مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره سوم (پیاپی ۳۶) پاییز ۱۳۹۷
صفحات ۲۵۷-۲۴۳

Original Article

اثرات ضد میکروبی نانوذرات سولفید مس خارج سلولی سنتز شده از *باسیلوس لیکنی فورمیس*

مراحم آشنگرف*[۱]، مریم سهامی سلطانی[۲]

[۱]دانشیار، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی، سنندج، [۲]کارشناس ارشد، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی، سنندج.

چکیده

سابقه و هدف: نانوذرات مس به خاطر ویژگی‌های منحصر به‌فرد کاتالیزگری، هدایت الکتریکی و نوری ویژه از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. هدف از مطالعه حاضر، استفاده از پتانسیل سویه‌های باکتریایی آب‌زی به‌عنوان کاتالیزگر برای احیای سولفات مس به نانوذرات سولفید مس و بررسی خواص ضد میکروبی آن می باشد.

مواد و روش ها: نانوذرات سولفید مس تولید شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی، به وسیله آنالیزهای طیف سنجی، الکترومیکروگراف‌های تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره و بررسی دامنه پراکنش نانوذرات تعیین ویژگی شد. همچنین در این پژوهش، کارایی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سولفید مس تشکیل شده از طریق روش انتشار از دیسک بر آگار بررسی گردید.

یافته ها: ۱۰۵ سویه باکتری تحمل‌پذیر نسبت به یون سمی مس بر اساس تکنیک غنی‌سازی جداسازی شدند. بر اساس نتایج به‌دست آمده، تنها روماند کشت سویه Cu25 قادر به احیای خارج سلولی یون‌های مس به نانوسولفید مس بود. سویه باکتری Cu25 بر اساس آزمون های فنوتیپی و مولکولی به عنوان *باسیلوس لیکنی فورمیس* مورد شناسایی قرار گرفت. در ادامه، سنتز خارج سلولی نانوذرات سولفید مس تولید شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، روماند سویه یاد شده پس از مواجهه با محلول سولفات مس (غلظت ۷/۵ میلی‌مولار)، می‌تواند به صورت خارج سلولی نانوذرات سولفید مس کروی با میانگین اندازه ۲۱/۵ نانومتر را پس از ۲٤ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس تولید کند.

نتیجه گیری: مطالعه اخیر نخستین گزارش سنتز خارج سلولی نانوذرات سولفید مس توسط باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس* است. همچنین نانوذرات زیستی سنتز شده علیه برخی سویه های باکتریایی و قارچی بیمارگر مطالعه شده اثر مهارکنندگی رشد را دارد.

واژگان کلیدی: *باسیلوس لیکنی فورمیس*، نانوسولفید مس، اثر مهارکنندگی، سنتز خارج سلولی.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۷ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۷

مقدمه

با توجه به پیشرفت روزافزون علوم و فناوری نانو به عنوان یک رویکرد جدید علوم پایه و مهندسی که بر اساس تغییر در آرایش اتم‌ها و مولکول‌ها بنا شده است، تولید کارآمد مواد و دستگاه ها و سیستم های با کنترل ماده در مقیاس نانو و بهره برداری از ویژگی‌ها و پدیده های نوظهوری است که در مقیاس نانو توسعه یافته‌اند. به دلیل خواص منحصر به‌فرد الکتریکی، مغناطیسی و نوری نانوذرات فلزی، از این نانوذرات به عنوان یکی از پرکاربردترین نانوذرات در ساخت کاتالیست‌های قدرتمند، اپتیک، مکانیک، مغناطیس و انرژی، پزشکی و بهداشتی استفاده می‌شود (۱).

به دلیل افزایش تقاضا برای نانوذرات فلزی و غیرفلزی در دو دهه گذشته، طیف گسترده ای از تکنیک های فیزیکی و

*) آدرس برای مکاتبه: کردستان، سنندج، دانشگاه کردستان، گروه علوم زیستی.
تلفن: ۰۸۷۳۳۶٦٤٦۰۰ پست الکترونیک: m.ashengroph@uok.ac.ir

شیمیایی شامل روش احیا (۲)، روش میکروامولسیون/کلوییدال (۳)، روش فتوشیمیایی (٤)، روش کاهش الکتروشیمیایی (٥)، تجزیه حرارتی (٦)، رسوب‌دهی لیزری پالسی (۷)، روش آسیاب کردن (۸) و همچنین روش تخلیه پالسی سیم (۹) برای تولید نانوذرات فلزی از جمله نانوذرات مس با اندازه، اشکال و ترکیب های مختلف توسعه یافته است. تولید فیزیکی و شیمیایی نانوذرات یادشده علاوه بر تحمیل هزینه های بالا، آلودگی ناشی از مواد شیمیایی به‌کار گرفته شده و تولید فرآورده‌های جانبی خطرناک را به دنبال دارد و همین امر کاربرد نانوذرات را در صنایع مختلف با مشکل مواجه می‌سازد. باز این رومحققین با الهام از سامانه های زیستی به توسعه فرآیندهای سنتزی و دوستدار محیط زیست برای تولید نانوذرات فلزی با استفاده از میکروارگانیسم های مختلف روی آورده‌اند (۱۰ و ۱۱).

میکروارگانیسم های مختلف شامل باکتری‌ها، مخمرها و کپک ها برای سوخت‌وساز و انجام فرآیندهای حیاتی خود از منابع آلی و معدنی موجود در محیط تغذیه می‌کنند. این ارگانیسم‌ها طی فرآیندهای متفاوت، هنگامی‌که در معرض یون‌های فلزی قرار می‌گیرند، آن‌ها را در درون یا بر روی دیواره سلولی خود انباشته می‌کنند. این انباشتگی اغلب منجر به تولید ذراتی می‌شود که در اندازه های نانوذرات بسته‌بندی می‌شوند (۱۲ و ۱۳). توسعه روش های مختلف تولید نانوذرات از نظر دست‌یابی به ذراتی با ترکیب و اندازه دانه معین و توزیع مناسب، مصرف انرژی پایین و سهولت کار در حال بررسی و مطالعه است. محققان برای ساخت نانوذرات موفق به جداسازی موجودات زنده تک‌سلولی و پرسلولی شده‌اند که قادرند به‌صورت داخل یا خارج سلولی این نانوذرات را تولید نمایند (۱۱ و ۱۳). جذابیت استفاده از میکروارگانیسم‌ها در تولید نانوذرات فلزی به دلیل سازگاری بالا با محیط زیست، توزیع مناسب و یکنواخت ذرات تولید شده، پایداری بالا، انعطاف‌پذیری بیشتر، انتشار نور بهتر و آسانی تولید می باشد (۱). در دو دهه اخیر غربالگری‌های میکروبی زیادی برای تولید زیستی نانوذرات به دلیل خواص ویژه نوری، شیمیایی، الکتریکی و فوتوالکتریکی آن‌ها صورت گرفته است که مؤید استفاده‌های گوناگون این مواد در زمینه‌هایی چون کاتالیست‌ها، اپتیک، دانش داروهای زیستی، مکانیک، مغناطیس و انرژی است. تولید زیستی نانوذرات مس یکی از دستاورد علمی از علم نانو است که در عرصه‌های مختلف علوم پزشکی و صنایع مختلف ازجمله غذایی، آرایشی، بهداشتی، دام‌پروری و کشاورزی کاربردهای فراوانی دارند (١٤).

اساساً برای اینکه فرایندهای میکروبی قابلیت صنعتی شدن پیدا کنند باید کم‌هزینه، دارای عملیات پیوسته و سرعت تولید بالا باشند که در این راستا غربالگری سویه‌های میکروبی جدید برای نیل به این هدف بسیار حائز اهمیت است. فناوری نانو با تولید مواد و ساختارهای دارای ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و زیستی اهمیت منحصر به فردی دارد. دسترسی به نانوذرات فواید فراوانی در علوم پزشکی، دارویی، بهداشتی، دامپزشکی، صنایع غذایی و نساجی دارد. نانوذرات فلزی به دلیل برخورداری از پتانسیل کاربردی بالا توجه زیادی را به خود جلب نموده و درهای جدیدی را در زندگی نوین علوم و بهداشت باز کرده است. در بین نانوساختارهایی با فعالیت ضد میکروبی، نانوذرات مس به دلیل دارا بودن خواص کاتالیستی و ضد میکروبی نقش پررنگی را ایفا می‌کند (۱۵). مقاومت دارویی و ظهور میکروب‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یک مشکل بهداشتی مهم تهدید کننده سلامت عمومی است. با توجه به خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی نانوذرات مس، با استفاده از آن ها می‌توان سطوح ضد میکروبی ایجاد نمود و به‌عنوان پوششی برای تمام سطوح مثلاً در بیمارستان‌ها، مکان‌های عمومی و حتی منازل استفاده نمود. نانوذرات مس همچنین به دلیل ویژگی های خاص و کاربردهای آن در زمینه‌هایی چون کاتالیست‌ها، نگه‌دارنده چوب، حسگر گاز، روان کننده، مواد الکترونیکی، نانو سیال، انتقال حرارتی، پوشش نانوکامپوزیتی، استفاده در دستگاه‌های نوری، استفاده در صنعت رنگرزی پارچه های کتان از جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند (١٦). با توجه به مشکلات عمده تولید نانوذرات مس در روش فیزیکوشیمیایی، مانند احیای شیمیایی، احیای فتوشیمیایی و

استفاده از لیزر، استفاده از میکروارگانیسم‌های مختلف به عنوان نانوکارخانه‌های بالقوه سبز برای تولید نانوذرات همسو و سازگار با محیط زیست، توزیع یکنواخت اندازه ذرات، پایدار و همچنین مقرون به‌صرفه بودن از نظر اقتصادی پیشنهاد شده است (۱۷).

هدف از این مطالعه بررسی پتانسیل سویه‌های بومی باکتریایی آب‌زی به‌عنوان زیست کاتالیزگر در احیای زیستی سولفات مس به نانوذرات سولفید مس و همچنین بررسی اثرات ضدمیکروبی نانوذرات سبز سنتز شده بود.

مواد و روش ها

الف) غنی سازی باکتری‌های آب زی بومی مقاوم به یون مس: نمونه‌گیری از عمق ۱۵ سانتی‌متری از آب‌های مناطق مختلف ایران شامل دریای خزر، خلیج‌فارس، سواحل بوشهر، سواحل جزایر قشم، کیش و لاوان و همچنین از آب چشمه‌های مختلف استان کردستان انجام شد. نمونه های آب در ظروف دردار استریل جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ٤ درجه سلیسیوس تا هنگام استفاده نگهداری شدند. نمونه‌های آب در ظروف در پوش دار استریل جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ٤ درجه سلیسیوس تا هنگام استفاده نگهداری شدند. ۲۰ میلی‌لیتر از نمونه‌های آب جمع‌آوری شده به لوله‌های فالکون ٤٥ میلی‌لیتری استریل منتقل شد و در دور ٤٥٠٠ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس روماند را جدا کرده و مقدار یک میلی‌لیتر از رسوب به محیط انتخابی تریپتیک سوی آگار منتقل شد. به محیط های کشت یاد شده یون مس در غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار، پس از استریل شدن توسط فیلترهای سرسرنگی ۰/۲۵ میکرونی، افزوده شد. پلیت‌ها به مدت ٤٨ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند. کلنی های باکتریایی با استفاده از ویژگی‌های ظاهری مشخص شدند. به منظور خالص‌سازی سویه‌های باکتری غنی شده، هر کلنی باکتری به محیط‌های کشت تریپتیک سوی آگار حاوی ۱ میلی‌مولار مس منتقل و به روش خطی کشت داده شد. تجدید کشت تا حصول اطمینان از خالص بودن جدایه‌های باکتری انجام شد. باکتری های خالص سازی شده جهت نگهداری کوتاه مدت در سطح شیبدار محیط تریپتیک سوی آگار کشت داده شدند.

ب) تعیین الگوی مقاومت سویه‌های باکتری جدا شده نسبت به یون سمی مس: الگوی مقاومت سویه‌های باکتری جدا شده نسبت به یون سمی مس با روش رقت در آگار (Agar dilution method) تعیین شد (۱۸). برای این منظور به ارلن‌های ۱۲۵ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از تریپتیک سوی آگار ذوب شده، غلظت‌های خاصی از یون مس (۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵، ۱۵، ۱۷/۵ و ۲۰ میلی‌مولار) اضافه شده و سپس داخل پلیت‌های شیشه‌ای به قطر ۸ سانتی‌متر ریخته شد. پلیت‌های آگاردار در دمای ٤٠ درجه سلیسیوس به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند تا سطح مرطوب آن‌ها خشک شود. سپس ۱۰ میکرولیتر از محیط مایع که کدورتی معادل استاندارد کدورت سنجی ۰/۵ مک فارلند داشته در سطح محیط کشت جامد در پتری دیش تلقیح و کشت خطی داده شد. پلیت‌ها پس از ۷ روز گرماگذاری در ۲۵ درجه سلیسیوس مورد مطالعه قرار گرفتند.

ج) بررسی توانایی تولید خارج سلولی نانوذرات سولفید مس توسط سویه‌های باکتری مقاوم به مس: یک لوپ از کشت تازه (٢٤ ساعته) بر روی محیط تریپتیک سوی آگار را به محیط تریپتیک سوی براث تلقیح کرده و به مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۲۵ درجه سلیسیوس گرماگذاری گردید. از این محیط به منظور تلقیح در محیط های کشت استفاده گردید. ۱ درصد از سوسپانسیون‌های باکتری تهیه شده را در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع تریپتیک سوی براث در دمای۲۵ درجه سلیسیوس بر روی شیکر مدور (۱۵۰ دور در دقیقه)، به مدت ٢٤ ساعت گرماگذاری شد. برای جدا کردن توده باکتری از محیط کشت مایع تریپتیک سوی براث، از سانتریفیوژ یخچال دار با دور ۵۰۰۰ rpm در دمای ٤ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. پس از سه بار شستشو با آب فاقد یون استریل، ۱۰ گرم از توده زیستی یاد شده در ارلن‌های ۲۵۰

میلی‌لیتری که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب دمین استریل ریخته شد و به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس و دور شیکر ۱۵۰ rpm قرار داده شد. پس از طی دوره گرماگذاری توده ی باکتری با استفاده از سانتریفیوژ جدا شده و از روماندهای عاری از توده ی باکتری جمع‌آوری شده به‌عنوان زیست کاتالیزگر برای احیای زیستی سولفات مس به نانوذرات مس استفاده شد. برای این منظور به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از روماند برداشت شده باکتری، محلول سولفات مس (با غلظت نهایی ۵ میلی‌مولار یون مس) اضافه شده و به مدت ۲٤ ساعت در شرایط دمایی ۲۵ درجه سلیسیوس و دور شیکر ۱۵۰ rpm گرماگذاری شد. هم‌زمان از محلول سولفات (بدون تلقیح روماند کشت باکتری) و روماند کشت (بدون حضور یون مس) به‌عنوان محیط‌های کنترل منفی استفاده شد (۱۹). ویژگی نانوذرات مس تشکیل شده در محلول واکنش زیست تبدیلی، با UV-visible spectrophotometer آنالیز شد.

د) *شناسایی فنوتیپی و مولکولی سویه باکتری Cu25*: سویه باکتری Cu25 که براساس آنالیزهای UV-visible spectrophotometer دارای قابلیت سنتز خارج سلولی سولفات مس به نانوذره ی سولفید مس بود انتخاب و مورد شناسایی فنوتیپی و مولکولی قرار داده شد. شناسایی اولیه سویه Cu25 با استفاده از ویژگی‌های ظاهری کلنی رشد یافته بر روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار مانند رنگ، فرم کلنی، اندازه، برجستگی و اتصال به سطح آگار، رنگ آمیزی گرم و آزمون های اکسیداز، کاتالاز، توانایی تولید اسپور، اوره آز، هیدرولیز ژلاتین، احیای نیترات، مصرف سیترات، بررسی حرکت و تولید H_2S انجام شد (۲۲-۲۰). استخراج DNA ژنومی سویه Cu25 با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت متابیون (Mi-bacterial Genomic DNA Isolation Kit mi-BD 100) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. تکثیر قطعه ژنومی *16S rRNA* سویه باکتری Cu25 با استفاده از پرایمرهای عمومی fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و rp2 (5'- ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') انجام شد (۲۳).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش، متشکل از ۱۲/۵ میکرولیتر ماسترمیکس (بافر PCR، $MgCl_2$، dNTPs، آنزیم Taq-polymerase)، ۱ میکرولیتر پرایمرهای بالادست و پایین‌دست (غلظت تقریبی ۱۰ میکرومولار)، ۱ میکرولیتر DNA الگو (غلظت تقریبی ۸۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و ۹/۵ میکرولیتر آب PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل C1000 کمپانی Bio-Rad کشور آلمان) انجام گرفت. برنامه تکثیری با واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه سپس ۳۰ سیکل به‌صورت واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۰ درجه سلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۲ دقیقه انجام شد. گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. محصول PCR با استفاده از ژل الکتروفورز ۱ درصد، ولتاژ ۸۰ و در شرایط بافری TBE بررسی شد. با مشاهده تک باندهای مشخص و قرار گرفته در ناحیه ۱۵۰۰ جفت بازی، محصول PCR به منظور تعیین توالی به شرکت زیست فناوران ارسال شد. نتایج مربوط به تعیین توالی‌های رفت و برگشت پس از ویرایش توسط نرم‌افزار BioEdit به‌صورت یک توالی کامل تهیه شد. سپس توالی‌های به‌دست آمده توسط نرم‌افزار BLAST موجود در بانک ژنی NCBI با باکتری‌های موجود مقایسه شد و نزدیک‌ترین سویه‌های باکتری بر اساس توالی *16S rRNA* تعیین شد. توالی ژنومی حاصل از تعیین توالی با استفاده از برنامه Sequin در بانک ژنی ثبت شدند. تجزیه و تحلیل فیلوژنیک و ترسیم درخت به کمک نرم افزار MEGA. 6 و بر پایه روش Neighbor-joining و با Bootstrap ۱۰۰۰ تکرار انجام شد (۲٤).

ه) *تولید خارج سلولی نانوذرات سولفید مس*: یک لوپ کامل از سویه باکتری Cu25، برداشت شده از یک کشت ۲٤ ساعته محیط تریپتیک سوی براث، به یک محلول نمکی استریل حاوی ۰/۸۵ درصد نمک سدیم کلراید منتقل شده و به مدت نیم

ساعت بر روی یک شیکر دورانی با سرعت ۲۰۰ rpm هم زده شد. پس از شمارش در زیر میکروسکوپ توسط لام نئوبارحدود ۱ میلی‌لیتر از غلظت باکتری مورد نظر (1×10^{8} CFU/ml) به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع تریپتیک سوی براث درون فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری و در شرایط دمایی ۲۵ درجه سلیسیوس و بر روی شیکر دورانی با سرعت ۱۵۰ rpm به مدت ٢٤ ساعت گرماگذاری شد. برای جدا کردن توده زیستی باکتری از محیط کشت مایع تریپتیک سوی براث، از سانتریفیوژ یخچال دار با ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. پس از سه بار شستشو با سرم فیزیولوژی استریل، ۲۵ گرم از توده زیستی در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل ریخته شد و به مدت ٢٤ ساعت در شیکر انکوباتوردار در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس و دور شیکر ۱۵۰ rpm قرار داده شد. پس از گرماگذاری، توده باکتری با استفاده از سانتریفیوژ جدا شد. پس از جمع‌آوری، از روماند فاقد توده زیستی باکتری، به‌عنوان زیست کاتالیزگر، برای تولید زیستی نانوذرات سولفید مس استفاده شد. برای این منظور به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر از روماند برداشت شده باکتری، محلول سولفات مس (با غلظت نهایی ۵ میلی‌مولار یون مس) اضافه شده و به مدت ٦ و ٢٤ ساعت در شرایط دمایی ۲۸ درجه سلیسیوس و دور شیکر ۱۵۰ rpm گرماگذاری شد. به‌طور همزمان از محلول سولفات مس (بدون تلقیح روماند باکتری Cu25) به عنوان محیط کنترل استفاده گردید. برای بررسی اثر غلظت‌های اولیه یون مس بر روی تولید خارج سلولی نانوسولفید مس، غلظت‌های متفاوت از یون مس شامل ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌مولار به روماند عاری از توده زیستی افزوده شد. پس از ۱۲ ساعت، تشکیل نانوسولفید مس با روش اسپکتروفتومتر بررسی شد. شایان یادآوری است که در این مرحله در همه موارد، دمای واکنش ۲۵ درجه سلیسیوس، pH برابر ۷ و دور شیکر برابر ۱۵۰ rpm بود. همه آزمون‌ها با سه تکرار انجام شد (۱۹).

و) تائید نانوذرات سولفید مس: نانوذرات سولفید مس تشکیل شده در محیط زیستی حاصل از واکنش روماند عاری از کشت باکتری Cu25 به‌عنوان زیست کاتالیزگر در معرض سولفات مس، با استفاده از تست‌های دستگاه اسپکتروفتومتری UV-Vis (Specord 210 ساخت آلمان)، دستگاه فلورسانس (اسپکتروفتومتر Varian ساخت شرکت آپلاید سانیس)، طیف‌سنج پراش انرژی پرتوایکس یا EDX (مدلMira 3-LMu ساخت کمپانی TESCAN کشور چک)، دستگاه طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون‌قرمزیا FTIR (مدل Bruker, VECTOR 22 ساخت کشور آلمان)، هیستوگرام و منحنی نرمال مربوط به دامنه پراکنش اندازه نانوذرات مس و همچنین الکترومیکروگراف‌های تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره یا SEM (مدل Mira 3-LMu ساخت کمپانی TESCAN کشور چک) مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین طیف جذبی اسپکتروفتومتری و طیف نشر فلورسانس محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، نمونه‌ها با سرعت g × ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سلیسیوس، سانتریفیوژ شد. سپس آنالیزهای FTIR، EDX و SEM با هدف بررسی وضعیت نانوکریستال‌های تشکیل شده و هم‌چنین بررسی شکل و اندازه آن‌ها انجام پذیرفت. برای این منظور ابتدا روماند عاری از توده زیستی باکتری از فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد و سپس با هدف رسوب نانوذرات سولفید مس، اتانول مطلق به نسبت ۳ به ۱ به نمونه‌ها افزوده شد و پس از چند بار سانتریفیوژ (g × ۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه)، رسوب حاصل با آب قافد یون استریل شستشو داده شد. درنهایت نمونه‌ها در دستگاه فریزدرایر (مدل Alpha 1-2Dplus ساخت شرکت Martin Christ کشور آلمان) به مدت ٢٤ ساعت خشک شد (۱۹).

ز) بررسی تأثیر خواص ضد میکروبی نانوذرات سولفید مس بر روی گونه‌های باکتری و قارچی بیمارگر: از روش انتشار در دیسک (Disk diffusion method) بر آگار به منظور ارزیابی اثرات ضد میکروبی نانوسولفید مس تولید شده توسط روماند کشت باکتری منتخب Cu25 استفاده شد (۲۵). باکتری‌ها و قارچ‌های مورد مطالعه شامل *اشریشیا کلی* (ATCC25922)، *باسیلوس سرئوس* (ATCC14579)، *آسپرژیلوس نایجر*

(IBRC-M30095)، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (IBRC-M30033)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC33591) و *سودوموناس آئروجینوسا* (ATCC14579) بودند. باکتری های مورد مطالعه به صورت آمپول لیوفلیزه و قارچ ها به صورت کشت فعال از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران خریداری شدند. دیسک‌های کاغذی استریل به قطر ٦ میلی‌متر به روماند حاوی نانوسولفید مس به مدت ۱ ساعت آغشته شد و سپس دیسک‌های تلقیح شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٦ ساعت قرار داده شد تا کاملاً خشک شود.

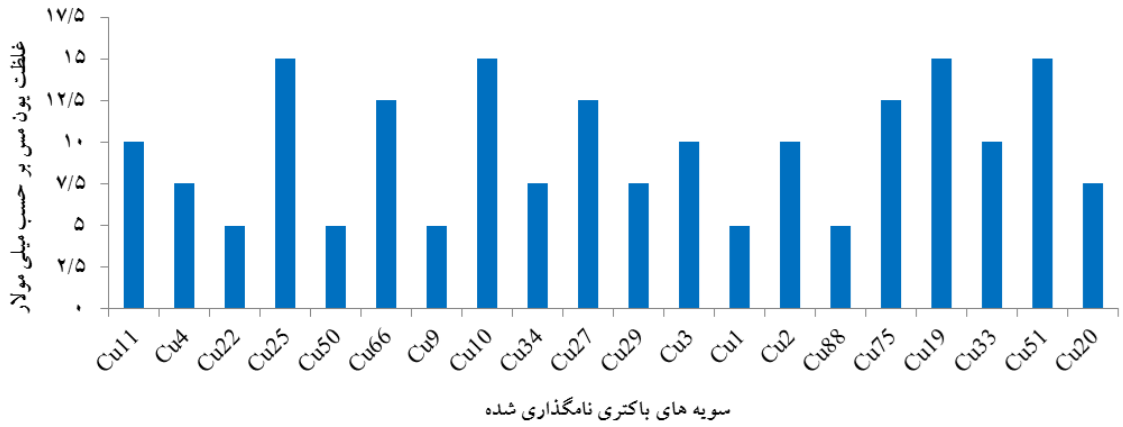
طی این روش از سوسپانسیون باکتری‌ها و قارچ های تهیه شده (پس از شمارش در زیر لام نئوبار) در محیط های کشت لوریابرتانی براث و سیب‌زمینی دکستروز براث با سوآپ استریل روی محیط‌های کشت مولر هینتون آگار (برای باکتری‌های بیماری‌زا) و سیب‌زمینی دکستروز آگار (برای قارچ های مورد مطالعه) با سوآپ استریل کشت داده شد.

سپس دیسک‌های آغشته به محلول حاوی نانوسولفید مس تشکیل شده در واکنش زیست تبدیلی، با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت به مدت ٢٤ ساعت برای باکتری ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و قارچ ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. پس از آن قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط نانوذرات سولفید مس تولید شده علیه هریک از باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا توسط خط کش میلی‌متری، اندازه‌گیری شد.

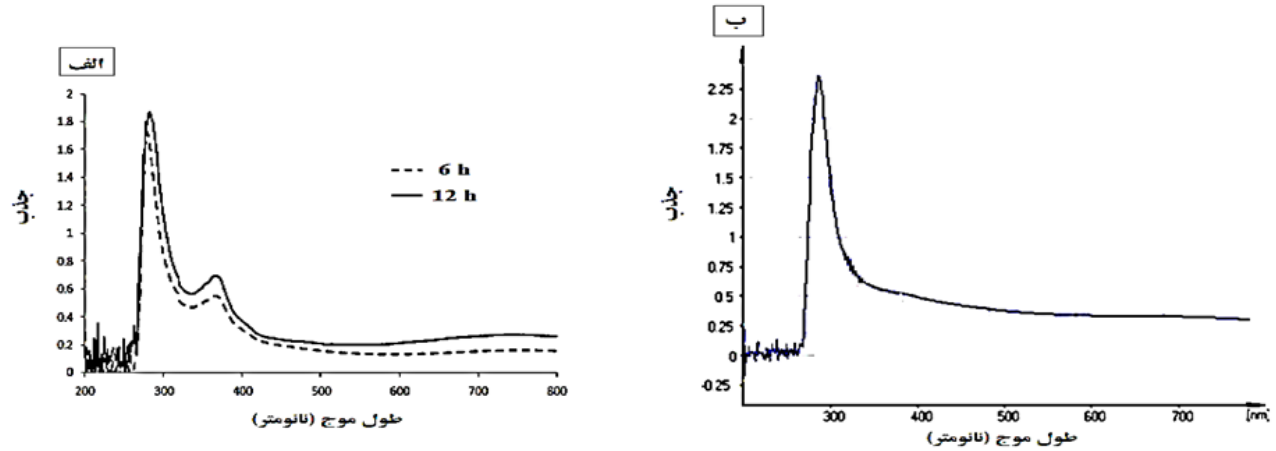
یافته ها

الف) جداسازی سویه‌های باکتری دارای تحمل‌پذیری بالا به یون مس: از بین ۱۰۵ سویه باکتری جدا شده از نمونه‌های آب، بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی بیوشیمیایی، ۲۰ سویه باکتری (نام‌گذاری شده با نام‌های: Cu11، Cu4، Cu22، Cu25، Cu50، Cu66، Cu9، Cu10، Cu34، Cu27، Cu29، Cu3، Cu1، Cu2، Cu88، Cu75، Cu19، Cu33، Cu51 و Cu20) که بالاترین تحمل‌پذیری را نسبت به یون سمی مس (بالاتر از ۵ میلی‌مولار) از خود نشان دادند انتخاب گردیدند (نمودار ۱).

ب) غربالگری سویه‌های باکتری با قابلیت تولید خارج سلولی نانوسولفید مس: از میان ۲۰ سویه باکتری با قابلیت تحمل‌پذیری بالا نسبت به یون سمی مس، تنها روماند کشت سویه Cu25، جدا شده از آب جمع‌آوری شده از دریای خزر، قادر به احیای خارج سلولی یون‌های مس به نانوسولفید مس، در غلظت ۵ میلی‌مولار از یون سمی مس بود که با استفاده از آنالیزهای طیف‌سنجی جذبی اسپکتروفتومتری و نشری فلورسانس مشخص شد. آنالیز نمونه‌ها با اسپکتروفتومتری UV-vis، یک پیک جذبی مشخص را در طول موج ۳٦۲ نانومتر (پیک اختصاصی برای نانوذرات مس) را نشان داد که بیانگر وجود نانوسولفید مس در محلول واکنش زیست تبدیلی است (شکل ۱ قسمت الف). بر اساس منابع معتبر بیشینه پیک جذبی نانوذرات مس در طول موج‌های ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر می‌باشد (۲٦ و ۲۷). در محلول کنترل (عاری از روماند کشت باکتری)،



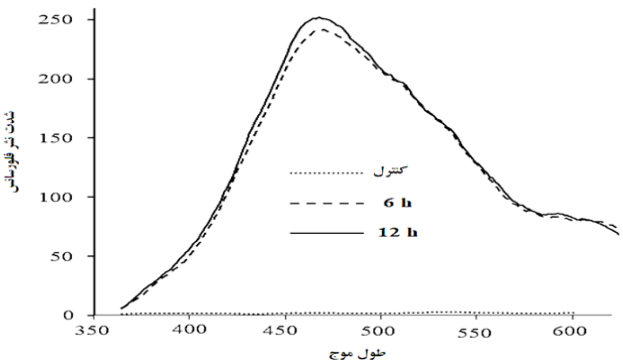
نمودار ۱: الگوی تحمل پذیری سویه‌های باکتریایی آب زی جداسازی شده به یون مس در محیط کشت تریپتیک سوی آگار.



شکل ۱: طیف‌های جذبی اسپکتروفتومتری محلول‌های سولفات مس (غلظت یون مس ۵ میلی‌مولار، pH برابر ۷)، بدون روماند (قسمت ب) و به دنبال اضافه کردن روماند کشت سویه Cu25 (قسمت الف)، پس از ٦ و ١٢ ساعت واکنش زیست تبدیلی در حرارت ۲۵ درجه سلیسیوس.

در طول موج‌های بین ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر هیچ پیک جذبی مشاهده نشد (شکل ۱ قسمت ب). در ادامه و با هدف اطمینان از تشکیل نانوسولفید مس در واکنش زیست تبدیلی توسط روماند کشت سویه باکتری Cu25، آنالیز نمونه‌ها به کمک طیف‌سنجی فلورسانس انجام شد (شکل ۲). آنالیز نمونه‌ها با طیف‌سنجی فلورسانس، یک پیک نشری مشخص را در طول موج ٤٦٦ نانومتر را نشان داد که بیانگر وجود نانوسولفید مس در محلول واکنش زیست تبدیلی است (شکل ۲).

بر اساس منابع معتبر بیشینه پیک نشری نانوذرات سولفیدی مس

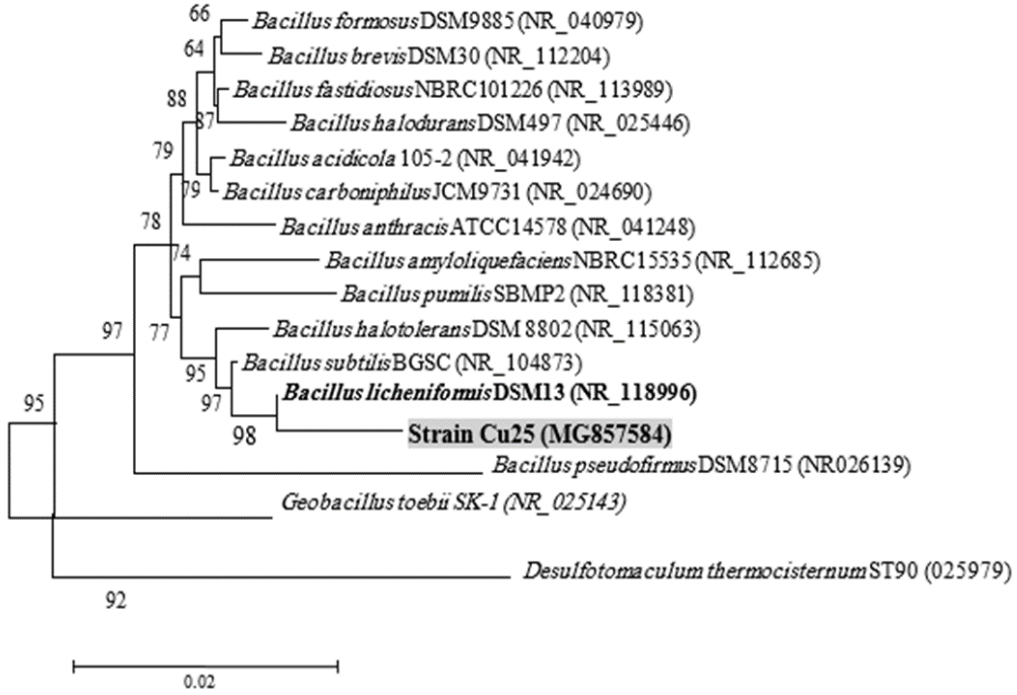


شکل ۲: طیف‌های نشری فلورسانس محلول‌های سولفات مس (غلظت یون مس ۵ میلی‌مولار، pH برابر ۷)، بدون روماند (قسمت A) و به دنبال اضافه کردن روماند کشت سویه Cu25 (قسمت B)، پس از ٦ و ١٢ ساعت واکنش زیست تبدیلی در ۲۵ درجه سلیسیوس روی شیکر مدور (۱۵۰ دور در دقیقه).

(CuxS) در طول موج‌های ٤٢٠ تا ٤٧٠ نانومتر می‌باشد که پیک نشری ٤٧٠ نانومتر مربوط به نانوسولفید مس است (۲۸). در محلول کنترل (بدون روماند کشت باکتری)، در طول موج‌های بین ۲۵۰ تا ۵۵۰ نانومتر هیچ پیک نشری مشاهده نشد.

ج) نتایج شناسایی فنوتیپی و مولکولی سویه منتخب Cu25.

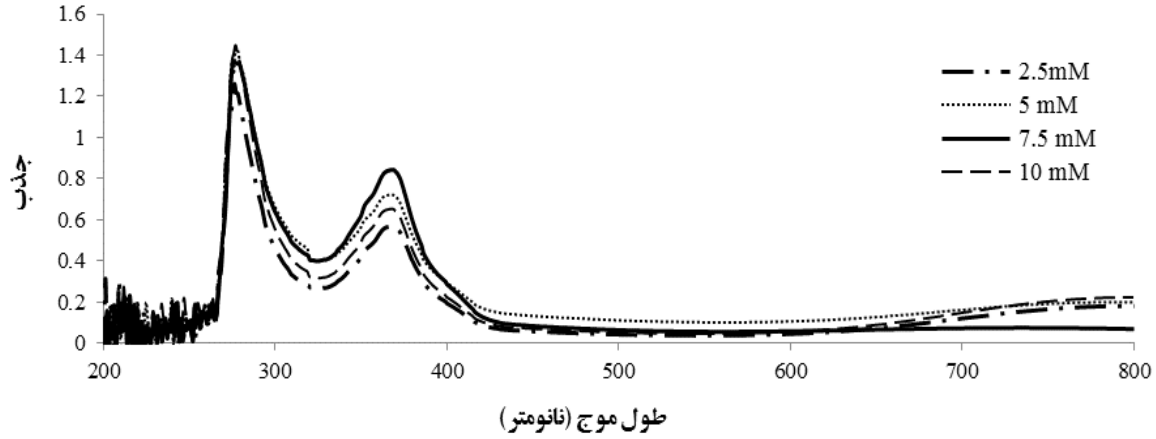
سویه باکتری Cu25 که بر اساس آنالیزهای ظاهری و مشاهدات دستگاهی با استفاده از آنالیزهای اسپکتروفتومتری و فلورسانس قابلیت احیای زیستی سولفات مس به نانوذرات سولفید مس را دارا بود، انتخاب و بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی تشخیصی متداول باکتری‌ها مورد شناسایی قرار گرفت. بر اساس خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی و بر اساس کتاب‌های مرجع و مقالات منتشر شده در این ارتباط (۲۱ و ۲۹)، سویه Cu25 به طور موقت به عنوان *باسیلوس لیکنی فورمیس* (*Bacillus licheniformis*) تشخیص داده شد. پس از مشخص شدن توالی ژن *16S rRNA* و بلاست نمودن آن در پایگاه داده های NCBI، باکتری مورد نظر شناسایی شد. بر اساس نتایج حاصل از بلاست این سویه دارای مشابهت ۹۹ درصدی با سویه‌های متعلق به گونه باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس* بود. در ادامه، پس از تعیین توالی ژن *16S rDNA*، این ژن در بانک اطلاعات ژنی با شماره دسترسی MG857584 ثبت گردید. تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنیکی نیز



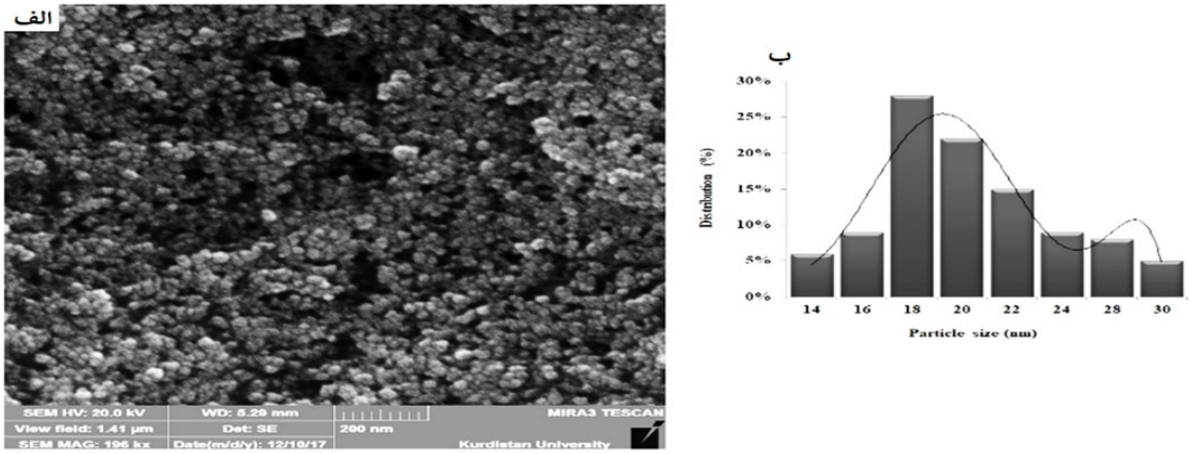
شکل ۳: درخت فیلوژنی سویه Cu25 و سایر اعضای جنس *باسیلوس* بر اساس تکثیر ژن *16S rRNA* . شماره دسترسی سویه‌ها در پرانتز آورده شده است.

تائید نمود که سویه مورد نظر به جنس *باسیلوس* تعلق دارد و علاوه بر این احتمالاً می‌تواند به عنوان سویه ای جدید متعلق به گونه باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس* طبقه‌بندی شود. در درخت فیلوژنی که بر اساس آنالیزهای توالی ژن *16S rRNA* به روش neighbor-joining به‌دست آمده است، موقعیت سویه Cu25 در میان گونه‌های متعلق به جنس *باسیلوس* نشان داده شده است (شکل ۳).

د) اثر غلظت‌های اولیه یون مس بر روی تولید نانوسولفید مس در واکنش کاتالیز شده توسط روماند کشت باکتری باسلوس لیکنی فورمیس سویه Cu25: همانگونه که در شکل ٤ نشان داده شده است، با افزایش غلظت یون مس از ۲/۵ تا ۱۰ میلی‌مولار، یک افزایش تدریجی در طیف جذبی مرتبط با تشکیل نانوسولفید مس در مخلوط واکنش زیست تبدیلی، پس از ۱۲ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس، pH برابر ۷ و



شکل ٤: اثر غلظت‌های اولیه یون مس بر روی تولید خارج سلولی نانوسولفید مس در مخلوط واکنش زیست تبدیلی حاوی روماند کشت باکتری *باسلوس لیکنیفرمیس* سویه Cu25.

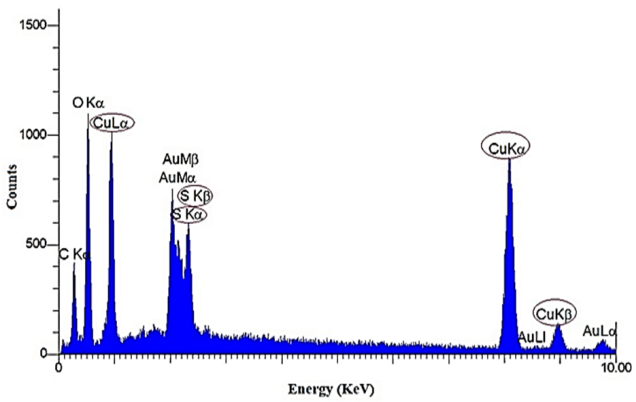


شکل ۵: الف- تصویر SEM حاصل از نانوسولفید مس تولید شده توسط روماند کشت سویه باکتری Cu25. ب- هیستوگرام دامنه پراکنش اندازه

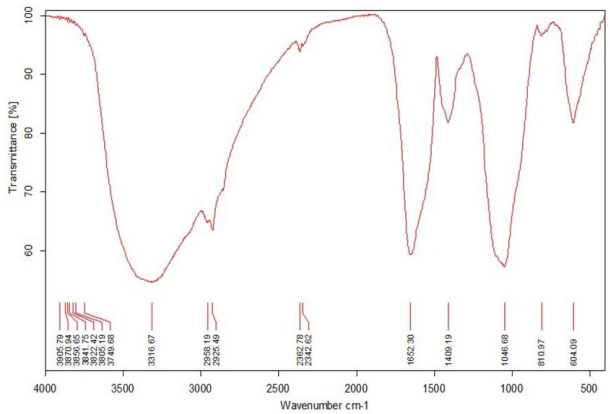
دور شیکر rpm ۱۵۰ وجود دارد. حداکثر تولید نانوسولفید مس در غلظت ۷/۵ میلی‌مولار یون مس به دست آمد. از این‌رو در مطالعات اخیر برای حداکثر تولید نانوذرات از غلظت ۷/۵ میلی‌مولار استفاده شد. با این‌حال در غلظت‌های بالاتر از ۷/۵ میلی‌مولار، به دلیل احتمالاً سمیت یون مس، راندمان تولید نانوکوانتوم دات سولفید مس کاهش یافته است.

ه) نتایج بررسی‌های میکروسکوپی و طیف‌سنجی نانوذرات تولید شده توسط باسیلوس لیکنی فورمیس سویه Cu25: در شکل ۵ الکترومیکروگراف‌های تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی SEM و دامنه پراکنش اندازه نانوذرات مذکور نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل ۵ نشان داده شده است، میکروگراف‌های حاصل، تولید نانوسولفید مس با پراکنش باریک اندازه ذرات (۳۰-۱۴ نانومتر) و متوسط اندازه ذرات ۲۱/۵ نانومتر را نشان داد. در ادامه و با هدف تجزیه و تحلیل ساختاری و مشخص نمودن ترکیب عنصری نمونه نانوذره زیستی تولید شده، از طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس استفاده شد. در شکل ٦ هریک از پیک‌های نشان داده شده مختص یک اتم و نشانگر یک عنصر می‌باشند.

آنالیز EDX وجود عناصر Cu و S را در ترکیب نانوذرات تشکیل شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی تائید می‌کند. در نهایت و با هدف بررسی وجود احتمالی عوامل پوشاننده (Capping agents) زیستی در نانوذرات تولید شده، آنالیز FTIR انجام شد (شکل ۷). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز FTIR می‌توان گفت که پیک پهن ظاهر شده در



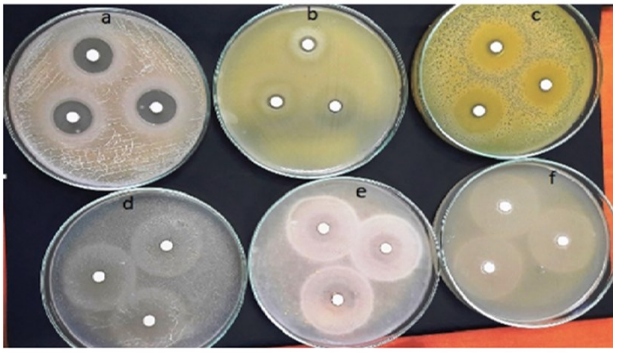
شکل ٦: طیف EDX نانوذرات مس تولید شده توسط روماند کشت *باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس* سویه Cu25.



شکل ۷: طیف FTIR نانوذرات مس تولید شده توسط روماند کشت *باسیلوس لیکنی فورمیس* سویه Cu25.

محدوده عدد موجی ۳۰۰۰ تا ۳۵۰۰ مربوط به گروه OH موجود در حلال آب و یا گروه کربوکسیلیک اسید می باشد. از طرفی چون پیک مربوطه پهن می باشد می توان گفت که گروه OH پیوند هیدروژنی برقرار نموده است. این پیوند می تواند مربوط به خود حلال آب یا مربوط به پیوند OH با ترکیبات آمینی موجود در ساختار پروتئین پوشش‌دهنده باکتری باشد. دو پیک ظاهر شده در محدوده ی ۲۹۲۵ تا ۲۹۵۸ مربوط به گروه C-H کششی موجود در ترکیبات آلی می باشد. پیک ظاهر شده در عدد موجی ۱۶۵۲ مربوط به C=O کششی در ترکیبات آلی است. پیک ظاهر شده در عدد موجی ۱۰۴۶ مربوط به پیوند C-N موجود در پروتئین ها می باشد و در نهایت پیک ظاهر شده در عدد موجی ۰۹/۶۰۴ مربوط به تشکیل پیوند فلزی می باشد که این می تواند نشان بدهد پیوند Cu-S در این محدوده تشکیل گردیده و نشان از تولید نانوذرات زیستی مس توسط باکتری است (شکل ۷).

و) فعالیت ضد میکروبی نانوذرات مس: نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده اثر مهاری نانوذرات مس تولید شده می‌باشد. با این روش، بیشترین اثر مهاری نانوذره برعلیه باکتری *سودوموناس آئروجینوسا* با مهار ۲۳ میلی‌متر از خود نشان داد و کمترین میزان مهارکنندگی را با مهار ۱۰ میلی‌متری علیه قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* نشان داد. اثر مهاری بر سایر باکتری‌ها و قارچ‌های مورد مطالعه نیز با میانگین مهاری ۱۴ تا ۲۲ میلی‌متری نشان داده شد (شکل ۸).



	Pathogenic bacteria and fungi	Zone of inhibition (mm in diameter)
a	*Staphylococus aureus* ATCC33591	15
b	*Aspergillus fimigatus* IBRC-M 30033	10
c	*Aspergillus niger* IBRC-M30095	14
d	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027	23
e	*Bacillus cereus* ATCC14579	22
f	*Escherichia coli* ATCC25922	20

شکل ۸: نتایج اثر مهاری نانوذرات سولفید مس تشکیل شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی علیه برخی باکتری‌ها و قارچ‌های مورد مطالعه.

بحث

در این پژوهش، جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتری آب زی با پتانسیل تولید خارج سلولی نانوذرات مس مورد مطالعه قرار گرفت. میکروارگانیسم‌های ساکن در زیستگاه‌های آب‌زی نسبت به انواع خشکی‌زی از نظر خصوصیات فیزیولوژیک و تنوع متابولیکی متفاوت بوده و به‌طور معمول توانمندی بالایی در تولید فرآورده‌های فعال زیستی دارند.

با توجه به سازگاری طولانی مدت میکروارگانیسم‌های ساکن در زیستگاه دریایی با شرایط سخت محیطی از نظر دما، pH، فشار، غلظت‌های مختلف نمک و عناصر کمیاب، کاندیدهای مناسب به‌عنوان کاتالیزورهای مبتنی بر شیمی سبز برای مطالعات زیست تبدیلی میکروبی محسوب می‌شوند. (۳۰).

در این راستا، ۱۰۵ سویه باکتری آب‌زی با قابلیت تحمل‌پذیری نسبت به یون مس (غلظت اولیه یک میلی‌مولار)، از نمونه‌های مختلف آب جمع‌آوری شده از مناطق ایران، بر اساس تکنیک غنی‌سازی جدا شدند. مقاومت ذاتی این سویه‌ها نسبت به یون مس با استفاده از روش رقت در آگار (کشت نقطه‌ای) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده، ۲۰ سویه قابلیت تحمل‌پذیری بین ۵ تا ۱۷/۵ میلی‌مولار نسبت به یون مس را داشتند که به‌عنوان سویه‌های برتر به منظور ارزیابی سنتز خارج سلولی نانوذرات مس مورد بررسی قرار گرفتند.

از میان سویه‌های باکتری آب‌زی با قابلیت تحمل‌پذیری بالا، ۲۰ سویه باکتریایی که بالاترین توان تحمل را نسبت به یون مس داشتند (بالاتر از ۵ میلی‌مولار) انتخاب شدند و از نظر بررسی قابلیت احیای سولفات مس به نانوذرات مس در غلظت ۵ میلی‌مولار مورد بررسی قرار داده شدند. بر اساس یافته‌های به‌دست آمده، تنها روماند سویه Cu25 قادر به تولید زیستی نانوذرات مس به صورت خارج سلولی بود. مزیت تولید خارج

سلولی نانوذره سولفید مس توسط سویه باکتری جدا شده در تحقیق حاضر در این است که تولید داخل سلولی نانوذره مذکور پرهزینه بوده و نیاز به مراحل اضافی جهت استخراج نانوذرات از درون سلول دارد؛ بنابراین به‌وسیله باکتری مورد بررسی می‌توان به تولید خارج سلولی نانوذرات مس، بدون نیاز به مراحل پیچیده استخراج، دست یافت. سویه باکتری Cu25 به‌عنوان سویه برتر انتخاب گردید و مورد شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی قرار گرفت.

سویه یاد شده میله‌ای گرم مثبت، متحرک، ازنظر واکنش کاتالاز و اکسیداز مثبت، ازنظر تشکیل آندوسپور مثبت، از نظر مصرف سیترات و احیای نیترات و همچنین رشد در شرایط بی‌هوازی مثبت بود. همچنین قابلیت رشد در دماهای بین ۱۵ تا ٤٠ درجه سلسیوس را داشت. نتایج آنالیزهای مورفولوژیک و فیلوژنیکی نشان داد که این جدایه دارای بیشترین مشابهت به *باسیلوس لیکنی فورمیس* می‌باشد. توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rDNA سویه Cu25 با شماره دسترسی MG857584 در بانک اطلاعات ژنی NCBI قابل‌دسترس می‌باشد.

در ادامه، سنتز خارج سلولی نانوذرات سولفید مس تولید شده توسط باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس* سویه Cu25 تحت شرایط بهینه واکنش زیست تبدیلی مورد بررسی قرار گرفت که بر اساس نتایج به‌دست آمده، روماند سویه یاد شده پس از مواجهه با محلول سولفات مس (غلظت ۷/۵ میلی‌مولار)، قادر به سنتز خارج سلولی نانوذرات سولفید مس کروی با میانگین اندازه ۲۱/۵ نانومتر در pH بهینه برابر ۸ و دمای بهینه ۳۰ درجه سلسیوس پس از ٢٤ ساعت گرماگذاری در دور شیکر ۱۰۰ rpm بوده است.

شانت کریتی (Shantkriti) و رانی (Rani) با استفاده از روماند عاری از کشت باکتری *سودوموناس فلورسانس* (*Pseudomonas fluorescens*) در مقیاس آزمایشگاهی، موفق به تولید نانوذرات کروی مس به‌صورت خارج سلولی با میانگین اندازه ٤٩ نانومتر در pH برابر ۷ و در مواجهه با محلول سولفات مس در غلظت ۳۱۸ میلی‌گرم در لیتر شدند (۱۷).

در مطالعه صورت پذیرفته در ارتباط با تولید نانوذرات مس با استفاده از سویه های میکروبی، نتایج تحقیقات قربانی (Ghorbani) و همکاران نشان داد که عصاره کشت باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* (*Salmonella typhimurium*) پس از مواجهه با محلول نیترات مس (۱ میلی‌مولار)، قادر به سنتز خارج سلولی نانوذرات مس با میانگین اندازه ذرات ٤٩ نانومتری بوده است (۳۱).

در مطالعه صورت پذیرفته در ارتباط با تولید نانوذرات مس با استفاده از سویه های قارچی، نتایج تحقیقات سالوادوری (Salvadori) و همکاران نشان داد که توده زیستی قارچ *هیپوکریا لیکسی* (*Hypocrea lixii*)، پس از مواجهه با محلول کلرید مس، قادر به سنتز نانوذرات مس در شرایط بهینه شده ازنظر دما، pH، غلظت اولیه یون مس و دور شیکر بوده است (۳۲).

در این پژوهش کارایی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سولفید مس تشکیل‌شده توسط روماند کشت باکتری جدا شده *باسیلوس لیکنی فورمیس* سویه Cu25، علیه برخی باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و برخی قارچ‌های بیماری‌زا بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوذرات زیستی تولیدشده علیه تمام میکروب‌های مورد بررسی، اثر مهارکنندگی رشد را دارد. با این حال، حساسیت *سودوموناس آئروجینوسا* و *باسیلوس سرئوس* در مقایسه با سایر ارگانیسم‌های مطالعه شده بیشتر بود. همچنین بر اساس نتایج به‌دست آمده، سویه‌های باکتری گرم مثبت و منفی در مقایسه با قارچ‌ها حساسیت بیشتری در برابر نانوذرات سولفید مس از خود نشان دادند. باکتری‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها و اکثر عوامل ضد باکتریایی مقاومت پیدا کرده‌اند. این مقاومت وراثتی شده و منجر به ادامه بیماری‌های عفونی می‌شود و این یکی از بزرگ‌ترین نگرانی‌های سلامتی است.

در چند دهه ی اخیر نانومواد به دلیل خواص مهم شامل بزرگ بودن نسبت سطح به حجم و فعالیت‌های مهاری بالا بر ضد باکتری‌ها توجه زیادی را به خود جلب کرده است. به خاطر اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی نانوذرات مس از آن‌ها در بسیاری از محصولات تجاری، پزشکی و بهداشتی استفاده می‌شود.

نتیجه گیری

در این پژوهش، شناخت سویه‌های باکتری آب‌زی با پتانسیل تولید نانوذرات مس مورد توجه قرار گرفته و سویه‌های متعددی از نمونه‌های آبی مختلف در ایران جداسازی و شناسایی گردید. غربالگری میکروارگانیسم‌های بومی جدید با قابلیت تولید نانوذرات فلزی می‌تواند جایگاه استفاده از روش‌های میکروبی در تولید نانومواد را بهبود بخشیده و آینده مناسب‌تری را ترسیم نماید. با توجه به هدف این پژوهش درتهیه زیستی نانوذرات مس به‌صورت برون سلولی به منظور مطالعات آسان‌تر و ایجاد شرایط مناسب تولید مطلوب نانوذرات، بنابراین امید است با بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر فرآیند سنتز میکروبی نانوذرات و بررسی پایداری شان و همچنین مطالعه مکانیسم‌های میکروبی در احیای زیستی سولفات مس به نانوکوانتوم دات سولفید مس، علاوه بر ترویج روش‌های مبتنی بر شیمی سبز، بتوان از ظرفیت‌های بالقوه سویه‌های باکتری آب‌زی بومی به‌عنوان زیست کاتالیزگرهای ایمن، ساده و ارزان قیمت در مقیاس‌های بزرگ‌تر از مقیاس آزمایشگاهی بهره جست.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد بوده که با حمایت دانشگاه کردستان به انجام رسیده است. نویسندگان این مقاله از تمام کسانی که در اجرای این مطالعه همکاری نموده اند، کمال قدردانی و امتنان را دارند.

References

1. Li X, Xu H, Chen ZS, Chen G. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. J Nanomater. 2011; 2011: 1-25.
2. Su X, Zhao J, Bala H, Zhu Y, Gao Y, Ma S, Wang Z. Fast synthesis of stable cubic copper nanocages in the aqueous phase. J Phys Chem C. 2007; 111(40): 14689-14693.
3. Dadgostar N, Ferdous S, and Henneke D. Colloidal synthesis of copper nanoparticles in a two-phase liquid–liquid system. Mater Lett. 2010; 64(1): 45-48.
4. Lee HJ, Lee G, Jang NR, Yun JH, Song JY, Kim BS. Biological synthesis of copper nanoparticles using plant extract. Nanotechnol. 2011; 1: 371-374.
5. Raja M, Subha J, Ali FB, Ryu SH. Synthesis of copper nanoparticles by electroreduction process. Mater Manuf Process. 2008; 23(8): 782-785.
6. Yus H. Hydrothermal/solvothermal processing of advanced ceramic materials. J Ceram Process Soc Jpn. 2001; 109(1269): 65-75.
7. Amendola V, Meneghetti M. Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. Phys Chem Chem Phys. 2009; 11(20): 3805-3821.
8. Suryanarayana C. Mechanical alloying and milling. Prog Mater Sci. 2001; 46(1): 1-184.
9. Lisiecki I, Filankembo A, Sack-Kongehl H, Weiss K, Pileni MP, Urban J. Structural investigations of copper nanorods by high-resolution TEM. Phys Rev B. 2000; 61(7): 4968.
10. Varshney R, Bhadauria S, Gaur MS. A review: biological synthesis of silver and copper nanoparticles. Nano Biomed Eng. 2012; 4(2): 99-106.
11. Pavani K.V, Srujana N, Preethi G, Swati T. Synthesis of copper nanoparticles by *Aspergillus* species. Lett Appl Nanobiosci. 2013; 2: 110-113.

12. Mallikarjuna K, Narasimha G, Dillip GR, Praveen B, Shreedhar B, Lakshmi C, Reddy BVS, Raju BDP. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ocimum* leaf extract and their characterization. Dig J Nanomater Biostruct. 2011; 6(1): 181-186.

13. Rai, M, Maliszewska I, Ingle A, Gupta I, Yadav A. Diversity of microbes in synthesis of metal nanoparticles. In bio-nanoparticles: biosynthesis and sustainable biotechnology applications. Singh, O. V. (ed). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. 2015; pp. 1-30.

14. Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. Adv Colloid Interface Sci. 2010; 156(1): 1-13.

15. Cioffi N, Torsi L, Ditaranto N, Tantillo G, Ghibelli L, Sabbatini L, Bleve-Zacheo T, D'Alessio M, Zambonin PG, Traversa E. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. Chem Mater. 2005; 17(21): 5255-5262.

16. Khanna PK, Gaikwad S, Adhyapak PV, Singh N, Marimuthu R. Synthesis and characterization of copper nanoparticles. Mater Lett. 2007; 61(25): 4711-4714.

17. Shantkriti S, Rani P. Biological synthesis of copper nanoparticles using *Pseudomonas fluorescens.* Int J Curr Microbiol App Sci. 2014; 3: 374-383.

18. Washington JA. Dilution susceptibility test: Agar and macro-broth dilution procedures. American Soc for Microbiol. Washington, DC (USA); 1980.

19. Jain N, Bhargava A, Tarafdar JC, Singh SK, Panwar J. A biomimetic approach towards synthesis of zinc oxide nanoparticles. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97(2): 859-869.

20. Baron E, Finegold S. Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 8th ed. The Mosby Company, St. Louis, MO; 1990.

21. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1994.

22. Collins CH, Patricia M, Lyne JM, Grange. Page 112 in Collins and dynes microbiological methods, 7th Ed. Butterworth-Heinemann, UK; 1995.

23. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol. 1991; 173: 697-703.

24. 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.

25. Tendencia EA. Disk Diffusion In: Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment. Tigbavan, Ibilo; Aquaculture Dept, Southeast Asian Fisheries Development Centre. 2004; pp.13-29.

26. Hosseini MR, Schaffie M, Pazouki M, Darezereshki E, Ranjbar M. Biologically synthesized copper sulfide nanoparticles: production and characterization. Mater Sci Semicond Process. 2012; 15: 222-225.

27. Schaffie M, Hosseini MR. Biological process for synthesis of semiconductor copper sulfide nanoparticle from mine wastewaters. J Environ Chem Eng. 2014; 2(1): 386-391.

28. Yadav S, Bajpai PK. Synthesis of copper sulfide nanoparticles: pH dependent phase

stabilization. Nano-Structures Nano-Objects. 2017; 10: 151-158.

29. 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.

30. Dash H. R, Mangwani N, Chakraborty J, Kumari S, Das S. Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97(2): 561-571.

31. Ghorbani HR, Mehr FP, Poor AK. Extracellular synthesis of copper nanoparticles using culture supernatants of *Salmonella typhimurium*. Orient J Chem. 2015; 31: 527-529.

32. Salvadori MR, Lepre LF, Ando RA, Oller do Nascimento CA, Correa B. Biosynthesis and uptake of copper nanoparticles by dead biomass of *Hypocrea lixii* isolated from the metal mine in the Brazilian amazon region. PLoS ONE. 2013; 8(11): e80519.

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 3, September 2018

Original Article

Antimicrobial effects of extracellular copper sulfide nanoparticles synthesized from *Bacillus licheniformis*

Morahem Ashengroph[1], **Maryam Sahami Soltani**[2]

[1]Associate Professor in Industrial Microbiology, University of Kurdistan, Faculty of Sciences, Department of Biological Sciences, Sanandaj, Iran. [2]M.Sc. in Biochemistry, University of Kurdistan, Faculty of Sciences, Department of Biological Sciences, Sanandaj, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Copper nanoparticles due to unique catalytic properties and electrical and optical conductivity are of great importance. This study was aimed to use the potential of aquatic bacteria as biocatalysts to reduce copper sulfate into copper sulfide nanoparticles (CuSNPs) and to assess its antimicrobial properties.

Materials & Methods: The CuSNPs produced via bioconversion reaction have been characterized by spectroscopy analysis, electro-micrographs prepared by scanning electron microscopy (SEM) and particle size distribution histogram. The antimicrobial activity of CuSNPs against some bacteria and pathogenic fungi was also investigated by disc diffusion test.

Results: 105 Cu-resistant bacterial strains have been isolated according to selective enrichment technique. Based on the results, the only culture supernatant of strain Cu25 was able to reduce copper sulfate into copper sulfide nanoparticles (CuSNPs), extracellular. The cu25 strain was identified as *Bacillus licheniformis* based on phenotypic and molecular analysis. Subsequently, the extracellular synthesis of CuSNPs was investigated. The results showed that the supernatant of *B. licheniformis* Cu25 following exposure to 7.5 mM copper sulfate solution and 24 h of incubation can produce spherical CuSNPs with the average diameter of 21.5 nm as extracellular.

Conclusion: The current study is the first report on the extracellular synthesis of CuSNPs using *B. licheniformis*. Also, the produced biological nanoparticles have growth inhibitory effect against some pathogenic bacteria and fungi.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, Copper sulfide nanoparticle, Inhibitory effect, Extracellular synthesis.

Correspondence to: Morahem Ashengroph

Tel: +98 87 33664600

E-mail: ashengroph@uok.ac.ir

Journal of Microbial World 2018, 11(3): 243-257.