوکوکوس*، *سراشیا* به ترتیب mm ۲۴،۱۸،۱۵،۱۵در حالی که در مورد کاندیدا آلبیکنس ۲۰mm بود(۱۴).

استفاده از باکتری ها راه خوبی برای تولید دوستدار طبیعت است و هزینه های فعال نانوذرات نقره را می دهد. این مطالعه نتیجه گیری می کند که *باسیلوس لیکنی فورمیس* می تواند به عنوان منبع سنتز نانوذرات نقره مورد استفاده قرار گیرد. روش های بیوسنتتیک به عنوان یک جایگزین برای سنتز شیمیایی و فیزیکی شناخته شده است این روش بیوسنتز باصرفه ، دوستدار طبیعت و مقرون به صرفه است. در مطالعه حاضر بیولوژیکی کارآمد و کم هزینه راه تولید نانوذرات فلزی است و بینش مفیدی به توسعه عوامل ضد میکروبی جدید با افزایش سینرژیک مکانیسم ضد میکروبی علیه میکروارگانیسم های بیماری زا را ارائه می دهد.

REFERENCES

1. Iravani S. Bacteria in Nanoparticle Synthesis: Current Status and Future. International Scholarly Research Notices. 2014:1-18

2. Kushwaha A, Kumar Singh V, Bhartariya J, Singh P, Yasmeen Kh. Isolation and identification of E. coli bacteria for the synthesis of silver nanoparticles: Characterization of the particles and study of antibacterial activity. Eur J Exp Biol. 2015; 5(1):65-70.

www.SID.ir

Archive of SID

3. Xue B, He D, Gao S, Wang D, Yokoyama K, Wang L. Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus Arthroderma fulvum and its antifungal activity against genera of Candida, Aspergillus and Fusarium. Int J Nanomedicine. 2016; 4; 11:1899-906.

4. Saifuddin N, Wong CW, Nur Yasumira AA. Rapid Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Culture Supernatant of Bacteria with Microwave Irradiation. E-Journal of Chemistry. 2009; 6(1): 61-70.

5. Chun-Jing Ch, Hong-Juan B. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using the Phototrophic Bacteria Rhodopseudomonas palustris and Its Antimicrobial Activity Against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Microbiology China. 2010; 37(12): 1798-1804.

6. Paul D, Sinha SN. Extracellular Synthesis of Silver Nanoparticles Using Pseudomonas aeruginosa KUPSB12 and Its Antibacterial Activity. Jordan Journal of Biological Sciences. 2014; 7(4): 245-250.

7. Okafor F, Janen A, Kukhtareva T, Edwards V, Curley M. Green Synthesis of Silver Nanoparticles, Their Characterization, Application and Antibacterial Activity. Int J Environ Res Public Health. 2013; 10: 5221-5238

8. Jannathul Firdhouse M, Lalitha P. Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Its Applications. J Nanotechnol. 2015, 1-18.

9. Mandal D, Bolander ME, Mukhopadhyay D, Sarkar G, Mukherjee P.The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. Appl Microbiol Biotechnol. 2006; 69(5): 485-92.

10. Kalimuthu K, Suresh Babu R, Venkataraman D, Bilal M, Gurunathan S.Biosynthesis of silver nanocrystals by Bacillus licheniformis. Colloids Surf B Biointerfaces. 2008; 65(1):150-3.

11. Minaeian S, Shahverdi AR, Nohi AS, H. R. Shahverdi. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by some bacteria. J Sci I A U. 2008; 17(66): 1-4.

12. Abo-State MAM, Partila AM. Microbial Production of Silver Nanoparticles by Pseudomonas aeruginosa Cell Free Extract. J Eco Heal Env. 2015; 3(3): 91-98.

13. Benakashani F. Allafchian AR, Jalali SAH. Biosynthesis of silver nanoparticles using Capparis spinosa L. leaf extract and their antibacterial activity. Karbala International Journal of Modern Science. 2016; 2(4): 251e258.

14. Ajah HA, Khalaf KJ, Hassan AS, Aja HA. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by Haemophilus influenzae and their antimicrobial activity. J Pharm Sci & Res. 2018; 10(1): 175-179.

15. Jafari A, Pourakbar L, Farhadi Kh, Mohamadgolizad Lida, Goosta Y. Biological synthesis of silver nanoparticles and evaluation of antibacterial and antifungal properties of silver and copper nanoparticles. Turk J Biol. 2015; 39: 556-561

16. Kumar A, Ghosh A. Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles with Bacterial Isolate from Gangetic-Alluvial Soil. International Journal of Biotechnology and Biochemistry 2016; 12(2): 95-102.

www.SID.ir

Archive of SID

17. Pugazhenthiran N, Anandan S, Kathiravan G, Prakash N KU, Crawford S, Ashokkumar M. Microbial synthesis of silver nanoparticles by Bacillus sp. J Nanopart Res. 2009; 11(7): 1811-1815.

18. Deljou A, Goudarzi S. Green Extracellular Synthesis of the Silver Nanoparticles Using Thermophilic Bacillus Sp. AZ1 and its Antimicrobial Activity Against Several Human Pathogenetic Bacteria. Iran J Biotech. 2016; 14(2): 26-32.

19. Jeevan P, Ramya K, Edith Rena A. Extracellular Biosynthesis of silver nanoparticles by culture supernatant of Pseudomonas aeruginosa. Indian J. Biotechnol. 2012; 11: 72-76.

20. Singh R, Wagh P, Wadhwani W, Gaidhani H, Kumbhar V, Bellare J, et al. Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from Acinetobacter calcoaceticus and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. Int J Nanomedicine. 2013; 8: 4277-4290.

21. Mulvaney P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. Langmuir 1996; 12(3):800-788.

22. Gopinath V, MubarakAli D, Priyadarshini S, Priyadharsshini NM, Thajuddin N, Velusamy P. Biosynthesis of silver nanoparticles from Tribulus terrestris and its antimicrobial activity: a novel biological approach. Colloids Surf B. 2012; 96(1):74-69.

23. Naik RR, Stringer SJ, Agarwal G, Jones SE, Stone MO. Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles. Nat Mater. 2002; 1(3):169-172.

24. Henglein A. Physicochemical properties of small metal particles in solution: microelectrode reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition. J Phys Chem. 1993; 97(21):5471-5457.

25. Chudasama, Bhupendra, Vala AK, Andhariya N, Mehta RV, Upadhyay RV. Highly bacterial resistant silver nanoparticles: synthesis and antibacterial activities. J Nanopart Res. 2010; 12(5): 1685-1677.

26. Ramgopal M, Saisushma CH, Abobaker M. Alhasin. Afacile green synthesis of silver nanoparticles using soap nuts. Res J Microbiol. 2011; 6(5):438-432.

27. Prakash A, Sharma S, Ahmad N, Ghosh A, Sinha P. Synthesis of AgNps By Bacillus cereus bacteria and their antimicrobial potential. J Biomater Nanobiotechnol. 2011; 2(2):162-156.

28. Kalishwaralal K, Deepak V, Ram Kumar Pandian S, Kottaisamy M, BarathManiKanth S, Kartikeyan B, et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles

www.SID.ir