



آنالیز سنتز و فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات سلنیوم تولید شده توسط سودوموناس آکالیئرنز

مراحم آشنگرف^{۱*}، سیده رویا حسینی^۲

^۱ دانشیار، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی، سنندج، ایران. آکارشناس ارشد، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی، سنندج، ایران

چکیده

سابقه و هدف: نانوذرات سلنیوم به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد فیزیکی شیمیایی و اپتوالکترونیک کاربردهای فراوان در زیست پزشکی، صنعت و محیط زیست دارند. هدف از این پژوهش، استفاده از باکتری‌های آبزی به منظور احیای اکسی آنیون سلنیت به نانو سلنیوم عنصری بود.

مواد و روش‌ها: نانوذرات سلنیوم سنتز شده، به وسیله آنالیزهای طیف سنجی و الکترومیکروگراف‌های تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی تعیین ویژگی شدند. کارایی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده علیه برخی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زای انسانی از طریق روش انتشار چاهک بر سطح آگار بررسی گردید.

یافته‌ها: با استفاده از روش غنی سازی، ۱۶ سویه باکتریایی مقاوم به یون سمی سلنیت در محیط کشت تریپتیک سوی برات/آگار حاوی ۵ میلی مولار یون سلنیت جداسازی شدند. نتایج نشان داد که جدایه دریایی سودوموناس آکالیئرنز سویه SR5 توانایی احیای اکسی آنیون سلنیت به نانوذره سلنیوم را دارد. همچنین یافته‌ها نشان داد که نانوذرات سلنیوم برون سلولی با میانگین اندازه ۳۶ نانومتر در غلظت بهینه سلنیت ۳ میلی مولار و غلظت بهینه بیومس ۱۵ گرم در لیتر، پس از ۹۶ ساعت گرماگذاری در ۲۵ درجه سلسیوس و دور ۲۰۰ rpm در شکل استراحتی سلول تولید می‌شوند.

نتیجه گیری: مطالعه اخیر اولین گزارش از سنتز برون سلولی نانوذرات سلنیوم عنصری توسط گونه باکتری سودوموناس آکالیئرنز است. همچنین نتایج نشان داد که نانوذرات زیستی تولید شده بر روی چهار سویه باکتری بیماری‌زای تاثیر مهار کنندگی دارد.

واژگان کلیدی: نانو سلنیوم، سودوموناس آکالیئرنز، الگوی مقاومت، بهینه سازی، فعالیت ضد باکتریایی.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۸ پذیرش برای چاپ: مهر ماه ۹۸

مقدمه

از قبیل ترکیب، اندازه، شکل، ساختار، آرایش اتمی و بار سطحی آن‌ها تعیین کننده کاربرد آن‌ها است. این دسته از مواد، دارای خواص فیزیکی و شیمیایی بی‌مانندی هستند که به دلیل سطح گسترده و اندازه‌ی نانومقیاس آن‌ها است (۲). سلنیوم به عنوان یک ماده کاربردی، یک نیمه هادی مهم و یک عنصر فوتوالکتریک شناخته می‌شود که این ویشی ناشی از ویژگی‌های فیزیکی خاص آن است. از این رو، این ماده

نانوساختارهای سلنیوم شامل نانوسفرها، نانوذرات و نانوسیم‌ها هستند و در مقایسه با هم‌تایان خود دارای خواص غیرمعمول دارند. همچنین سمیت شان نیز هفت برابر کم‌تر از دیگر مواد زیستی دارند (۱). ویژگی‌های ذاتی نانوذرات سلنیوم

* آدرس برای مکاتبه: سنندج، دانشگاه سنندج، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی
تلفن: ۰۸۷۳۳۶۶۶۶۰
پست الکترونیک: m.ashengroph@uok.ac.ir



حالت توده و تجمع یافته ظاهر نمی‌شوند. اما در تولید شیمیایی نیاز به افزودن خارجی مواد پایدار کننده وجود دارد (۷). نانوذرات سلنیوم می‌توانند به راحتی توسط احیای میکروبی اکسی آنیون‌های سلنیوم در شرایط هوایی و بی‌هوایی تولید شوند. این روش سودمند های زیادی دارد است. چرا که، محصول را می‌توان در دما و فشار محیط با تجهیزات نسبتاً غیر تخصصی تولید کرد (۲).

به عبارت دیگر، اکثر روش‌های مورد استفاده برای ساخت نانومواد سلنیوم با درجه حرارت و فشار بالا همراه هستند و برای محیط زیست خطرناک می‌باشند. بنابراین، توسعه رویکردهای تمیز، غیرسمی و سازگار با محیط زیست برای تولید نانوذرات ضروری می‌باشد. از این رو، تولید زیستی نانومواد همواره مورد توجه ویژه‌ای بوده است (۸).

تولید نانوذرات سلنیوم توسط میکروارگانیسم‌های مقاوم به سلنیت به عنوان یکی از مکانیسم‌های سمیت زدایی اکسی آنیون‌های سلنیوم گزارش شده است. تولید این نانوذرات می‌تواند به صورت برون سلولی، درون سلولی یا در غشا صورت بگیرد. سنتز زیستی نانوذرات سلنیوم در سویه‌های باکتری مختلف متعلق به جنس‌های *Bacillus* (۹)، *Sudomonas* (۸)، *Pantoea* (۳)، *Enterococcus* (۱۰) و *Vibrio* (۱۱) و سویه‌های قارچی مختلف متعلق به جنس مخمیری *Saccharomyces* (۱۰) و جنس‌های کپکی *Aspergillus*، *Alternaria*، *Fusarium* و *Trichoderma* گزارش شده است (۷). غربالگری‌های وسیع با هدف جداسازی سویه‌های جدید باکتری با امکان تولید نانوذره سلنیوم می‌تواند موجب توسعه زیست واکنشگرهای باکتری کارآمد در صنایع فناوری نانو گردد.

در این پژوهش، قابلیت ذاتی سویه‌های بومی باکتریایی آبزی به‌عنوان زیست کاتالیزگر در احیای زیستی سلنیت سدیم به نانوذرات سلنیوم عنصری و همچنین بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده مورد بررسی قرار گرفت.

کاربردهای غیر زیستی فراوانی را در سلول‌های نوری، آشکارساز عکاسی، سلول‌های خورشیدی، یک سو کننده‌ها، سنسورها و تصفیه پساب پیدا کرده است (۱ و ۳).

همچنین نانوذرات سلنیوم برای کاربردهای مختلف زیستی در زمینه پزشکی به دلیل اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم بالاتر که در نتیجه، جایگاه‌های فعال بیشتری را برای برقراری ارتباط با مولکول‌های زیستی فراهم می‌کند، بسیار حائز اهمیت هستند. سمیت نانوذرات سلنیوم ۷ برابر کم‌تر از سدیم سلنیت است و از طرف دیگر راندمان بالاتری نسبت به دیگر اشکال سلنیوم‌های آلی دارند. به دلیل این ویژگی‌هایی بی‌مانند نانوذرات سلنیوم در زمینه‌های مختلف پزشکی و دارویی به ویژه پیشگیری و درمان سرطان (۴)، قابلیت ضد میکروبی در برابر گروه گسترده‌ای از سویه‌های بیماری‌زا (۵)، اثرات آنتی اکسیدانتی از راه استحکام سیستم دفاعی داخل سلولی و حذف رادیکال‌های آزاد سمی (۴ و ۶) و همچنین به عنوان مکمل غذایی با هدف افزایش رشد، بازده تبدیل خوراک و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی جوجه‌های گوشتی (۱) مورد توجه قرار گرفته‌اند.

روش‌های فیزیکی و شیمیایی متعددی برای ساخت نانوذرات سلنیوم به کار گرفته می‌شود. اما توسعه مسیرهای سازگار با محیط زیست از اهمیت زیادی برخوردار است (۱). نانوذرات سلنیوم می‌توانند از طریق روش‌های فیزیکی مانند قطع لیزر، تابش فرابنفش و روش‌های هیدروترمال تولید شوند. ساخت شیمیایی نانوذرات با رویکردهای رسوب، تجزیه اسید و کاهش کاتالیزوری با استفاده از اسید آسکوربیک، گلوکز، دی اکسید گوگرد و سدیم دو سیل سولفات صورت می‌گیرد. با این حال، این روش‌ها نیازمند دمای بالا، pH اسیدی و پیش‌سازهای شیمیایی نامطلوب هستند که ممکن است نانوذرات را برای کاربردهای زیست پزشکی نامناسب کند. در مقابل، تولید زیستی نانوذرات سلنیوم ایمن و ارزان بوده و از مواد زیست سازگار غیرسمی استفاده می‌شود. در کنار تمام این مزایا، نانوذرات سلنیوم زیستی پایدارتر هستند و به دلیل دارا بودن پوشش‌های طبیعی از مولکول‌های آلی با گذشت زمان به

مواد و روش ها

پور ۰/۲۵ میکرونی استریل شد. میزان تراکم استفاده شده برای یون سلنیت بر حسب میلی مولار عبارت بود از ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰، ۷۵، ۸۰، ۸۵، ۹۰، ۹۵، ۱۰۰ و ۱۰۵. پلیت‌های یاد شده به مدت زمان تقریبی ۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفته تا سطح آن‌ها کاملاً خشک شود. سپس مقدار ۱۵ میکرولیتر از محیط مایع حاوی باکتری مورد نظر با غلظت ۰/۵ مک فارلند (باکتری تلقیح شده $10^8 \times 10^4$ CFU/ml) بر روی محیط‌های کشت قرار گرفت. پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس گرمخانه گذاری شده و بعد از ۴۸ ساعت مورد مطالعه قرار گرفتند (۱۳).

ج) سنتز نانوذرات سلنیوم توسط سویه‌های باکتریایی مقاوم و انتخاب سویه کارآمد: برای بررسی اولیه توانایی سنتز نانوذرات سلنیوم توسط سویه‌های باکتریایی جداسازی شده، از راهبرد سلول‌های رویشی استفاده شد (۱۴). برای این منظور ابتدا ۲۰ میلی لیتر محیط تریپتیک سوی برای استریل را به طور جداگانه به درون ارلن‌های استریل ۱۰۰ میلی لیتری ریخته و یک لوپ از بیومس باکتریایی تازه رشد یافته (کشت ۲۴ ساعته) به درون آن تلقیح شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور با دور ۲۰۰ rpm و دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس گرمخانه گذاری گردید. پس از ۲۴ ساعت استوک سلنیت سدیم با غلظت نهایی ۲/۵ میلی مولار به سوسپانسیون باکتریایی افزوده شد و ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در شرایط یاد شده صورت گرفت. سپس مقدار تقریبی ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون‌های یادشده نمونه برداری و جذب آن‌ها در محدوده ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر بررسی شد. این بررسی جذب هر ۲۴ ساعت یک بار تا ساعت ۹۶ ادامه یافت. در این رویکرد از محلول تلقیحی باکتری مورد نظر در محیط تریپتیک سوی برای فاقد استوک سلنیت سدیم به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. به منظور انتخاب بهترین سویه باکتریایی، علاوه بر بررسی میزان تغییر رنگ کلنی، آنالیزهای UV-visible spectrophotometer هم مورد استفاده قرار گرفت.

د) شناسایی فنوتیپی و مولکولی: شناسایی فنوتیپی و بیوشیمیایی سویه SR5 براساس شکل ظاهری، واکنش گرم، آزمون‌های

الف) غنی سازی باکتری های آب زی مقاوم به اکسی آنیون سلنیت: به منظور غنی سازی باکتری‌های آبی بومی مقاوم به یون سلنیت، نمونه گیری از عمق ۱۵ تا ۳۰ سانتی متری از آب‌های مناطق مختلف ایران به ویژه شهرهای همدان، اصفهان، مشهد، خرم آباد، کرمانشاه، سنندج، بابلسر، مازندران و ارومیه صورت گرفت. نمونه‌های آب در ظروف پوشش‌دار استریل به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ درجه سلسیوس تا هنگام استفاده نگهداری شدند. مقدار ۲۰ میلی لیتر از نمونه‌های آب به درون لوله‌های فالکون ۴۵ میلی لیتری استریل منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رومانند خارج شد. سپس مقدار تقریبی یک میلی لیتر از مایع زیرین به پلیت‌های دارای محیط کشت غنی شده تریپتیک سوی آگار اضافه گردید و به صورت چمنی کشت داده شدند. به محیط‌های کشت یاد شده، یون سلنیت در غلظت نهایی ۵ میلی مولار، پس از استریل شدن توسط فیلترهای سرسرنگی ۰/۲۵ میکرونی، افزوده شد. سپس این پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. به منظور تهیه کلنی‌های خالصی از سویه‌های باکتریایی مختلف، کلنی‌های باکتریایی با استفاده از ویژگی‌های ظاهری مانند رنگ و شکل کلنی جداسازی و در پلیت‌های تریپتیک سوی آگار به طور مجزا به صورت خطی کشت داده شدند. در نهایت از کلنی حاصل نمونه برداری گردید و به پلیت‌های تریپتیک سوی آگار دیگری به منظور اطمینان از خالص بودن کلنی منتقل گردید (۱۲).

ب) الگوی مقاومت نسبت به اکسی آنیون سلنیت: برای تعیین الگوی مقاومت سویه‌های باکتریایی نسبت به یون سمی سلنیت از روش رقت در آگار استفاده شد. برای این هدف باید پلیت‌هایی با غلظت‌های مختلفی از سلنیت سدیم تهیه کرد. به ارلن‌های ۱۲۵ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت تریپتیک سوی آگار ذوب شده، تراکم‌های خاصی از یون سلنیت اضافه شد. سپس داخل پلیت‌های شیشه‌ای به قطر ۸ سانتی متر ریخته شد. محلول‌های استوک سلنیت در آب دمین استریل تهیه شد. پس از آن با استفاده از پالایه‌های غشایی میلی

تعیین توالی به شرکت زیست فناوری ارسال گشت. نتایج مربوط به تعیین توالی‌های رفت و برگشت پس از ویرایش توسط نرم افزارهای BioEdit و FinchTV به صورت یک توالی کامل تهیه شد. سپس توالی‌های حاصل توسط نرم افزار BLAST موجود در بانک ژنی NCBI با سویه مورد نظر مقایسه و نزدیک‌ترین سویه باکتریایی بر اساس توالی *rdna 16S* تعیین شد. به منظور تایید نتایج حاصل از شناسایی سویه منتخب، درخت فیلوژنتیکی برای سویه یاد شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 و بر اساس روش neighbor-joining و با بوت استرپ ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد. همچنین فاصله ژنتیکی بر پایه روش Kimura-2-parameter محاسبه شد (۱۷).

ه) تاثیر عوامل مختلف بر سنتز نانوذرات سلنیوم و بهینه سازی فرآیند: برای تعیین بهترین غلظت استوک سلنیت سدیم به منظور تولید نانوذرات سلنیوم از رویکرد سلول‌های در حال استراحت استفاده شد (۱۸). با این هدف، ابتدا مقدار ۵۰ میلی لیتر محیط تریپتیک سوی براث به درون ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری مجزا انتقال داده شد. سپس یک کلنی از کشت تازه به درون آن‌ها تلقیح شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه‌ی سلسیوس و دور ۲۰۰ rpm و pH برابر ۷ از آن‌ها سلول در حال استراحت تهیه گشت. سپس به ارلن‌های یاد شده استوک سلنیت سدیم با غلظت‌های نهایی ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی مولار افزوده شد. در نهایت پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در شرایط یاد شده جذب نمونه‌ها در محدوده مربوط به پیک جذبی نانوذرات خارج سلولی (۶۵۰-۵۸۰ نانومتر) و با روش اسپکتروفتومتری گرفته شد و مورد مقایسه قرار گرفت. در این بررسی از سلول‌های در حال استراحت سویه منتخب فاقد استوک سلنیت سدیم به عنوان کنترل منفی استفاده شد. در ادامه و با هدف بهینه سازی بیشتر فرآیند، بررسی اثر غلظت‌های بیومس (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ گرم در لیتر) و زمان گرماگذاری (۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۲۵۶ ساعت) بر روی سنتز نانوذرات سلنیوم با راهبرد سلول در حال استراحت و در محیط زیست تبدیلی در شرایط واکنش مشابه

اکسیداز و کاتالاز، احیای نیترات، تست مصرف سیترات، هیدرولیز کازئین، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز اوره، هیدرولیز تیروزین، هیدرولیز توین ۲۰، هیدرولیز توین ۸۰، تولید DNAase، تولید H_2S ، تولید اسید از منابع کربوهیدراتی از جمله گلوکز، فروکتوز، سوکروز، مالتوز، زایلوز و همچنین تولید اسید از منابع الکلی به ویژه اتانول، گلیسرول و مانتول طبق دستورالعمل کوان (Cowan) و استلا (Stell) انجام شد (۱۵). در ادامه، استخراج DNA ژنومی سویه SR5 با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت متابیون (Mi-bacterial Genomic DNA Isolation Kit mi-BD 100) ساخت کشور آلمان انجام شد.

سپس ژن *rdna 16S* به کمک آغازگرهای عمومی fd1 ()
rp2 و (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) ()
ACGGCTACCTTGTTACGACTT) تکثیر گردید ()
۱۶). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش انجام شد. این مخلوط شامل ۱۲/۵ میکرولیتر ماسترمیکس (بافر PCR، $MgCl_2$ ، dNTPs و آنزیم Taq-polymerase)، ۱ میکرولیتر پرایمرهای بالا دست و پائین دست با غلظت تقریبی ۱۰ میکرو مولار، ۱ میکرولیتر DNA الگو با غلظت تقریبی ۲۵ نانو گرم بر میکرولیتر و ۹/۵ میکرولیتر آب بود. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت. برنامه تکثیری ابتدا به مدت ۱ دقیقه با واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس شروع و سپس با ۳۰ سیکل به مدت ۴۵ ثانیه به صورت واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس ادامه یافت. گام بعدی چسبیدن پرایمر به DNA ژنومی بود که به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۵۰ درجه‌ی سلسیوس صورت گرفت. در ادامه تکثیر DNA به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در نهایت محصول PCR با استفاده از ژل الکتروفورز ۱٪، ولتاژ ۸۰ و شرایط بافری TBE بررسی شد. پس از انجام واکنش PCR، تک باندهای مشخصی در ناحیه ۱۵۰۰ جفت بازی مشاهده شد. سپس محصول حاصل به منظور

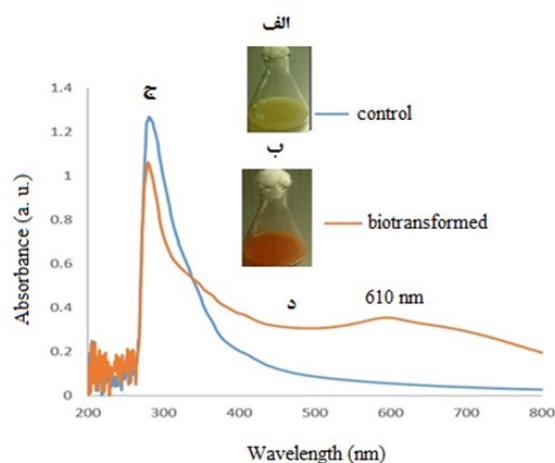
فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سلنیوم سنتز شده توسط سویه منتخب از طریق روش انتشار چاهک بر سطح آگار سنجش شد (۲۰). در این رویکرد ابتدا سوسپانسیون میکروبی با کدورتی معادل نیم مک فارلند (1×10^8 CFU/ml) تهیه شد. سپس با استفاده از میله استریل بر سطح محیط کشت مولر هیتون آگار، کشت چمنی از باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و منفی مورد مطالعه شامل *اشریشیا کلی* (*E. coli* IBRC-M 10871)، *کلبسیلا اکسی‌توکا* (*K. oxytoca* IBRC-M 10639)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*S. aureus* IBRC-M 10690) و *انتروکوکوس فکالیس* (*E. faecalis* IBRC-M10740) انجام گرفت. این باکتری‌ها به صورت آمپول لیوفلیزه از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیک ایران خریداری شدند سپس بر روی پلیت‌های حاوی باکتری‌های مورد مطالعه چاهک اعمال شد. برای ایجاد چاهک به کمک چوب پنبه سوراخ کن چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی متر ایجاد شد. سپس کف چاهک‌ها با ۵۰ میکرولیتر از روماندا حاوی نانوذره‌ی سلنیوم سنتز شده پوشانده شد. پس از آن پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای مناسب گرماگذاری شدند. در نهایت با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، میزان حساسیت باکتری‌ها مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها

الف) جداسازی سویه های باکتری مقاوم به سلنیت با قابلیت احیای سلنیت به نانو سلنیوم عنصری: با توجه به سمیت بالای یون سلنیت بر روی سلول‌های باکتریایی، شناسایی باکتری‌های تحمل‌پذیر به غلظت‌های بالای یون سلنیت قدم اول در انتخاب سویه‌هایی است که قادر به احیای یون سلنیت و تبدیل آن به نانوذره سلنیوم بوده و می‌تواند ما را به انتخاب سویه برتر هدایت نماید. در این راستا پس از جمع‌آوری نمونه‌های آبی مناطق مختلف، در محیط غنی کننده تریپتیک سوی برات/آگار حاوی ۵ میلی مولار یون سلنیت، توسط کشت چمنی و کشت خطی یک مجموعه میکروبی تهیه شد. در مجموع ۱۶ سویه باکتریایی مقاوم به سلنیت و با قابلیت احیای یون سمی سلنیت به سلنیوم عنصری (ایجاد کلنی‌های قرمز رنگ در محیط حاوی

بررسی شد. تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. (و مشاهدات ظاهری و دستگاهی به منظور تأیید سنتز نانوذرات سلنیوم: به منظور تأیید تولید نانوذرات سلنیوم توسط سویه باکتری SR5، علاوه بر بررسی مشخصات ظاهری (تغییر رنگ محلول واکنش)، از بررسی‌های دستگاهی شامل اسپکتروفتومتری UV-visible (Specord 210) ساخت آلمان، طیف‌سنج پراش انرژی پرتوایکس یا EDX (مدل Mira 3-LMu ساخت کمپانی TESCAN کشور چک)، دستگاه طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز یا FTIR (مدل Bruker, VECTOR 22 ساخت کشور آلمان)، هیستوگرام و منحنی نرمال مربوط به دامنه پراکنش اندازه نانوذرات سلنیوم و همچنین الکترومیکروگراف‌های تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM مدل Mira 3-LMu ساخت کمپانی TESCAN کشور چک) استفاده شد. در اولین گام، تغییر رنگ محلول واکنش، تولید نانوذرات سلنیوم را تأیید نمود. در گام بعدی، بررسی طیف جذبی اسپکتروفتومتری صورت گرفت. به منظور تعیین طیف جذبی اسپکتروفتومتری محلول روماندا حاصل از سانتی‌فیوژ، نمونه‌ها با سرعت $5000 \times g$ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس، سانتی‌فیوژ شد. سپس آنالیزهای FTIR، EDX و SEM با هدف بررسی وضعیت نانوذرات سنتز شده و همچنین بررسی شکل و اندازه آن‌ها انجام پذیرفت. برای این منظور ابتدا روماندا عاری از بیومس باکتری از فیلترهای سرنگی 0.22 میکرونی عبور داده شد و سپس با هدف تخلیص نانوذرات سلنیوم تشکیل شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی، اکتانل به نسبت ۲ به ۱ به نمونه‌ها افزوده شد. پس از سانتی‌فیوژ کردن ($5000g$ به مدت ۵ دقیقه) و گرماگذاری در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت، دو فاز تشکیل می‌شود. فاز آلی حاوی نانوذرات سلنیوم با کلروفرم، اتانول مطلق و آب دمین استریل شستشو داده شد (۱۹). در نهایت نمونه‌ها در دستگاه فریزدرایر (مدل Alpha 1-2Dplus ساخت شرکت Martin Christ کشور آلمان) به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند.

(ز) بررسی فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات سلنیوم سنتز شده:



شکل ۱: مشاهدات چشمی (الف): محیط کشت تریپتیک سوی برات فاقد سلنیت و تلقیح شده با میکروب و ب: محیط کشت تریپتیک سوی برات حاوی سلنیت و تلقیح شده با میکروب) و طیف‌های اسپکتروفوتومتری (ج): محیط کنترل فاقد سلنیت و د: محیط کشت تلقیح شده با میکروب و حاوی سلنیت) به منظور نشان دادن توانایی سنتز زیستی نانوذرات سلنیوم توسط سویه‌ی باکتری SR5 پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس و دور شیکر ۲۰۰rpm.

عنصری) نشان داد که بیان‌گر وجود نانو سلنیوم در مخلوط واکنش زیست تبدیلی است (شکل ۱). بر اساس منابع معتبر پیشینه پیک جذبی نانوذرات سلنیوم عنصری در طول موج‌های ۵۸۰ تا ۶۵۰ نانومتر می‌باشد (۲ و ۱۹). در محلول کنترل (عاری از استوک سلنیت سدیم)، در طول موج‌های بین ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر هیچ پیک جذبی مشاهده نشد (شکل ۱).

ب) شناسایی فنوتیپی و مولکولی: سویه باکتری SR5 که بر اساس آنالیزهای ظاهری و مشاهدات دستگاهی با استفاده از آنالیزهای اسپکتروفوتومتری قابلیت احیای زیستی سلنیت سدیم به نانوذره‌ی سلنیوم عنصری را دارا بود، انتخاب و بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی تشخیصی متداول مورد شناسایی قرار گرفت. ویژگی‌های ریخت‌شناسی و کشتی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک سویه باکتری منتخب SR5، به ترتیب در شکل (۲) و جدول (۲) نشان داده شده است.

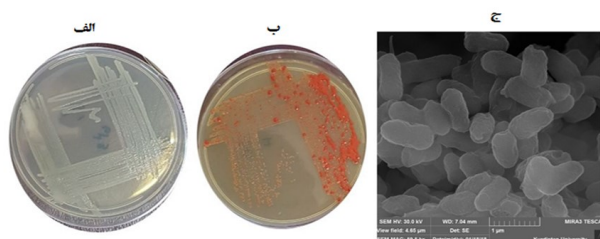
بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی و بر اساس کتاب‌های مرجع و مقالات منتشره در این ارتباط، سویه‌ی SR5 به طور موقت به عنوان *سودوموناس آلکالیژنز* تشخیص داده شد. به منظور شناسایی دقیق سویه‌ی SR5، ابتدا DNA ژنومی

جدول ۱: تعیین الگوی مقاومت سویه‌های باکتری جدا شده نسبت به یون سمی سلنیت با استفاده از روش رقت در آگار.

| مقاومت نسبت به سلنیت (میلی مولار) | جدایه‌ی باکتری |
|-----------------------------------|----------------|
| ۱۰ | SR1 |
| ۲۵ | SR2 |
| ۳۵ | SR3 |
| ۵۵ | SR4 |
| ۱۰۰ | SR5 |
| ۱۵ | SR6 |
| ۲۵ | SR7 |
| ۸۵ | SR8 |
| ۸۰ | SR9 |
| ۹۵ | SR10 |
| ۵۰ | SR11 |
| ۲۵ | SR12 |
| ۱۰ | SR13 |
| ۱۵ | SR14 |
| ۷۵ | SR15 |
| ۶۵ | SR16 |

سلنیت بیان‌گر پتانسیل ذاتی سویه‌ها در احیای اکسی آنیون سمی سلنیت به فرم سلنیوم عنصری است) از آب جداسازی شد. در ادامه مقاومت ذاتی همراه با احیای این سویه‌ها نسبت به یون سمی سلنیت به وسیله روش رقت در آگار تعیین گردید (جدول ۱).

بر اساس نتایج به دست آمده، ۱۶ سویه‌ی باکتری آبری جداسازی شده، مقاومت ذاتی بین ۱۰ تا ۱۰۰ میلی مولار را نسبت به یون سمی سلنیت از خود نشان دادند. از میان سویه‌های باکتری مقاوم جداسازی شده، تنها سلول‌های رویشی کشت باکتری SR5، جدا شده از آب جمع‌آوری شده از دریای مازنداران، قادر به احیای خارج سلولی یون‌های سلنیت به نانو سلنیوم عنصری در غلظت ۱ میلی مولار از یون سمی سلنیت بود که با استفاده از آنالیزهای طیف سنجی جذبی UV-vis اسپکتروفوتومتری مشخص شد. آنالیز نمونه‌ها با اسپکتروفوتومتری UV-vis، یک پیک جذبی مشخص را در طول موج ۶۱۰ نانومتر (پیک اختصاصی برای نانوذرات سلنیوم

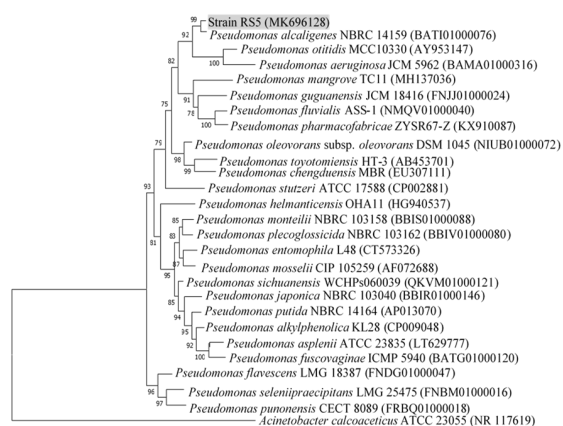


شکل ۲: شکل‌های میکروسکوپی و کلنی سویه‌ی باکتری منتخب در محیط‌های کشت حاوی سلنیت و بدون سلنیت. (الف) کلنی در محیط کشت تریپتیک سوی آگار بدون سلنیت (ب) کلنی در محیط تریپتیک سوی آگار حاوی سلنیت سدیم و (ج) تصویر میکروسکوپ الکترونی سویه باکتری SR5.

شکل ۲: شکل‌های میکروسکوپی و کلنی سویه‌ی باکتری منتخب در محیط‌های کشت حاوی سلنیت و بدون سلنیت. (الف) کلنی در محیط کشت تریپتیک سوی آگار بدون سلنیت (ب) کلنی در محیط تریپتیک سوی آگار حاوی سلنیت سدیم و (ج) تصویر میکروسکوپ الکترونی سویه باکتری SR5.

شکل ۲: شکل‌های میکروسکوپی و کلنی سویه‌ی باکتری منتخب در محیط‌های کشت حاوی سلنیت و بدون سلنیت. (الف) کلنی در محیط کشت تریپتیک سوی آگار بدون سلنیت (ب) کلنی در محیط تریپتیک سوی آگار حاوی سلنیت سدیم و (ج) تصویر میکروسکوپ الکترونی سویه باکتری SR5.

شکل ۲: شکل‌های میکروسکوپی و کلنی سویه‌ی باکتری منتخب در محیط‌های کشت حاوی سلنیت و بدون سلنیت. (الف) کلنی در محیط کشت تریپتیک سوی آگار بدون سلنیت (ب) کلنی در محیط تریپتیک سوی آگار حاوی سلنیت سدیم و (ج) تصویر میکروسکوپ الکترونی سویه باکتری SR5.



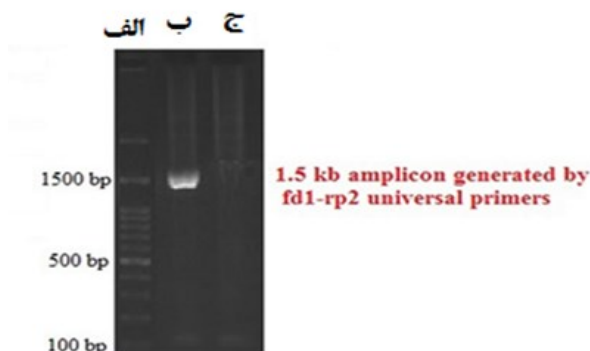
شکل ۴: درخت فیلوژنی سویه‌ی SR5 و دیگر اعضای جنس سودوموناس بر اساس ژن تکثیر یافته‌ی *16S rDNA*. شماره دسترسی سویه‌های ثبت شده در پراوترز آورده شده است.

جدول ۱: ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی سویه‌ی منتخب SR5.

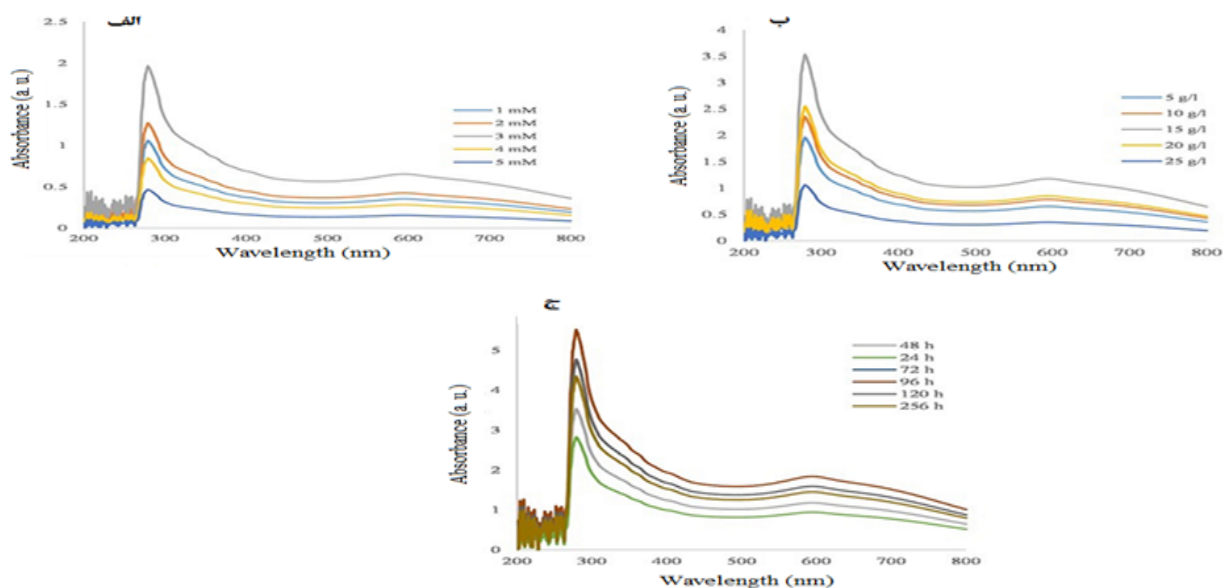
| ویژگی | سویه SR5 | ویژگی | سویه SR5 |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|----------|
| واکنش گرم | مثبت | واکنش گرم | مثبت |
| شکل | رشد در ۴۲ درجه | شکل | مثبت |
| حرکت | اوره آز | حرکت | مثبت |
| کاتالاز | ژلاتیناز | کاتالاز | مثبت |
| اکسیداز | تولید سولفید هیدروژن | اکسیداز | مثبت |
| رشد در شرایط هوازی | هیدرولیز کازئین | رشد در شرایط هوازی | مثبت |
| رنگدانه قهوه ای/پرتقالی | هیدرولیز توین ۲۰ و ۸۰ | رنگدانه قهوه ای/پرتقالی | مثبت |
| احیای نیترات | تولید دزوکسی ریبونوکلئاز | احیای نیترات | مثبت |
| مصرف سیترات | اورنیتین دکربوکسیلاز | مصرف سیترات | مثبت |
| مالتوز | گلوکز | مالتوز | مثبت |
| مانیتول | آرابینوز | مانیتول | مثبت |
| سوکروز | اتانول | سوکروز | مثبت |
| زایلوز | فروکتوز | زایلوز | مثبت |
| | گلیسرول | | مثبت |

استخراج و سپس ژن کد کننده نواحی *16S rDNA* از طریق پرایمرهای یونیورسال fd1 و rp2 مورد واکنش PCR قرار گرفت (شکل ۳). همان‌گونه که در شکل قابل مشاهده می‌باشد محصول PCR مناسب در ناحیه‌ی ۱۵۰۰ bp نمایان شده که بیانگر خلوص DNA مورد استفاده جهت تعیین توالی می‌باشد.

پس از مشخص شدن توالی ژن *16S rDNA* سویه یادشده و بلاست نمودن آن در پایگاه NCBI، باکتری مورد نظر شناسایی شد. براساس نتایج حاصل از بلاست، این سویه دارای درصد تشابه ۹۸/۸۱ (با مقدار پوشش E-value برابر صفر و



شکل ۳: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR سویه‌ی منتخب SR5. (الف) DNA مارکر ۱۰۰ جفت بازی، (ب) سویه SR5 و (ج) کنترل منفی.



شکل ۵: اثر پارامترهای مختلف بر روی سنتز نانوذرات سلنیوم در مخلوط واکنش زیست تبدیلی توسط سویه‌ی باکتری سودوموناس آلکالیژنز سویه SR5 در شرایط سلول در حال استراحت. (الف) اثر غلظت های اولیه یون سلنیت، (ب) اثر غلظت بیومس سلول بعنوان بیوکاتالیست و (ج) اثر دوره گرماگذاری.

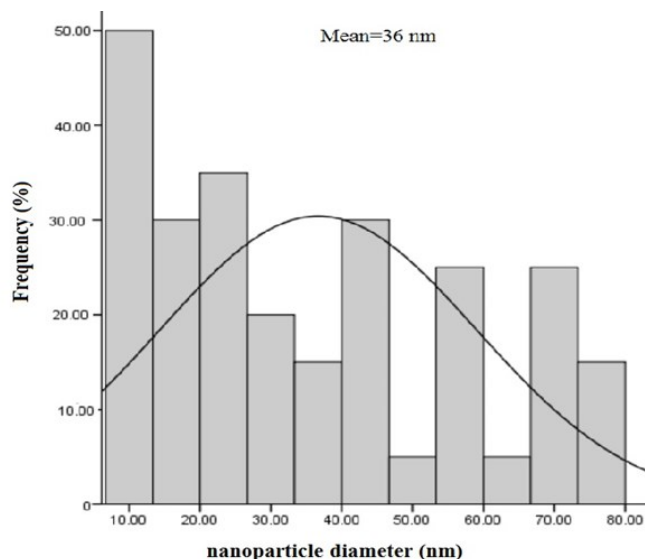
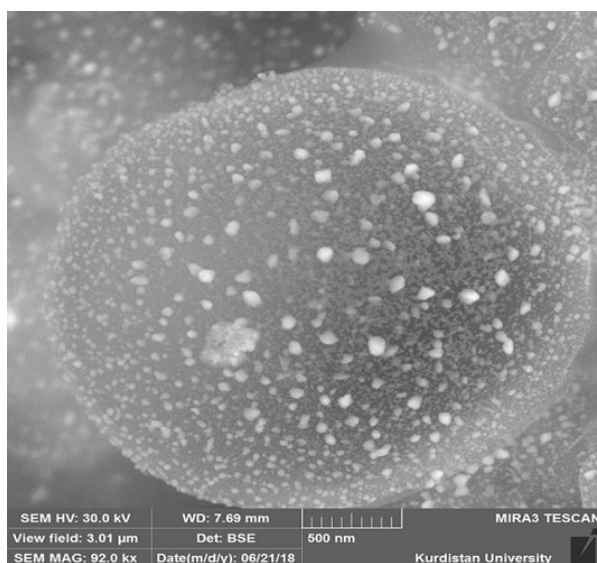
گرم در لیتر بیومس سلول و در شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس، pH برابر ۷ و دور شیکر (۲۰۰ rpm) در مخلوط واکنش زیست تبدیلی مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۵ج). یک افزایش تدریجی در طیف جذبی نانوذرات سلنیوم از ساعت ۲۴ تا ۹۶ وجود دارد که حداکثر جذب در ساعت ۹۶ مشاهده گردید. همانگونه که در شکل ۵ج مشاهده می‌شود بین ساعات ۱۲۰ تا ۲۵۶ طیف جذبی نانوذرات تشکیل شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی در شرایط سلول در حال استراحت باقی مانده است که حکایت از پایداری نانوذرات سنتز شده در این واکنش می‌باشد.

د) بررسی های میکروسکوپی و طیف سنجی نانوذرات سنتز شده توسط سودوموناس آلکالیژنز سویه SR5: نانوذرات سلنیوم سنتز شده به وسیله‌ی راهبرد سلول در حال استراحت تحت شرایط بهینه، پس از استخراج، تخلیص و خشک کردن توسط دستگاه فریز درایر، به منظور آنالیزهای میکروسکوپی و طیف سنجی، استفاده شد. همانگونه که در شکل (۶) مشاهده می‌شود، میکروگراف‌های حاصل، سنتز نانوذرات سلنیوم کروی با متوسط اندازه ۳۶ نانومتر را نشان داد.

در ادامه و با هدف تجزیه و تحلیل ساختاری و مشخص نمودن ترکیب عنصری نمونه نانوذره ی زیستی سنتز شده، از طیف

باکتری سودوموناس آلکالیژنز سویه SR5 در شرایط سلول در حال استراحت: تاثیر پارامترهای مختلف بر روی سنتز نانوذرات سلنیوم توسط سلول‌های در حال استراحت برداشت شده از انتهای فاز رشد لگاریتمی مورد بررسی قرار گرفت. همانگونه که در شکل (۵ الف) نشان داده شده است، حداکثر تولید نانوذرات سلنیوم در غلظت ۳ میلی مولار در شرایط سلول در حال استراحت به دست آمده است. در غلظت‌های بالاتر از ۳ میلی مولار یون سلنیت، احتمالاً به دلیل سمیت یون سلنیت راندمان تولید کاهش پیدا کرده است. با افزایش غلظت توده زیستی باکتری از ۵ تا ۱۵ گرم در لیتر، یک افزایش تدریجی در طیف جذبی مرتبط با تشکیل برون سلولی نانوذرات سلنیوم در مخلوط واکنش زیست تبدیلی، بعد از ۴۸ ساعت گرماگذاری، در شرایط غلظت بهینه ۳ میلی مولار از یون سلنیت و در شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس، pH برابر ۷ و دور شیکر ۲۰۰ rpm مشاهده شد. با این حال، حداکثر تولید نانوذرات سلنیوم مربوط به وزن ۱۵ گرم در لیتر بیومس باکتری است که همان وزن بیومس بهینه است (شکل ۵ ب).

در ادامه و با هدف بهبود واکنش تبدیل زیستی سلنیت سدیم به نانوذرات سلنیوم عنصری، اثرات دوره‌ی گرماگذاری در شرایط بهینه شده (غلظت ۳ میلی مولار یون سلنیت، وزن ۱۵

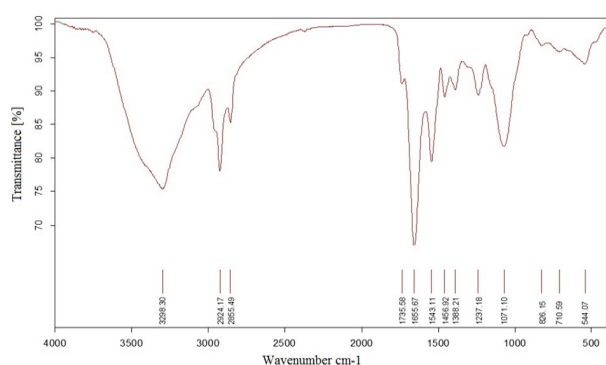


شکل ۶: تصویر SEM و هیستوگرام مربوط به دامنه پراکنش حاصل از نانوسلنیوم سنتز شده توسط سلول در حال استراحت سودوموناس آلکالیژنز سویه SR5.

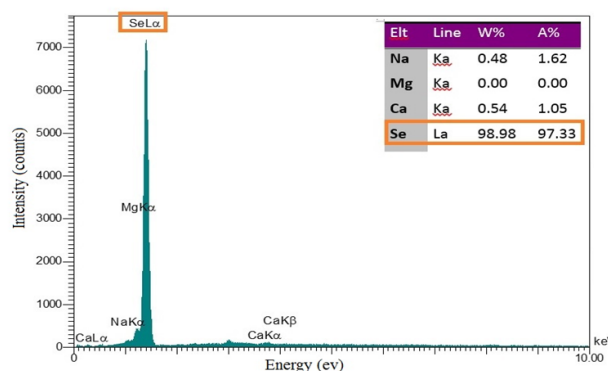
اما از آنجایی که در محدوده $1810-1680 \text{ cm}^{-1}$ که مربوط به گروه $\text{C}=\text{O}$ است، هیچ گونه پیک مشاهده نشد، دخالت عامل کربوکسیلیک اسید منتفی است. در این ناحیه احتمال دارد پهن شدگی پیک مربوط به گروه OH ، باعث پوشیده شدن پیک NH که یک پیک تیز و باریک است، شده باشد. از طرفی چون پیک یادشده پهن می‌باشد، می‌توان گفت که گروه OH پیوند هیدروژنی برقرار نموده است. پیک موجود در محدوده 2900 cm^{-1} می‌تواند مربوط به کشش پیوند $\text{C}-\text{H}$ آلیفاتیک باشد. محدوده $1690-1640 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه $\text{C}=\text{N}$ و محدوده $1600-1475 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به حلقه‌ی بنزن است. همچنین ناحیه $2000-1500 \text{ cm}^{-1}$ به جذب پیوندهای دوگانه‌ی کششی $\text{C}=\text{C}$ ، $\text{C}=\text{O}$ و $\text{C}=\text{N}$ مربوط است. ناحیه پایین‌تر از 1500 cm^{-1} به

سنجی پراش انرژی پرتو ایکس استفاده شد. در شکل (۷) هریک از پیک های نشان داده شده مختص یک اتم و نشانگر یک عنصر می باشند. آنالیز EDX وجود قابل توجهی از سلنیوم عنصری را در ترکیب نانوذرات تشکیل شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی را تایید می کند.

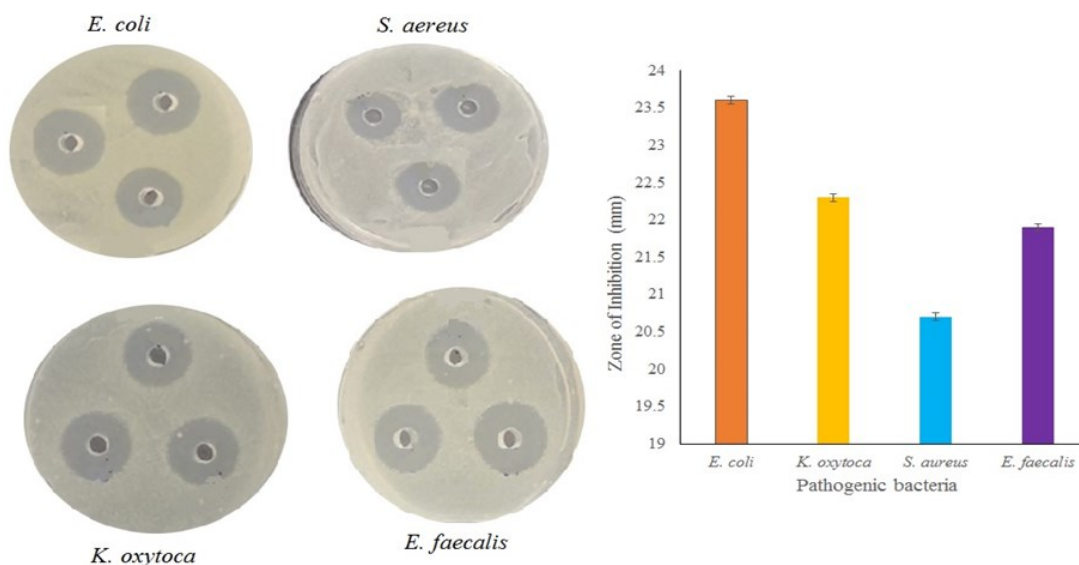
در نهایت و با هدف بررسی وجود احتمالی عوامل پوشاننده (Capping Agents) زیستی در نانوذرات سنتز شده، آنالیز FTIR انجام شد (شکل ۸). همان‌طور که در شکل (۸) نشان داده شده است، با مقایسه‌ی نتایج به دست آمده از آنالیزهای FTIR می‌توان گفت که پیک پهن ظاهر شده در عدد موجی 3200 cm^{-1} تا 3500 cm^{-1} می‌تواند مربوط به گروه $\text{N}-\text{H}$ ، گروه OH حلال آب، OH فنولی و یا کربوکسیلیک اسید باشد.



شکل ۸: طیف FTIR از نانوذرات سلنیوم سنتز شده توسط سلول در حال استراحت سودوموناس آلکالیژنز سویه SR5.



شکل ۷: طیف EDX از نانوذرات سلنیوم سنتز شده توسط سلول در حال استراحت سودوموناس آلکالیژنز سویه SR5.



شکل ۹: نتایج اثر مهاری نانوذرات سلنیوم تشکیل شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی علیه برخی باکتری‌ها بیماری زا.

مکانیسم‌های پیشرفته‌ای با این شرایط مقابله می‌کنند. این مکانیسم‌ها ممکن است شامل تغییر ماهیت شیمیایی یون سمی باشد به طوریکه دیگر سمی نبوده و در نهایت منجر به تشکیل نانوذرات مربوطه گردد. به این ترتیب نانوذرات در واقع محصول جانبی مکانیسم مقاومت در برابر یک یون خاص می‌باشند (۲۲). یکی از مهم‌ترین این نانوذرات، نانوذرات سلنیوم است. این عنصر نیمه رسانا علاوه بر کاربرد در وسایلی چون نمایش‌گرهای عکاسی، سلول‌های خورشیدی و ابزارهایی از این دست، به عنوان یک عنصر کم‌یاب و ضروری در بهبود عملکرد سلنو آنزیم‌ها و گلوکاتیون پراکسیداز، جلوگیری از آسیب رادیکال‌های آزاد به سلول‌ها و بافت‌ها و حفاظت در برابر اکسیداسیون DNA نقش دارد (۸). سنتز نانوذره‌ی سلنیوم به دلیل کاربردهای مهم تجاری و درمانی خود موضوع بسیاری از تحقیقات بوده است. در میان روش‌های مختلف سنتز نانوذره‌ی سلنیوم، تولید از طریق شیمی سبز جایگاه ویژه‌ای در زیست فناوری نانو دارد. وانگ (Wang) و همکاران (۲۰۱۰) سنتز زیستی برون سلولی نانوذره سلنیوم را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش از باکتری *باسیلوس ساتیلیس* استفاده شد. نانوذرات سلنیوم سنتز شده کروی شکل بوده و قطری در محدوده‌ی ۵۰ تا ۴۰۰ نانومتر داشتند (۹).

ناحیه اثر انگشت مشهور است که جذب‌های متعلق به ارتعاش پیوندهای ساده C-O، C-N و C-C در این ناحیه قرار دارند که الگویی منحصر به فرد مانند اثر انگشت برای شناسایی هر مولکول آلی به دست می‌دهند (۲۱). با توجه به داده‌ها می‌توان گفت که گروه‌های فنولی، هیدروکسیلی و آمینی در سنتز نانوذرات سلنیوم نقش داشته‌اند.

بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات زیستی سلنیوم سنتز شده: نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سلنیوم تشکیل شده توسط سلول در حال استراحت *سودوموناس آلکالیژنز* سویه SR5 به روش انتشار از چاهک بر سطح آگار در شکل ۹ آورده شده است. نتایج به دست آمده نشان‌دهنده‌ی اثر مهاری نانوذرات سلنیوم تولیدی می‌باشد. در این روش، بیشترین اثر مهاری نانوذره علیه باکتری *اشریشیاکلی* با میانگین مهار ۲۳/۶ میلی‌متر از خود نشان داد و کمترین میزان مهارکنندگی را با میانگین مهار ۲۰/۷ میلی‌متری بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد.

بحث

ارگانسیم‌ها به منظور زنده ماندن در محیط‌های حاوی سطوح بالای یون‌های فلزی و سایر یون‌های نامطلوب با انجام

استفاده از ایتروکوکوس فکالیس پرداخته و فعالیت ضد باکتریایی آن را بررسی کردند. مشاهدات میکروسکوپ TEM نشان داد که تجمع ذرات به صورت خارج سلولی است. از طرف دیگر توانایی باکتری در تحمل کردن سطوح بالای سلنیت سمی به وسیله‌ی غلظت‌های مختلف سدیم سلنیت (۰/۱۹ تا ۲/۹۷ نانومولار) مورد بررسی قرار گرفت. سرانجام به این نتیجه رسیدند که به طور متوسط غلظت‌های بالای سلنیت سدیم منجر به تولید مقادیر کوچکی نانو ساختار سلنیوم بوسیله‌ی باکتری می‌گردد. علاوه بر این، نانو ذرات سلنیوم می‌توانند به عنوان یک عامل ضد استافیلوکوکی برای جلوگیری و درمان موثر عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس مورد استفاده قرار بگیرند (۱۰). فرناندز (Fernández) و همکاران (۲۰۱۷) تولید نانو ذرات سلنیوم با استفاده از ویبریو ناتریژنس (*Vibrio natriegens*) را مطالعه کرده و از آنجایی که اندازه‌ی نانو ذرات سلنیوم عامل مهمی در تعیین خواص شیمیایی و فعالیت‌های زیستی آن‌ها می‌باشد، این موضوع را بررسی کردند که آیا اندازه‌ی نانو ذرات تولید شده به وسیله این باکتری می‌تواند با تنظیم زمان گرماگذاری باکتری و همچنین میزان استفاده از سلنیت، تغییر کند. این مساله نشان می‌دهد که با افزایش زمان انکوباسیون و غلظت سلنیت، اندازه‌ی نانو ذره‌ی سلنیوم افزایش می‌یابد. قابل توجه است زمانی که از غلظت ۱۰ میلی مولار سلنیت و پس از گرماگذاری ۴۸ ساعت، اندازه‌ی نانو ذرات سلنیوم به حداکثر مقدار خود (۴۰۰ نانومتر) رسید (۶). در بخش نخست از این پژوهش، جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتریایی آبی با پتانسیل سنتز نانو ذرات سلنیوم صورت گرفت. دریا یکی از بهترین زیست‌گاه‌هایی است که میکروارگانیسم‌های آن دارای پتانسیل بالایی در تولید نانو ذرات هستند. این میکروارگانیسم‌ها در چنین محیط‌هایی با تنش‌های زیادی همچون غلظت بالای نمک‌ها، فشار زیاد و غیره مواجه هستند، به طوری که دارای مکانیسم‌های منحصر به فردی برای مقابله با این شرایط گشته‌اند. با وجود تمام این قابلیت‌ها، میکروب‌های دریایی به میزان کافی از نظر تولید نانو ذرات مورد بررسی قرار نگرفته‌اند و تحقیقات در این زمینه هنوز در مراحل

زانگ (Zhang) و همکاران (۲۰۱۱) یک روش زیستی ساده، تمیز و دوستدار محیط زیست را برای سنتز این نانو ذره با استفاده از سودوموناس آکالیپزین (*P. alcaliphila*) در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و در فشار محیط طراحی کردند. در این فرآیند، پروتئین‌های ترشح شده بوسیله‌ی باکتری ممکن است نقشی مهم را ایفا کنند. تغییر نانو ذرات سلنیوم از نانو سفر به نانو ذرات بعد از ۲۴ ساعت روی داده اما حضور پلی وینیل پیرولیدون می‌تواند در این تغییر اختلال ایجاد کند. شرایط مختلف آزمایش به ما این امکان را می‌دهد که بتوانیم نانو ذرات سلنیوم فراوان با ابعاد و پراکندگی مشخصی به دست آوریم (۸). تورس (Torres) و همکاران (۲۰۱۲) سنتز زیستی نانو ذره‌ی سلنیوم بوسیله‌ی پانتوآ آگلومرانس (*Pantoea agglomerans*) را مورد آزمایش قرار داده و فعالیت آنتی اکسیدانی آن را مطالعه کردند. نتایج نشان داد که اندازه نانو ذرات با تغییر زمان گرماگذاری تغییر می‌کند. در این آزمون پس از گذشت ۲۰ و ۲۴ ساعت گرماگذاری این نانو ذرات از سلول‌های باکتری آزاد شدند. مشاهدات صورت گرفته با میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) حضور درون سلولی نانو ذرات در طول مراحل اولیه‌ی گرماگذاری را نشان داد. همچنین نشان داده شد که فعالیت آنتی اکسیدانی نانو ذرات سلنیوم پایدار شده در مقایسه با سلنیت و نانو ذرات سلنیوم بدون پایدارسازی، بسیار بیشتر است (۳). سری و استا (Srivastava) و موخوپادای (Mukhopadhyay) (۲۰۱۳) سنتز زیستی نانو ذره‌ی سلنیوم و ویژگی‌های ساختاری آن را در زوگله آ رامیگرا (*Zooglae ramigera*) بررسی کردند. باکتری‌ها به عنوان یک کارخانه‌ی کوچک برای بیوسنتز نانو ذرات سلنیوم عمل می‌کنند. این نانو ذرات کروی بوده و اندازه‌ای بین ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر با اندازه‌ی متوسط ۸۴/۹۹ نانومتر دارند. نانو ذرات سلنیوم بیوسنتز شده، برای مدت بیش از شش ماه (با کم‌ترین انباشتگی) پایدار هستند. اعتقاد بر این است که پروتئین‌های باکتریایی باعث پایداری طولانی مدت نانو ذرات سلنیوم بیوزن می‌شوند (۲۳). شعیبی (Shoeibi) و مشرقی (Mashreghi) (۲۰۱۷) به بیوسنتز نانو ذرات سلنیوم با

توجه این است که تمامی فاکتورهای بهینه شده دارای یک حد آستانه بوده و بالاتر از این حدود موجب کاهش میزان تولید می‌گردد. در دهه‌های گذشته به دلیل سوء مصرف آنتی بیوتیک‌ها، باکتری‌های مقاوم دارویی چندگانه در سراسر جهان ظهور کرده‌اند. اخیراً به منظور رفع این مشکل داروهای غیر آنتی بیوتیکی زیادی مانند پلیمرهای کاتیونی، پپتیدهای ضد میکروبی، عوامل نورگرمایی-نور دینامیکی توسعه یافته‌اند. با وجود اینکه این داروهای غیر آنتی بیوتیکی فعالیت‌های ضد باکتریایی امیدوار کننده‌ای را نشان داده‌اند اما هنوز با کاستی‌هایی همراه هستند. این در حالی است که نانو ذرات سلنیوم به دلیل دارا بودن خواص ضد باکتریایی به عنوان درمان موثر و ایمن در مواجهه با بیماری‌های عفونی پیشنهاد می‌شوند (۲۶). بنابراین، در بخش پایانی این پژوهش، اثربخشی نانو ذرات زیستی سلنیوم سنتز شده علیه برخی از پاتوژن‌های انسانی مورد آزمون قرار گرفت. نتایج حاکی از این موضوع بود که نانو ذرات تولیدی علیه همه‌ی میکروب‌های استفاده شده اثر مهارکنندگی رشد را دارند.

نتیجه گیری

در این پژوهش از باکتری‌های آبی به منظور تولید نانو ذرات سلنیوم بهره گرفته شد. باکتری‌های آبی به دلیل رشد در محیط‌های پرتنش دارای مکانیسم‌های ویژه‌ای هستند که آن‌ها را برای مقابله با شرایط پرتنش همچون غلظت بالای یون‌های سلنیت مقاوم کرده است. در نهایت این مکانیسم‌های مقابله با یون‌های سمی سلنیت منجر به تولید نانو ذرات سلنیوم توسط این باکتری‌ها می‌گردد.

از دستاوردهای این تحقیق می‌توان به مواردی از جمله معرفی باکتری‌های آبی به عنوان یک منبع زیستی بالقوه برای تولید نانو ذرات سلنیوم، معرفی سودوموناس آکالیپزینز سویه SR5 به عنوان منبع زیستی تولید کننده‌ی نانو ذرات سلنیوم برای نخستین بار و همچنین بهینه سازی برخی فاکتورهای موثر در تولید زیستی نانو ذرات سلنیوم به منظور دست یابی به نانو ذرات کوچک‌تر و همگن‌تر و همچنین افزایش راندمان تولید اشاره نمود.

ابتدائی خود است. بنابراین بررسی میکروب‌های دریائی به عنوان ابزارهایی در مسیر تولید نانو ذرات، رویکردی منطقی و مفید است که محدودیت‌های ناشی از روش‌های متعارف تولید نانو ذرات را به خصوص در حوزه‌ی دارو و بهداشت مرتفع می‌سازد (۲۴). به عبارت دیگر، اکوسیستم‌های آبی می‌توانند منبع خوبی از میکروارگانیسم‌های مقاوم به فلزات باشند چراکه فلزات به طور مداوم توسط آتشفشان‌ها، فرسایش صخره‌ها و بسیاری از فعالیت‌های انسانی مانند آلودگی‌های صنعتی، معدن، احتراق سوخت، فاضلاب شهری و فعالیت‌های کشاورزی به این اکوسیستم‌ها وارد می‌شوند (۲۵). همه‌ی این موارد در کنار هم میکروارگانیسم‌های آبی را به منابع خوبی جهت تولید نانو ذرات تبدیل کرده است. در این راستا، ۱۶ سویه‌ی باکتریایی آبی با قابلیت تحمل پذیری بالا نسبت به یون سمی سلنیت از محیط‌های آبی مناطق مختلف ایران بر اساس تکنیک غنی سازی جدا شدند. مقاومت ذاتی این سویه‌ها به وسیله‌ی روش رقت در آگار تعیین گردید. این سویه‌ها تحمل پذیری بین ۱۰ تا ۱۰۰ میلی مولار را نسبت به یون سمی سلنیت از خود نشان دادند. در این بین سویه‌ی باکتریایی SR5 که بالاترین تحمل پذیری و مقاومت را نسبت به یون سمی سلنیت از خود نشان داد (بالاتر از ۱۰۰ میلی مولار)، جهت بررسی‌های بعدی با هدف قابلیت احیای یون سلنیت به نانو ذرات سلنیوم مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که این سویه قادر به سنتز برون سلولی نانو ذرات سلنیوم بود. در نهایت سویه‌ی برتر SR5 مورد شناسایی ریخت شناسی و مولکولی قرار گرفت. نتایج آنالیزهای مورفولوژیک و فیلوژنیکی نشان داد که سویه‌ی یاد شده دارای مشابهت ۹۸/۸ درصدی با سویه‌های متعلق به گونه‌ی سودوموناس آکالیپزینز می‌باشد. در ادامه‌ی این پژوهش سنتز نانو ذرات سلنیوم در شرایط بهینه‌ی واکنش زیست تبدیلی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانو ذرات سلنیوم در سوپرناتانت با میانگین اندازه‌ی ۳۶ نانومتر در غلظت سلنیت بهینه‌ی برابر ۳ میلی مولار، غلظت بیومس بهینه‌ی ۱۵ گرم در لیتر و پس از ۹۶ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و دور شیکر ۲۰۰ rpm تولید می‌شوند. نکته قابل

ملاحظات اخلاقی

حمایت دانشگاه کردستان به انجام رسیده است. نویسندگان این مقاله از تمام کسانی که در اجرای این مطالعه همکاری نموده‌اند، کمال قدردانی و سپاسگزاری را دارد.

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تعارض در منافع

این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد بوده که با وجود ندارد

تشکر و قدردانی

References

1. Mane RS, Naushad M, Shirsat S, Kadam AS. Selenium nanostructures: microbial synthesis and applications. RSC Adv. 2015; 112: 1-9.
2. Jain R, Gonzalez-Gil G, Singh V, van Hullebusch ED, Farges F, Lens PNL. Biogenic selenium nanoparticles: production, characterization and challenges. In: Kumar A, Govil NJ (eds) Nanobiotechnology. Studium Press LLC, USA. 2014; pp. 361-390.
3. Torres K, Campos V, Leon C, Rojas S, Guez-Llamazares S, Gonzalez M, Smith C, MA M. Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Pantoea agglomerans* and their antioxidant activity. J Nanoparticle Res. 2012; 14: 1236.
4. Shoeibi S, Mozdziak P, Golkar-Narenji A. Biogenesis of selenium nanoparticles using green chemistry. Top Curr Chem. 2017; 375: 88.
5. Zonaro E, Lampis S, Turner RJ, Qazi SJS, Vallini G. Biogenic selenium and tellurium nanoparticles synthesized by environmental microbial isolates efficaciously inhibit bacterial planktonic cultures and biofilms. Front Microbiol. 2015; 6.
6. Fernández-Llamas H, Castro L, Blázquez ML, Díaz E, Carmona M. Speeding up bioproduction of selenium nanoparticles by using *Vibrio natriegens* as microbial factory. Sci Rep. 2017; 7: 16046.
7. Wadhvani SA, Shedbalkar UU, Singh R, Chopade BA. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future projects. Appl Microbiol Biotechnol. 2016; 100: 2555-2566.
8. Zhang W, Chen Z, Liu H, Zhang L, Gao P, Li D. Biosynthesis and structural characteristics of selenium nanoparticles by *Pseudomonas alcaliphila*. Colloids Surf B: Biointerf. 2011; 88: 196-201.
9. Wang T, Yang L, Zhang B, Liu J. Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in H₂O₂ biosensor. Colloids Surf. B: Biointerf. 2020; 2010(80): 94-102.
10. Shoeibi S, Mashreghi M. Biosynthesis of selenium nanoparticles using *Enterococcus faecalis* and evaluation of their antibacterial activities. J Trace Elem Med Biol. 2017; 39: 135-139.
11. Fernández-Llamas H, Castro L, Blázquez ML, Díaz E, Carmona M. Speeding up bioproduction of selenium nanoparticles by using *Vibrio natriegens* as microbial factory. Sci

- Rep. 2017; 7: 16046.
12. Ashengroph M, Sahami-Soltani M. Antimicrobial effects of extracellular copper sulfide nanoparticles synthesized from *Bacillus licheniformis*. J Microbial World. 2019; 11(3): 243-257 [In Persian].
 13. Washington JA, Sutter VL. 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.
 14. Ashengroph M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Momenbeik F. Novel strain of *Bacillus licheniformis* SHL1 with potential converting ferulic acid into vanillic acid. Ann Microbiol. 2012; 62(2): 553-558.
 15. Cowan ST, Steel KJ. Manual for the identification of medical bacteria, 3rd ed. London: Cambridge University Press. 1993.
 16. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol. 1991; 173: 697-703.
 17. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013; 30: 2725-2729
 18. Ashengroph M, Nahvi I, Zarkesh- Esfahani H, Momenbeik F. Conversion of isoeugenol to vanillin by *Psychrobacter* sp. strain CSW4. Appl Biochem Biotechnol. 2012; 166: 1-12.
 19. Dhanjal S, Cameotra S. Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmin soil. Microb Cell Factories. 2010; 9(52): 1-11.
 20. Ruangpan L, Tendencia EA. Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment. SEAFDEC, Tigbauan, Iloilo; 2004.
 21. Guthrie RD. Introduction to spectroscopy (Pavia, Donald; Lampman, Gary M, Kriz George S., Jr.) J Chem Educ. 1979; 56: A323.
 22. Thakkar KN, Mhatre SS, Rasesh Y, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomedicine NBM. 2010; 6: 257-262.
 23. Srivastava N, Mukhopadhyay M. Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles mediated by *Zooglea ramigera*. Powder Technol. 2013; 244: 26-29.
 24. Baker S, Harini BP, Rakshith D, Satish S. Marine microbes: invisible nanofactories. J Pharm Res. 2013; 6: 383-388.
 25. Manivasagan P, Nam SY, Oh J. Marine microorganisms as potential biofactories for synthesis of metallic nanoparticles. Crit Rev Microbiol. 2016; 42(6): 1007-1019.
 26. Cremonini E, Zonaro E, Donini M, Lampis S, Boaretti M, Dusi S, Melotti P, Lio MM, Vallini G. Biogenic selenium nanoparticles: characterization, antimicrobial activity and effects on human dendritic cells and fibroblasts. Microb Biotechnol. 2016; 9(6): 758-771.



Synthesis analysis and antibacterial activity of selenium nanoparticles produced by *Pseudomonas alcaligenes*

Morahem Ashengroph¹, Seyedeh Roya Hosseini²

¹Associate Professor, University of Kurdistan, Faculty of Sciences, Department of Biological Sciences, Sanandaj, Iran.

²M.Sc., University of Kurdistan, Faculty of Sciences, Department of Biological Sciences, Sanandaj, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Selenium nanoparticles have a wide range application in industry, biomedical and environmental fields due to their unique physical, chemical and photoelectrical properties. This study was aimed to use aquatic bacteria in bioreduction of selenite oxyanion into elemental nano-selenium.

Materials & Methods: Synthesized selenium nanoparticles were characterized by spectroscopic analysis and electromicrographs prepared by scanning electron microscopy (SEM). The efficacy of the antimicrobial activity of the synthesized selenium nanoparticles against some Gram-positive and Gram-negative human pathogenic bacteria was also investigated by the agar well diffusion test.

Results: Sixteen selenite-resistant bacterial strains were isolated based on selective enrichment techniques in Tryptic Soy Agar (TSA) medium containing 5 mM selenite ion. Our results showed that *Pseudomonas alcaligenes* SR5 coastal seawater isolate can reduce selenite oxyanion into selenium nanoparticles. Furthermore, the results showed that extracellular selenium nanoparticles with an average size of 36 nm were formed in an optimum selenite concentration of 3 mM and an optimum initial biomass concentration of 15 g/l, following 96 h incubation at 25° C at (200 rpm under resting cell condition.

Conclusion: The current study is the first report on extracellular synthesis of selenium nanoparticles using *P. alcaligenes*. The produced bio-nanoparticles showed a growth inhibitory effect against four tested pathogenic bacterial strains.

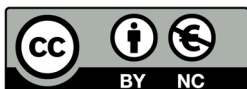
Keywords: Nanoselenium, *P. alcaligenes*, Resistance pattern, Optimization, Antibacterial activity.

Correspondence to: Morahem Ashengorph

Tel: +98 8733664600

E-mail: m.ashengorph@uok.ac.ir

Journal of Microbial World 2019, 12(3): 252-266.



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.