

Research Paper

Manganese Mine Actinobacterial Mediated Gold Nanoparticles Synthesis and Their Antibacterial Activities



Faezeh Kabiri¹ , Seyyed Soheil Aghaei¹ , *Ahmad Ali Pourbabaee² , Mohammad Soleimani³ , Tahereh Komeili Movahhed⁴ 

1. Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
2. Department of Soil Science, Biology and Biotechnology Lab, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, Agriculture & Natural Resources Campus, University of Tehran, Iran.
3. Department of Microbiology, School of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Cellular and Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.



Citation Kabiri F, Aghaei SS, Ali Pourbabaee A, Soleimani M, Komeili Movahhed T. Manganese Mine Actinobacterial Mediated Gold Nanoparticles Synthesis and Their Antibacterial Activities. Qom University of Medical Sciences Journal. 2021; 15(3):178-187. <https://doi.org/10.52547/qums.15.3.178>

 <https://doi.org/10.52547/qums.15.3.178>



Received: 05 Feb 2021

Accepted: 01 Apr 2021

Available Online: 01 Jun 2021

ABSTRACT

Background and Objectives: Actinobacteria efficiently can produce different nanoparticles with various biological properties due to their ability to produce secondary metabolites. The present study aimed to examine the isolation and screening of gold nanoparticles via producing actinobacteria from the soil. We also studied their antibacterial activities.

Methods In this study, after the isolation of actinobacteria, the accumulation of gold nanoparticles was investigated. This aim was achieved by changing the color of the reaction medium and its adsorption by UV-visible spectrophotometry. Then, for conducting confirmatory tests, ultraviolet and visible absorption spectroscopy, high-resolution transmission electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, and dynamic light scattering analysis was used. Phenotypic and molecular methods were applied to study the nanoparticle-producing actinobacterium isolate. The antibacterial activity of synthesized gold was explored on pathogenic bacteria.

Results Among the examined 35 Actinobacteria strains, one strain was biosynthesized nanoparticles; it indicated the maximum absorption at 537 nm, i.e., the characteristic of gold nanoparticles. Dynamic light scattering analysis revealed an average size of 44.4 nm. The minimum inhibitory concentration of gold nanoparticles against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* was 5.8 µg/mL, 11.7 µg/mL, and 11.7 µg/mL, respectively. Molecular analysis data revealed that the Actinobacteria isolate was *Amycolatopsis* sp. KMN. The isolate *Amycolatopsis* sp. strain KMN presented 99.82% homology to *Amycolatopsis methanolica*239.

Conclusion Overall, according to the obtained results, nanoparticles biosynthesized using Actinobacter cell extract suggested different properties, making them a suitable candidate for further research concerning nanomedicines.

Keywords:

Actinobacteria, Gold, Nanoparticles, Green synthesizes, Antibacterial activity

* Corresponding Author:

Ahmad Ali Pourbabaee, PhD.

Address: Department of Soil Science, Biology and Biotechnology Lab, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, Agriculture & Natural Resources Campus, University of Tehran, Iran.

Tel: +98 (26) 32224022

E-Mail: pourbabaee@ut.ac.ir

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضدباکتریایی نانو ذرات طلا بیوسنتز شده توسط اکتینوباکتری جدانشده از معدن منگنز و نارچ قم

فائزه کبیری^۱، سید سهیل آقایی^۱، احمد علی پوربابایی^۲، محمد سلیمانی^۳، طاهره کمیلی موحد^۴

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.
۲. گروه علوم خاک، آزمایشگاه زیست شناسی و بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران.
۴. مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۷ بهمن ۱۳۹۹
تاریخ پذیرش: ۱۲ فروردین ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۱۱ خرداد ۱۴۰۰

زمینه و هدف: اکتینوباکتری‌ها به علت توانایی‌شان در تولید متابولیت‌های ثانویه می‌توانند نانوذرات فلزی مختلف با خصوصیات بیولوژیکی گوناگون تولید کنند. این مطالعه با هدف جداسازی و غربالگری سویه‌های اکتینوباکتری بیوسنتزکننده نانوذرات طلا از خاک و بررسی خواص ضد میکروبی نانوذرات تولیدی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه پس از جداسازی اکتینوباکتری‌ها، تولید زیستی نانوذرات طلا از طریق تغییر رنگ محیط واکنش، اسپکتروفتومتر فرابنفش - مرئی، میکروسکوپ الکترونی عبوری، طیف‌سنج مادون قرمز تبدیل فوری و آنالیز پراکندگی نور دینامیکی بیوسنتز نانوذرات طلا تأیید شد. برای شناسایی و بررسی فیلوژنی جدایه منتخب از روش‌های فنوتیپی و مولکولی استفاده شد و اثر ضد میکروبی نانوذرات طلا علیه سه باکتری بیماری‌زا بررسی شد.

یافته‌ها: از مجموع ۳۵ جدایه اکتینوباکتری، یک سویه توانایی تولید نانوذرات طلا با بیشینه جذب در ۵۳۷ نانومتر را داشت. آنالیز پراکندگی نور دینامیکی میانگین اندازه ۴۴/۴ نانومتر را نشان داد. حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات طلا بیوسنتز شده برای باکتری‌های بیماری‌زای اشرشیاکلی، سودوموناس آئروجینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۵/۸، ۱۱/۷ و ۱۱/۷ میکروگرم بر میلی لیتر بود. در آنالیز مولکولی جدایه اکتینوباکتری Amycolatopsis sp. KMN شناسایی شده به میزان ۹۹/۸۲ درصد تشابه فیلوژنتیک با سویه آمیکولاتوپسیس متانولیکا ۲۳۹ داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج بیانگر آن است که نانوذرات طلا بیوسنتز شده توسط عصاره سلولی اکتینوباکتری منتخب دارای خواص ضد باکتریایی است و این جدایه را به عنوان کاندیدای مناسبی برای انجام تحقیقات بیشتر در زمینه نانو - داروها مطرح می‌کند.

کلیدواژه‌ها:

اکتینوباکتری، طلا، نانوذرات، تولید زیستی، عوامل ضد باکتریایی

مقدمه

سال ۱۹۷۴ از دانشگاه علوم توکیو ابداع کرد تا نشان‌دهنده دقت تولید مواد زیستی به صورت صنعتی در مقیاس نانومتر باشد [۱]. مفهوم اساسی نانوتکنولوژی را ریچارد فینمن^۳ فیزیکدان ارائه کرد [۲]. اکنون نانوبیوتکنولوژی پلی بین نانوتکنولوژی و بیوتکنولوژی برای تولید نانوذرات دوست‌دار محیط زیست است. اندازه نانوذرات معمولاً بین ۰/۱ تا ۱۰۰ نانومتر در هر جهت فضا است.

مطالعات نانوتکنولوژی یک زمینه پژوهشی نوظهور است که در علوم پایه و فناوری به منظور تولید مواد در مقیاس نانو کاربرد دارد. پیشوند «نانو» از واژه یونانی نانوس^۱ به معنای کوتوله برگرفته شده است و اشاره به چیزهایی دارد که اندازه آن‌ها یک میلیاردمتر (۱۰^{-۹} m) است. واژه نانوتکنولوژی را نوریو تانیگوچی^۲ در

3. Richard P. Feynman

1. Nanos
2. Norio Taniguchi

* نویسنده مسئول:

دکتر احمد علی پوربابایی

نشانی: تهران، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، آزمایشگاه زیست شناسی و بیوتکنولوژی، گروه علوم خاک.

تلفن: ۰۲۲ ۳۲۲۴۰۲۲ (۲۶) ۹۸+

رایانامه: pourbabaie@ut.ac.ir

روش بررسی

جداسازی سویه آکتینوباکتری

نمونه برداری از خاک مناطق گوناگون معدن منگنز و نارچ قم صورت گرفت. نمونه‌های خاک الک شده و ۱۰ گرم از هر نمونه خاک را در ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد و به مدت یک ساعت در شیکر انکوباتور ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. از مایع رویی سوسپانسیون یاد شده سری رقت ۱-۱۰ تا ۶-۱۰ تهیه شد و سپس به برای به دست آوردن کلنی‌های خالص آکتینوباکتری، ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت بر محیط ISP2^۶ و ISP5^۷ و آکتینومیست ایزولیشن آگار کشت داده شد.

غربالگری جدایه‌های آکتینوباکتری از نظر توانایی بیوسنتز نانوذرات طلا

ابتدا نمونه‌های آکتینوباکتری بر روی محیط MGYB^۸ برات در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه روز کشت داده شدند. سپس سانتریفیوژ بیوماس سلولی را در ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد از محیط کشت جداسازی کرد. برای تولید نانوذرات طلا به صورت خارج سلولی، ۵۰ میلی‌لیتر از مایع رویی به ۵۰ میلی‌لیتر محلول کلرواوریک اسید ۱ میلی‌مولار اضافه شد. سپس نمونه‌ها را در شیکر انکوباتور (محیط تاریک) با ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. برای تولید نانوذرات طلا به صورت داخل سلولی، ۵۰ میلی‌لیتر محلول کلرواوریک اسید ۱ میلی‌مولار به بیوماس سلولی جدایه آکتینوباکتری اضافه شد. تجمع نانوذرات طلا با تغییر رنگ محیط کشت از رنگ زرد به ارغوانی و جذب آن در طول موج‌های ۲۰۰-۸۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر^۹ بررسی شد. سپس برای تست‌های تأییدی، سانتریفیوژ نمونه‌های تغییر رنگ یافته با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد [۱۱].

تست‌های تأییدی تولید نانوذرات طلا

اسپکتروفتومتری UV-vis: با مشاهده تغییر رنگ محیط آزمایش، نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰-۸۰۰ نانومتر بررسی شدند. بلائک استفاده شده در اسپکتروفتومتر، رومانند باکتری کشت داده شده در محیط کشت MGYB و شاهد‌های استفاده شده محیط کشت استریل به همراه محلول کلرواوریک اسید ۱ میلی‌مولار و محیط کشت استریل به همراه آکتینوباکتری

نانو ذرات معمولاً با استفاده از دو شیوه بالا به پایین^۴ و پایین به بالا^۵ ساخته می‌شوند. در روش بالا به پایین، مواد حجیم به تدریج ریزتر می‌شوند تا به اندازه نانو برسند؛ در حالی که در روش پایین به بالا، اتم‌ها یا مولکول‌ها به هم می‌پیوندند تا ساختارهای مولکولی‌ای با اندازه نانومتر تولید شوند. در سنتز شیمیایی و زیستی نانوذرات معمولاً از روش پایین به بالا استفاده می‌شود. پیدایش نانوتکنولوژی سبب توسعه روش‌هایی برای تولید مواد در مقیاس نانو و گسترش استفاده از آن‌ها در زمینه‌های مختلفی مانند تشخیص‌های مولکولی [۳]، کاتالیز [۴]، تحویل دارو به بدن [۵] و حسگرها [۶] بوده است.

در گام نخست، این دانش سبب بهبود روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای تولید نانوذراتی شد که اندازه، شکل و خواص آن‌ها مهم بودند. با این حال، نگرانی‌هایی درباره استفاده از این نانوذرات در زمینه‌های پزشکی وجود داشت زیرا برای ساخت این مواد از شرایط سخت و از مواد شیمیایی سمی استفاده می‌شد و همچنین طی تولید آن‌ها محصولات جانبی تولید می‌شد که برای محیط زیست زیان‌آور بودند. بنابراین یک نیاز مبرم برای یافتن روشی غیرسمی و سازگار با محیط برای تولید این مواد به وجود آمد [۷]. از میان نانوذرات فلزی تولید شده با استفاده از روش سبز توسط میکروارگانیزم‌های مختلف، نانوذرات طلا از مهم‌ترین نانوذراتی است که غیرسمی و سازگار با محیط زیست است. آکتینوباکتریولوژی یک حوزه پژوهشی مهم و نوپدید است. آکتینوباکتری‌ها باکتری‌هایی با ویژگی‌های هوازی، غیرمتحرک، گرم مثبت و اغلب رشته‌ای هستند که بهترین توانایی را در تولید متابولیت‌های ثانویه با فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف دارند [۸]. نمونه‌های زیادی از راسته آکتینوباکتریال‌ها، تولیدکننده متابولیت ثانویه دارای فعالیت بیولوژیکی هستند [۹]. در میان آکتینوباکتری‌ها، گروه استرپتومیسس بیشترین اهمیت را از نظر اقتصادی دارد زیرا بیش از ده هزار آنتی‌بیوتیک شناخته شده یعنی ۵۰ تا ۵۵ درصد از آنتی‌بیوتیک‌ها را استرپتومیسس‌ها تولید می‌کند [۱۰]. تحقیقات نشان می‌دهند آکتینوباکتری‌هایی که از اکوسیستم‌های مختلف جدا شده‌اند، تولیدکننده‌های بالقوه نانوذرات فلزی هستند. از این رو لزوم به دست آوردن سویه‌های جدید آکتینوباکتری‌هایی با توانایی تولید نانوذرات سازگار با محیط زیست و دارای خواص ضدباکتریایی حس می‌شود. هدف از تحقیق حاضر تولید زیستی نانوذرات طلا به کمک آکتینوباکتری‌های جدا شده از خاک معدن منگنز و نارچ استان قم و بررسی خواص ضدباکتریایی نانوذرات طلا بیوسنتز شده علیه سه باکتری بیماری‌زا است.

6. International Streptomyces Project 2 (ISP2)

7. International Streptomyces project 5 (ISP5)

8. Malt extract Glucose Yeast extract Peptone broth (MGYP broth)

9. UV-vis (Cary100, Varian, Australia)

4. Top-down

5. Bottom-up

آزمایش شدند.

آنالیز طیف‌سنج مادون قرمز FTIR^{۱۰}: رسوب حاصل از سانتریفیوژ که حاوی نانوذرات طلاست به مدت ۱۸ ساعت در دستگاه فریزدرایر قرار داده شد و پودر حاصل با KBr به صورت قرص درآورده شده و توسط دستگاه FTIR (FT/IR-4200, Jas-co, japan) مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز با میکروسکوپ الکترونی گذاره با رزولوشن بالا (HR-TEM): برای تعیین شکل و مورفولوژی نانوذرات طلا تولید شده از میکروسکوپ الکترونی گذاره با رزولوشن بالا استفاده شد. پس از آماده‌سازی و خشک شدن نمونه‌ها با لامپ اینفرا رد، با دستگاه میکروسکوپ الکترونی، Tecnai G2 F20 (EFI Co., USA) مشاهده و بررسی شد.

آنالیز پراکندگی نور دینامیکی (DLS): برای تعیین توزیع اندازه ذرات موجود در محلول‌ها استفاده می‌شود. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود. نمونه‌ها به صورت محلول در دیسپرسانت‌های آب توسط دستگاه (SZ-100z Dynamic Light Scattering, Horiba Jobin Jyovin, Japan) بررسی شد.

شناسایی سویه اکتینوباکتری

برای بررسی فنوتایپینگ سویه باکتری تولیدکننده نانوذره طلا از خواص ماکروسکوپی و میکروسکوپی آن استفاده شد. بدین منظور، کشت سه روزه باکتری موردنظر در محیط کشت MGYB، از نظر رنگ و شکل ظاهری کلنی و همچنین توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM (MIRA3, Tescan, Brno, Czech Republic) بررسی شد. برای بررسی ژنوتایپینگ سویه باکتری موردنظر، در ابتدا DNA باکتری توسط کیت استخراج ژنوم (Jena Bioscience GmbH, Germany) استخراج شد. سپس کیفیت باند DNA با الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد. به منظور تکثیر ژن ناحیه 16S rRNA از روش PCR و پرایمرهای 27F-5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و 1492R-5'-ACGGCTACCTGTTACGACTT-3' استفاده شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر متشکل از یک میکرولیتر DNA الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master Mix، ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر و یک میکرولیتر از پرایمرها انجام شد. تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر (Ependorf Mastercycler gradient, Germany) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه واکنش تکثیری DNA در ۳۰ چرخه شامل ۴۵ ثانیه واسرشت ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، گسترش اولیه

10. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت گسترش ثانویه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای آشکارسازی محصول PCR از الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد [۱۲]. توالی‌یابی محصول PCR (تقریباً ۱۵۰۰ جفت باز) توسط پرایمرهای به کار رفته در واکنش PCR به شرکت مربوطه (Microsynth company) ارسال و به روش تمام اتوماتیک Sanger dideoxy sequencing انجام شد و در نهایت توالی به دست آمده با استفاده از برنامه Blastn در پایگاه NCBI BLAST Search tool در سایت <http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST> با توالی‌های 16S rRNA موجود مقایسه و درخت فیلوژنی رسم شد.

بررسی خواص ضدباکتریایی نانوذرات طلا بیوسنتز شده

برای تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC) نانوذرات طلا تولید شده، از روش میکرودايلوشن در میکروتیتیر پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. برای این منظور محلول رویی باکتری حاوی نانوذرات را در ۸ هزار دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوبات به دست آمده سه بار با آب مقطر استریل شست‌وشو و مجدداً سانتریفیوژ شد. باکتری‌های اشرشیاکلی (ATCC ۲۵۹۲۲)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC ۲۹۲۱۳) و سودوموناس آئروجینوزا (ATCC ۲۷۸۵۳) به محیط کشت مولر هینتون براث (۱۰۶ CFU/mL) تلقیح شد. در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث استریل و سپس از نانوذرات طلا تولیدشده سری‌های رقت در محدوده غلظت ۱۵۰۰-۵/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و در نهایت ۱۰ میکرولیتر از تلقیح باکتری اضافه شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. سپس کدورت تمامی چاهک‌ها با استفاده از دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده شد. اولین خانه‌ای که در آن از رشد باکتری‌های بیماری‌زا نسبت به کنترل جلوگیری شد، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی رشد در نظر گرفتیم [۱۳].

یافته‌ها

از محیط خاک معدن منگنز و نارچ ۳۵ سویه اکتینوباکتری جداسازی شد و یک جدایه قادر به بیوسنتز نانوذرات طلا به صورت خارج سلولی بود. همان طور که در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است، رنگ سوسپانسیون میکروبی از زرد به ارغوانی تغییر پیدا کرد. در نتایج حاصل از بررسی‌های فنوتایپینگ رشته‌های میسلیموم مشاهده شد (تصویر شماره ۲). پس از انجام توالی‌یابی مقایسه هم‌ردیفی در پایگاه NCBI Blastn انجام شد و ۹۹/۸۲ درصد تشابه با آمیکولاتوپسیس متانولیکا ۲۳۹ حاصل شد. بنابراین با میزان تشابه به دست آمده حاصل از Blastn جدایه منتخب متعلق به گروه آمیکولاتوپسیس بود (تصویر شماره ۳). طیف به دست آمده از دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش

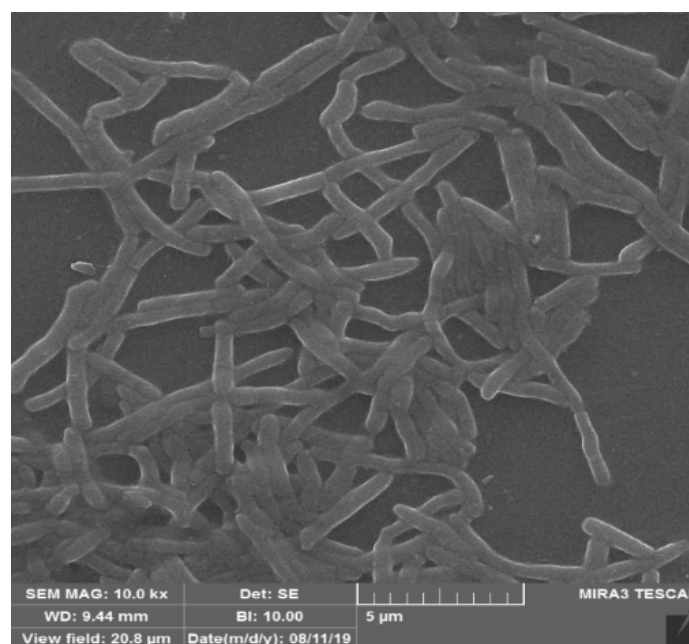


تصویر ۱. تولید نانوذرات طلا

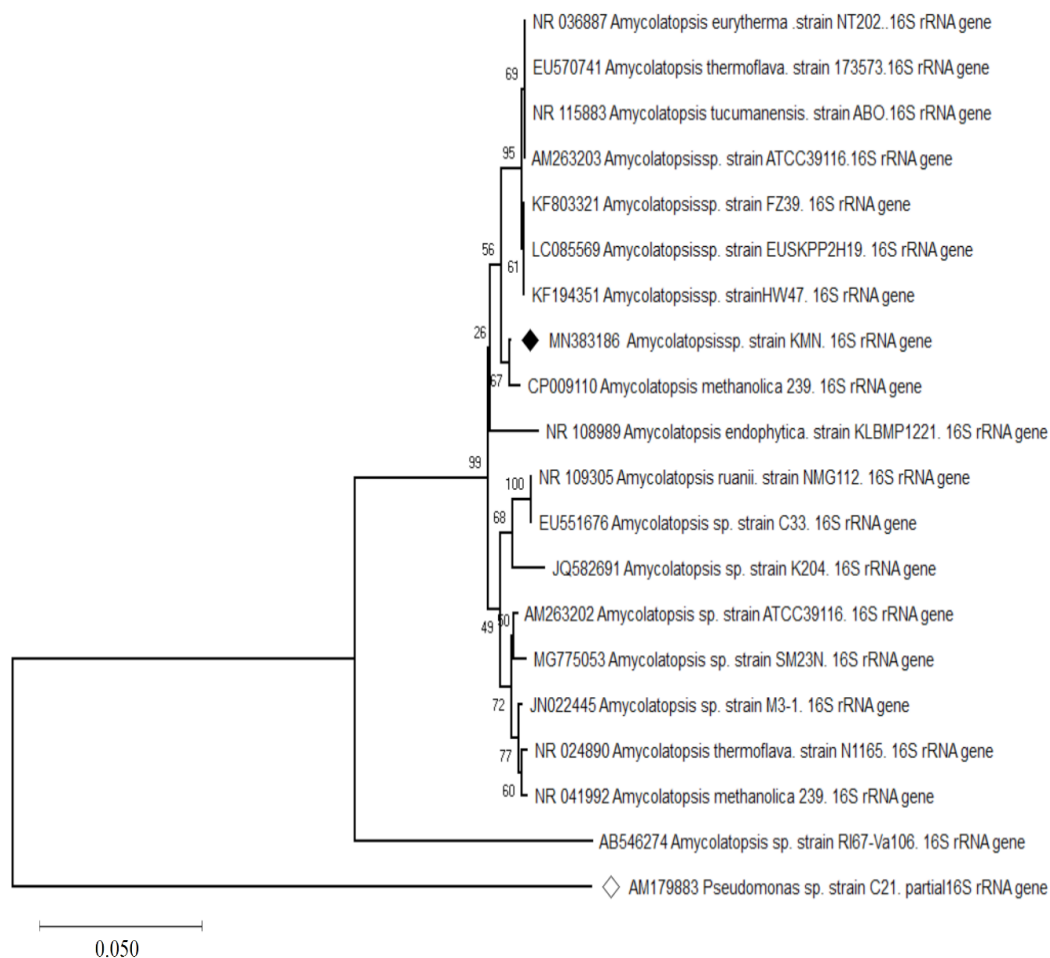
الف: قبل؛ و ب: بعد از تلقیح شدن مایع رویی جدایه منتخب در محلول HAuCl_4 یک میلی مولار.

غلظت مهارکنندگی نانوذرات طلا بیوسنتز شده برای باکتری بیماری‌زای اشرشیاکلی، $5/8$ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات طلا بیوسنتز شده بر روی باکتری‌های سودوموناس آئروجینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس، $11/7$ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد. حداقل غلظت کشندگی نانوذرات طلا بیوسنتز شده روی باکتری‌های بیماری‌زای اشرشیاکلی، سودوموناس آئروجینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس 1500 میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد (جدول شماره ۱).

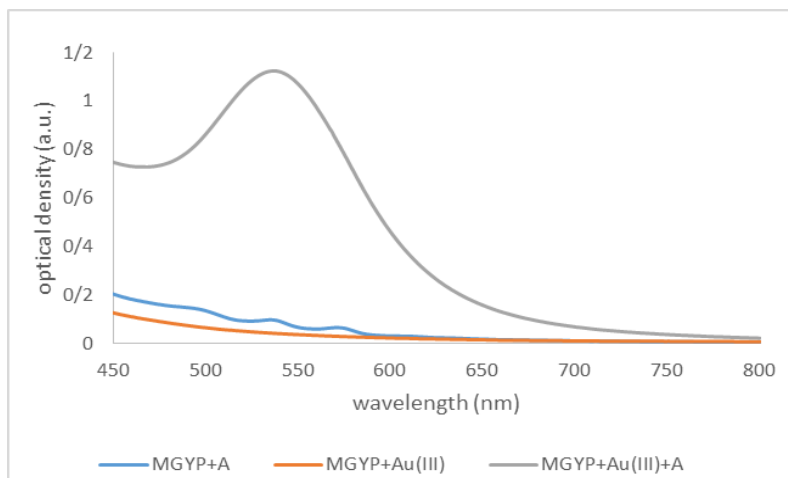
مرئی نشان داد که باند جذبی قوی در طول موج 537 نانومتر ایجاد کرده است (تصویر شماره ۴). در بررسی انجام شده با آنالیز طیف‌سنج مادون قرمز تبدیل فوریه پیک‌های قوی در ناحیه $1-1376$ ، 1630 ، 2921 و 3433 مشاهده شد (تصویر شماره ۵). تصاویر تهیه شده از میکروسکوپ الکترونی گذاره با رزولوشن زیاد مشخص شد، نانوذرات بیوسنتز شده توسط اکتینوباکتری منتخب به شکل کره‌ای و نامنظم بود (تصویر شماره ۶). در آنالیز پراکندگی نور دینامیکی اندازه متوسط نانوذرات بیوسنتز شده دارای اندازه متوسط $44/4$ نانومتر بود (تصویر شماره ۷). حداقل



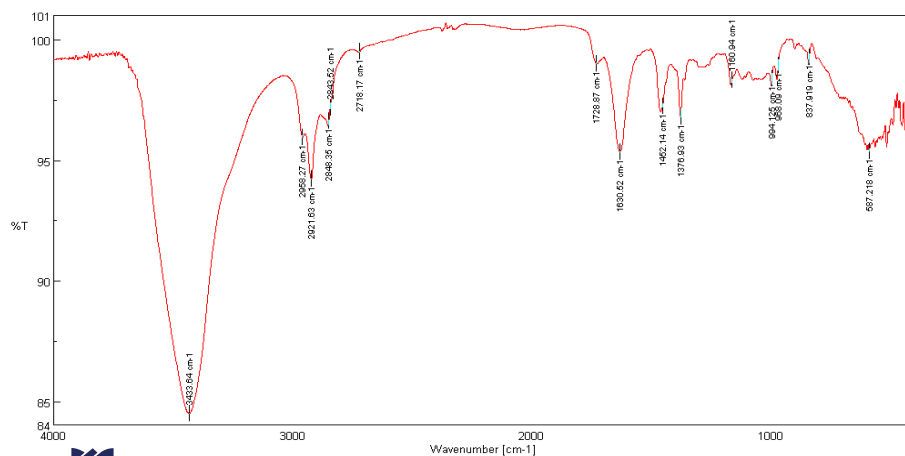
تصویر ۲. بررسی خصوصیات میکروسکوپی آمیکولاتوپسیس سویه KMN توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی



تصویر ۳. درخت فیلوژنی رسم شده با روش Neighbor-Joining با استفاده از نرم افزار MEGA X اعداد واقع در گره کلادها نمایانگر ارزش bootstrap (%) است.

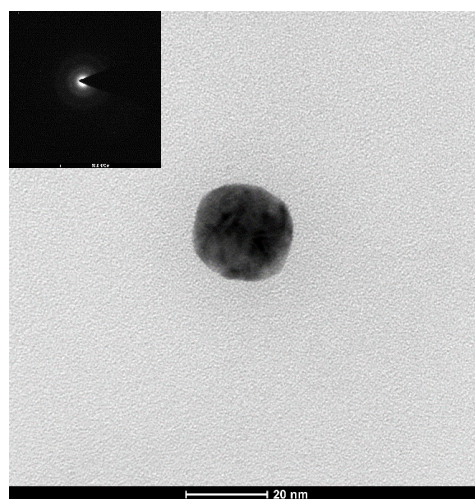


تصویر ۴. نتایج اسپکتروفتومتر به دست آمده با بیشینه جذب در حدود ۵۳۷ نانومتر
A: محلول اسید هیدروکلرواریک و محیط MGYP و آکتینوباکتری منتخب؛ B: طیف کنترل، حاوی محیط MGYP و محلول اسید هیدروکلرواریک.
C: طیف کنترل، حاوی محیط MGYP و آکتینوباکتری منتخب؛



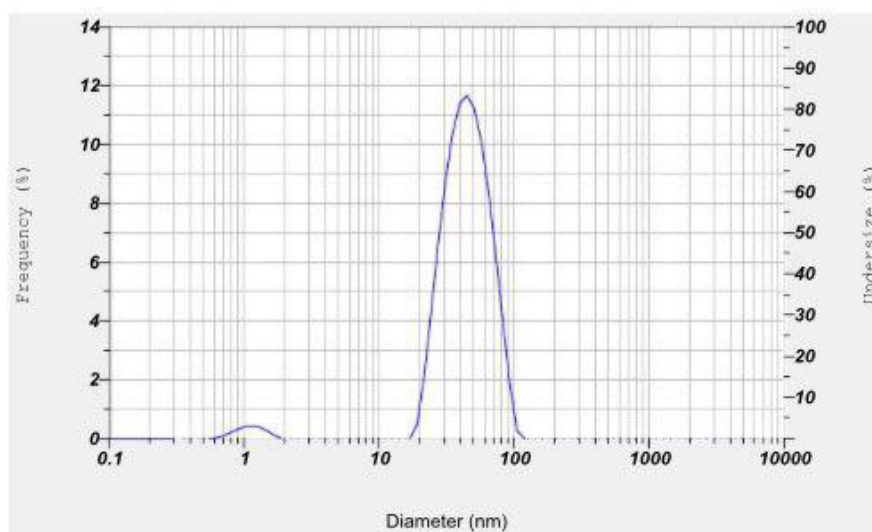
مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۵. الگوی طیف FT-IR نانو ذرات طلا بیوسنتز شده توسط جدایه منتخب



تصویر ۶. میکروگراف الکترونی عبوری با رزولوشن بالا نانوذرات طلا بیوسنتز شده توسط جدایه آکتینوباکتری و الگوی پراش به روش پراش از ناحیه انتخاب شده

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۷. آنالیز پراکندگی دینامیکی نور نانو ذرات طلا بیوسنتز شده توسط جدایه منتخب آکتینوباکتری

جدول ۱. مقادیر MIC و MBC نانوذرات طلا بیوسنتز شده بر سویه‌های بیماری‌زا

درصد رشد سلول باکتری بیماری‌زا				
Minimum Inhibitory Concentration (MIC)		Minimum Bactericidal Concentration (MBC)		نام میکروارگانیزم
غلظت ۱۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره طلا	غلظت ۵/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره طلا	غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره طلا	-	اشرشیاکلی
۷٪	۹۹٪	-	-	استافیلوکوکوس اورئوس
۱۰٪	-	۹۸٪	-	سودوموناس آئروجینوز
۶٪	-	۹۸٪	-	

بحث

استفاده از یک گونه آکتینومیست قلیادوست و گرمادوست به نام ترمومونواسپورا توانستند نانوذرات طلا با اندازه ۹-۱۰ نانومتر به شکل کروی و خارج سلولی تولید کنند که باعث تغییر رنگ محیط باکتری از زرد به ارغوانی می‌شود. این نانوذرات طلا با طیف‌سنجی فرابنفش مرئی در ۵۲۰ نانومتر بررسی شد [۱۱۶] که با مطالعه حاضر مطابقت دارد. گوپال و همکاران گزارش کردند با سوپرناتانت فاقد سلول به دست آمده از استرپتومیسس نانوذرات طلا را تولید کردند. ویژگی‌های این نانوذرات طلا با طیف‌سنجی فرابنفش مرئی در ۵۵۰ نانومتر بررسی شد که با نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر مطابقت دارد. آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که نانوذرات طلا شکل مکعبی دارند و اندازه آن‌ها ۹۰ نانومتر است. با استفاده از روش انتشار از چاهک نیز مشخص شد که این نانوذرات طلا بر ضد قارچ‌های میکوفیتون گیسیوم^{۱۱} و تریکوفیتون روبروم^{۱۲} اثر کشندگی داشتند [۱۱۷].

تورس و همکاران گزارش کردند که آکتینوباکتری‌های گرمادوست و قلیادوست ترمومونواسپورا کورواتا، ترمومونواسپورا فوسکا و ترمومونواسپورا کروموزنا را برای بیوسنتز خارج سلولی نانوذرات طلا به کار برده‌اند. شرایط رشد و بیوسنتز بهینه برای هر آکتینوباکتری مشخص شد. اندازه متوسط نانوذرات طلا بین ۳۰ تا ۶۰ نانومتر بود. این نانوذرات طلا با استفاده تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی شدند. نانوذرات به دست آمده کروی و اندازه یکدست داشتند و در آب محلول بودند [۱۱۷] که با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

در بررسی انجام‌شده توسط آنالیز طیف‌سنج تبدیل فوریه پیک‌های قوی در ناحیه ۱-cm^{-۱} ۱۳۷۶، ۱-cm^{-۱} ۱۶۳۰، ۱-cm^{-۱} ۲۹۲۱ و ۱-cm^{-۱} ۳۴۳۳ مشاهده شده است که نشان‌دهنده پیک جذبی نانوذرات طلا است و اطلاعاتی را در مورد سازماندهی پیوندهای شیمیایی بین اتم‌های سطحی و گروه‌های عاملی

نانوذرات از جنس فلزات گران‌بها (طلا، نقره، روتنیوم، پلاتین، مس، و پالادیم) ابزارهای متنوعی هستند که کاربردهای زیست‌پزشکی گوناگونی دارند، مثلاً در سنجش‌های تشخیصی با حساسیت زیاد، برداشتن عضو با دما و افزایش کارایی رادیو درمانی و همچنین تحویل ژن و دارو به بدن کاربرد دارند. نانوذرات فلزی می‌توانند حامل‌های غیرسمی برای تحویل ژن و دارو به نقاط خاص بدن باشند [۱۱۴]. آکتینوباکتری‌ها می‌توانند مواد غیرآلی را به صورت درون‌سلولی یا بیرون‌سلولی در ابعاد نانو و با شکل‌های مختلف بسازند. بیوسنتز نانوذرات فلزی توسط آکتینوباکتری‌ها وابسته به محل قرارگیری ترکیبات احیاکننده سلول است. اگر آنزیم‌های احیاکننده موجود در دیواره سلولی یا آنزیم‌های ترشح‌شده به بیرون در احیای یون‌های فلزی نقش داشته باشند، آنگاه روشن است که می‌توان نانوذرات فلزی را در بیرون از سلول یافت [۱۱۵].

از بین ۳۵ جدایه آکتینوباکتری جداسازی‌شده در مرحله اولیه این تحقیق، تنها یک جدایه به صورت خارج سلولی در حضور محلول هیدروکلروآریک اسید قادر به تغییر رنگ محیط واکنش از زرد به صورتی بود. جدایه‌های آکتینوباکتری که قادر به احیای یون طلا هستند، رنگ محلول را از زرد به صورتی تا بنفش تغییر می‌دهند. این تغییر رنگ از تغییرات رزونانس سطحی نانوذرات ناشی می‌شود که به دلیل افزایش سطح ذرات نسبت به حجم آن‌هاست. علاوه بر تغییر رنگ، یکی از روش‌های تشخیصی اولیه تولید نانوذرات، طیف‌سنجی فرابنفش مرئی است. نانوذرات طلا دارای جذب نوری در طول موج ۵۲۰ نانومتر تا ۵۶۰ نانومتر هستند که بستگی به اندازه و شکل نانوذره دارد. در مطالعه حاضر براساس طیف‌های اسپکتروفوتومتری جدایه آکتینوباکتری تولیدکننده نانوذرات طلا بعد از تلقیح شدن در محلول هیدروکلروآریک اسید یک میلی‌مولار در ۵۳۷ نانومتر پیک جذبی نشان می‌دهد. ساستری و همکاران نشان دادند با

11. Micophyton gypseum
12. Trichophyton rubrum



اکتینوباکتری‌ها به خاطر تنوع زیادی که دارند، توانایی ذاتی برای سنتز نانوذرات دارند و کارخانه‌های زیستی قابل توجهی برای تولید نانوذرات هستند. از این ویژگی آن‌ها می‌توان در بسیاری از کاربردهای صنعتی استفاده کرد. پژوهش‌های آتی درباره بیوسنتز نانوذرات توسط اکتینوباکتری‌ها و به کارگیری آن‌ها در پزشکی مدرن اهمیت زیادی دارد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

با توجه به موضوع مقاله، این مطالعه نیازی به کد اخلاق ندارد.

حامی مالی

مقاله حاضر بخشی از نتایج حاصل از رساله‌ی دکترای تخصصی گرایش میکروبیولوژی در دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم است. همچنین این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر به یک اندازه مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان هیچ تعارض منافی وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم تشکر می‌کنند.

حاضر در سطح نانو ذرات فراهم می‌کنند. این گروه‌ها عامل احیای یون‌های طلا به نانوذره طلا شده همچنین در پایداری و ممانعت از تجمع و آگلومره شدن نانوذره طلا نقش مهمی ایفا می‌کنند. نمودار حاصل از طیف‌سنجی تبدیل فوریه، پیک در ناحیه $1-1630\text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده وجود گروه N-H آمین موجود در پروتئین، پیک قوی در ناحیه $1-3433\text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده وجود گروه OH موجود در الکل و ترکیبات فنولی و پیک‌ها در ناحیه $1-2921\text{ cm}^{-1}$ و $1-1376\text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده وجود گروه C-H موجود در آلکان‌ها در اطراف نانو ذرات است. نتایج حاضر با مطالعه مانی‌وساگان و همکاران بر روی نانوذرات سنتز شده توسط استرپتومیسس مطابقت دارد [۱۸].

مکانیسم ضدباکتریایی نانوذرات فلزی برای سلول‌ها ناشی از آزاد کردن گونه‌های فعال اکسیژن^{۱۳} توسط این نانوذرات است. خواص ضد باکتریایی نانوذرات طلا مربوط به اکسیداسیون و آزاد شدن تدریجی یون‌های طلا به محیط است. این موضوع سبب شده که این نانوذرات خواص ضدباکتریایی داشته باشند. اندازه کوچک این نانوذرات نیز سبب شده که بتوانند به راحتی از عرض غشای سلول عبور کرده و وارد سلول شوند و بر فعالیت‌های درون سلول تأثیر بگذارند. ویژگی‌های ضد باکتریایی بسیار خوبی که از این نانوذرات دیده می‌شود به دلیل زیاد بودن نسبت سطح به حجم آن‌هاست که سبب می‌شود بیشترین تماس را با محیط داشته باشند [۱۹]. بلاگوروناتان و همکاران گزارش کردند که نانوذرات طلای بیوسنتز شده توسط استرپتومیسس و پریدوزنز فعالیت ضدباکتریایی خوبی بر ضد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اش‌ریشیاکلی داشتند [۲۰] که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. اسکلادانوسکی و همکاران گزارش کردند نانوذرات بیوسنتز شده توسط جدیاه استرپتومیسس فاقد اثرات ضدباکتریایی بر ضدباکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اش‌ریشیاکلی است [۱۳]. این نتایج نشان می‌دهد که فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات بر ضد میکروارگانیزم‌ها وابسته به سایز، شکل و غلظت آن‌هاست.

نتیجه‌گیری

افزایش آگاهی درباره شیمی سبز و فرآیندهای بیولوژیکی منجر به ایجاد علاقه برای دستیابی یک روش دوستدار محیط زیست برای سنتز نانوذرات غیرسمی شده است. بیوسنتز نانوذرات توسط اکتینوباکتریال‌ها بر خلاف روش‌های فیزیکی و شیمیایی که از مواد آسیب‌رسان استفاده می‌کنند، یک روش مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست است. بنابراین، سنتز نانوذرات توسط اکتینوباکتریال‌ها تبدیل به یک شاخه مهم از نانوبیوتکنولوژی شده است. اکتینوباکتری‌ها منابع خوبی برای سنتز نانوذرات با خواص بیولوژیکی (ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدسرطانی، ضدبیوفولینگ، ضد مالاریا، ضدانگل، ضدآکسایش و غیره) هستند.

13. Reactive Oxygen Species (ROS)

References

- [1] Taniguchi N. On the basic concept of nanotechnology. Paper presented at: Proceedings of the International Conference on Production Engineering. 1974; Tokyo, Japan. <https://xi-gywisojopumoda.allesfuersjagen.com/proceedings-of-the-international-conference-on-production-engineering-tokyo-1974-book-1144vy.php>
- [2] Feynman RP. There's plenty of room at the bottom. Miniaturization, 1959: pp. 282-296. [Link no Found]
- [3] Cao YC, Jin R, Mirkin CA. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*. 2002; 297(5586):1536-40. [DOI:10.1126/science.297.5586.1536] [PMID]
- [4] Pearson A, O'Mullane AP, Bansal V, Bhargava SK. Galvanic replacement mediated transformation of Ag nanospheres into dendritic Au-Ag nanostructures in the ionic liquid [BMIM][BF₄]. *Chem Commun*. 2010; 46(5):731-3. [DOI:10.1039/B918866E] [PMID]
- [5] Kang B, Mackey MA, El-Sayed MA. Nuclear targeting of gold nanoparticles in cancer cells induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis. *J Am Chem Soc*. 2010; 132(5):1517-9. [DOI:10.1021/ja9102698] [PMID]
- [6] Nassif N, Roux C, Coradin T, Bouvet OMM, Livage J. Bacteria quorum sensing in silica matrices. *J Mater Chem*. 2004; 14(14):2264-8. [DOI:10.1039/b403958k]
- [7] Bansal V, Ramanathan R, Bhargava SK. Fungus-mediated biological approaches towards 'green' synthesis of oxide nanomaterials. *Aust J Chem*. 2011; 64(3):279-93. [DOI:10.1071/CH10343]
- [8] Zotchev SB. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *J Biotechnol*. 2012; 158(4):168-75. [DOI:10.1016/j.jbiotec.2011.06.002] [PMID]
- [9] Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. RETRACTED: Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbiol Res*. 2013, 168(6):311-32. [DOI:10.1016/j.micres.2013.02.002] [PMID]
- [10] Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiol Res*. 2014; 169(4):262-78. [DOI:10.1016/j.micres.2013.07.014] [PMID]
- [11] Gopal JV, Thenmozhi M, Kannabiran K, Rajakumar G, Velayutham K, Rahuman AA. Actinobacteria mediated synthesis of gold nanoparticles using *Streptomyces* sp. VITDDK3 and its antifungal activity. *Mater Lett*. 2013; 93:360-2. [DOI:10.1016/j.matlet.2012.11.125]
- [12] Farris MH, Olson JB. Detection of Actinobacteria cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers. *Lett Appl Microbiol*. 2007; 45(4):376-81. [DOI:10.1111/j.1472-765X.2007.02198.x] [PMID]
- [13] Składanowski M, Wypij M, Laskowski D, Golińska P, Dahm H, Rai M. Silver and gold nanoparticles synthesized from *Streptomyces* sp. isolated from acid forest soil with special reference to its antibacterial activity against pathogens. *J Cluster Sci*. 2017; 28(1):59-79. [DOI:10.1007/s10876-016-1043-6]
- [14] Xie J, Lee S, Chen X. Nanoparticle-based theranostic agents. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010; 62(11):1064-79. [DOI:10.1016/j.addr.2010.07.009] [PMID] [PMCID]
- [15] Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK. Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications. *J Nanopart Res*. 2008; 10(3):507-17. [DOI:10.1007/s11051-007-9275-x]
- [16] Sastry M, Ahmad A, Khan MI, Kumar R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr Sci*. 2003; 85(2):162-70. <http://repository.ias.ac.in/47133/>
- [17] Torres-Chavolla E, Ranasinghe RJ, Alocilja EC. Characterization and functionalization of biogenic gold nanoparticles for biosensing enhancement. *IEEE Trans Nanotechnol*. 2010; 9(5):533-8. [DOI:10.1109/TNANO.2010.2052926]
- [18] Manivasagan P, Venkatesan J, Kang KH, Sivakumar K, Park SJ, Kim SK. Production of α -amylase for the biosynthesis of gold nanoparticles using *Streptomyces* sp. MBRC-82. *Int J Biol Macromol*. 2015; 72:71-8. [DOI:10.1016/j.ijbiomac.2014.07.045] [PMID]
- [19] Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*. 2009; 8(7):543-57. [DOI:10.1038/nmat2442] [PMID]
- [20] Balagurunathan R, Radhakrishnan M, Rajendran RB, Velmurugan D. Biosynthesis of gold nanoparticles by actinomycete *Streptomyces viridogens* strain HM10. *Indian J Biochem Biophys*. 2011; 48(5):331-5. [PMID]