فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۹، بهار ۱۳۹۳، صفحه ۵۳- ۶۴
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۰۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۱۵

سنتز خارج سلولی نانوذرات نقره توسط باکتری *Ralstonia* sp. SM8 جدا شده از معدن مس سرچشمه

مراحم آشنگرف: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه کردستان، ایران، m.ashengroph@uok.ac.ir*

چکیده

مقدمه: روش‌های مبتنی بر فناوری زیستی به علت تمیزی و سازگاری بسیار بالا با محیط زیست از جایگاه ویژه ای برخوردار اند. با وجود سمیت بالای نقره، تعداد محدودی از میکروارگانیسم‌ها نه تنها در برابر نقره مقاومت دارند بلکه قادر به احیای آن به شکل نانوذرات نقره نیز هستند. هدف از این تحقیق، جداسازی و معرفی سویه‌های باکتری بومی به‌عنوان زیست واکنشگرهای میکروبی با توانایی سنتز برون سلولی نانوذرات نقره بود.

مواد و روش‌ها: ۸ سویه باکتری دارای تحمل پذیری بالا نسبت به یون سمی نقره، با استفاده از مشاهدات ریخت‌شناسی و آزمایش‌های اولیه تشخیصی بیوشیمیایی از خاک‌های معادن مس و طلا جداسازی شدند. سویه‌های باکتری با محلول نیترات نقره (با غلظت ۱ گرم در لیتر) با اسیدیته برابر ۷، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی همزن مدور (۱۲۰ دور در دقیقه) ، به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. بررسی تولید نانوذرات از طریق تغییر رنگ محلول واکنش و روش‌های اسپکتروسکوپی، میکروسکوپی و طیف سنجی انجام شد.

نتایج: از میان ۸ سویه جداسازی شده با تحمل پذیری بالا نسبت به یون نقره، تنها سویه باکتری SM8، جدا شده از معدن مس سرچشمه کرمان، قادر به سنتز خارج سلولی نانوذرات نقره بود. سویه منتخب از نظر صفات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و همچنین، فیلوژنی و مولکولی، شناسایی و در جنس *Ralstonia* (با شماره دسترسی KF264453 در بانک اطلاعات ژنی NCBI) قرار داده شد. نتایج به دست آمده از مشاهدات چشمی، اسپکتروفتومتری UV-vis و تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی SEM و پراش اشعه ایکس (XRD) نشان داد که سوپرناتانت باکتری *Ralstonia* sp. SM8، قادر به احیای یون نقره به نانوذرات نقره به شکل خارج سلولی است. نانوذرات نقره تولیدی به شکل کروی و اندازه آن‌ها در ابعاد ۲۰ تا ۵۰ نانومتر را بود.

بحث و نتیجه‌گیری: براساس نتایج حاصل از این پژوهش، با استفاده از سوپرناتانت باکتری *Ralstonia* sp. SM8، تولید سریع و خارج سلولی نانوذرات نقره، بدون نیاز به مراحل پیچیده استخراج، می‌تواند انجام شود. مطالعه حاضر، نخستین گزارش از تولید زیستی نانوذرات نقره در جنس *Ralstonia* است.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات نقره، سنتز زیستی، *Ralstonia* sp. SM8.

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

کاربرد فناوری در مقیاس اتم و مولکول یکی از فناوری‌های[1] نوظهور در قرن حاضر است که آینده اقتصاد جهان را به شدت متاثر خواهد کرد. میکروارگانیسم‌ها ی مختلف شامل: باکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌ها و اکتینومیست‌ها برای سوخت و ساز و انجام فرآیندهای حیاتی خود از منابع آلی و معدنی موجود در محیط تغذیه می‌کنند. این ارگانیسم‌ها طی فرآیندهای متفاوت، هنگامی که در معرض یون‌های فلزی قرارمی‌گیرند، آن‌ها را در درون یا بر روی دیواره سلولی خود انباشته کرده و این انباشتگی بیشتر به تولید ذراتی منجر است که در اندازه‌های نانوذرات بسته بندی می‌شوند (۱). دستیابی به نانو مواد گام نخست در توسعه فناوری نانو است. توسعه روش‌های تهیه نانو مواد برای تولید موادی با ترکیب، اندازه معین و توزیع مناسب اندازه ذره[2] و همچنین، پایداری، از محورهای مورد بحث در پژوهش‌های اخیر محسوب می‌شود. در این میان روش‌های مبتنی بر فناوری زیستی به علت تمیزی و سازگاری بسیار بالا با محیط زیست از جایگاه ویژه ای برخوردار است (۲ و ۳). در حال حاضر از نانوذرات نقره به‌عنوان یک پوشش انتخابی در ساخت صفحات خورشیدی، باتری‌های الکتریکی و گیرنده‌های نوری استفاده می‌شود. همچنین، از آن‌ها به‌عنوان زیست واکنشگر[3] در واکنش‌های شیمیایی و تشخیص سریع انواع سرطان‌ها استفاده می‌شود (۱ و ۲). با توجه به خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره از آن‌ها در صنایع غذایی، صنایع نساجی، صنایع کاغذسازی، صنایع ساخت لوازم خانگی و همچنین، صنایع ساخت مواد شوینده و بهداشتی استفاده می‌شود (۴). تولید فیزیکی و شیمیایی نانو ذرات نقره علاوه بر تحمیل هزینه‌های بالا، سختی مسیر سنتز فرآیند و راندمان تولید کم، آلودگی‌های زیست محیطی بالایی را به همراه دارد. از سوی دیگر، با توجه به کاربرد رو به رشد نانو ذرات نقره، تمایل به گسترش روش‌های سازگار با محیط زیست از طریق توسعه روش‌های زیستی با استفاده بیوکاتالیزورهای میکروبی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۵). با وجود سمیت نقره برای بسیاری از میکروارگانیسم‌ها، تعداد محدودی از میکروارگانیسم‌ها نه تنها در برابر نقره مقاومت دارند بلکه قادر به احیای آن به شکل نانوذرات نقره نیز هستند. از میان نانوذرات فلزی تولید شده با استفاده از میکروارگانیسم‌های مختلف، نانوذره نقره از مهم‌ترین نانو فلزاتی است که بیشترین تحقیقات را در این زمینه به خود اختصاص داده است. بررسی‌های انجام شده تاکنون، نشان داده اند که میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها، کپک‌های رشته‌ای، مخمرها و اکتینومیست‌ها برای تولید نانوذرات نقره استفاده شده است. اگرچه طیف وسیعی از میکروارگانیسم از قبیل *Pseudomonas stutzeri* AG259 (۶)، *Corynebacterium* sp. SH09 (۷)، *Lactobacillus* sp. (۸)، *Aeromonas* sp. SH10 (۹)، *Acetobacter xylinum* (۱۰)، *Bacillus* sp. (۱۱)، *Morganella* sp. (۱۲) و *Plectonema boryanum* (۱۳) در تولید زیستی نانوذرات نقره بیشتر به‌شکل داخل سلولی بکار گرفته شده اند. با این حال، مطالعات انجام شده در زمینه تولید خارج سلولی نانوذرات نقره با استفاده از سوپرناتانت کشت میکروبی محدود به چندین جنس قارچی از جمله کپک‌های رشته ای *Aspergillus fumigatus*، *Trichoderma asperellum*، *Phaenerochate chrysosporium* و سویه مخمری MKY3 بوده (۳) و در سویه‌های باکتری

تنها در باکتری بیماری‌زا *Klebsiella pneumoniae* (۱۴) و سویه اکتینومیست *Streptomyces* sp. ERI-3 (۱۵) گزارش شده است. بنابراین، لزوم نیاز به تحقیقات گسترده‌تر حس می‌شود. سویه بومی *Ralstonia* sp. SM8 غربال‌گری شده در پژوهش حاضر، با توجه به مزایای استفاده از سویه‌های باکتریایی برای تولید صنعتی نانوذرات نقره از جمله سهولت کار با آن‌ها و دستکاری ژنتیکی آسان به علت فقدان هسته، می‌تواند به‌عنوان زیست واکنشگر میکروبی ایمن و کارآمد برای تولید خارج سلولی نانوذرات نقره معرفی شود. در این پژوهش، برای نخستین بار سنتز نانو ذرات نقره توسط یک سویه باکتری از جنس *Ralstonia* گزارش شده است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و محیط‌های کشت

نیترات نقره از شرکت سیگما- آلدریچ[۴] و پپتون و عصاره مخمر مورد نیاز برای تهیه محیط‌های کشت استفاده شده از شرکت مرک[۵] خریداری شد. محلول‌های استوک در آب مقطر حل شده و پس از فیلتراسیون به‌وسیله فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرونی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۷ روز نگهداری شدند. در تمام مراحل آزمایش از آب مقطر دو بار تقطیر استفاده شد.

جداسازی سویه‌های باکتری با قابلیت تحمل پذیری نسبت به یون نقره

برای جداسازی سویه‌های باکتری تحمل پذیر به یون نقره، نمونه‌های خاک از معادن مس و طلا واقع در استان‌های کرمان و کردستان جمع آوری شدند. از نمونه‌های خاک جمع آوری شده سری رقت تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سری رقت‌های تهیه شده در محیط‌های کشت غنی کننده لوریا- برتانی[۶] آگار فاقد نمک سدیم کلراید (پپتون ۱۰ گرم در لیتر، عصاره مخمر ۵ گرم درلیتر، آگار ۲۰ گرم در لیتر و اسیدیته برابر ۷) که حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر یون نقره بود، کشت شد. پس از ۷ روز گرما گذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، سویه‌های باکتری براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی جداسازی شدند. تحمل پذیری سویه‌های باکتری جدا شده با روش رقت در آگار[۷] تعیین شد (۱۶). برای این منظور به ارلن‌های ۱۲۵ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از لوریا- برتانی آگار (فاقد نمک سدیم کلراید) ذوب شده، غلظت‌های خاصی از یون نقره (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹ و ۱ گرم در لیتر) اضافه شده و سپس داخل ظرف‌های محیط کشت[۸] شیشه‌ای به قطر ۸ سانتی‌متر ریخته شد. ظرف‌های محیط کشت آگاردار در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند تا سطح مرطوب آن‌ها خشک شود. سپس به‌وسیله نمونه بردار[۹]، ۱۰ میکرولیتر از محیط مایع که میکروب مورد نظر درآن رشد کرده (رشد لگاریتمی) بود و تراکم آن ۵/. مک فارلند بود بر روی محیط آگاردار قرار گرفت (میکروب تلقیح شده $5/1 \times 10^8$ cfu/ml). پلیت‌ها پس از ۷ روز گرما گذاری در ۲۸ درجه سانتی‌گراد مطالعه شدند.

سنتز خارج سلولی نانو ذرات نقره

سویه‌های باکتری در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط لوریا برتانی فاقد نمک در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی همزن مدور[۱۰] (۱۲۰ دور در دقیقه) ، به مدت ۲۴ ساعت گرما گذاری شد. محلول نیترات نقره در غلظت نهایی ۱ گرم در لیتر یون نقره، به سوسپانسیون کشت اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت

گرماگذاری اضافی در شرایط رشدی مشابه، در صورت مشاهده تغییر رنگ، توده زیستی با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه، در مدت ۵ دقیقه جداسازی شد. سپس سوپرناتانت سویه منتخب از نظر تولید خارج سلولی نانو ذرات نقره بررسی شد. برای این منظور سلول‌ها ابتدا در محیط آبگوشتی لوریا برتانی فاقد نمک سدیم کلراید در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور همزن ۱۲۰rpm به مدت ۲۴ ساعت رشد داده شد. پس از برداشت سلول‌ها با سانتریفیوژ یخچالی (۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) از سوپرناتانت کشت باکتریایی، به‌عنوان کاتالیزور زیستی برای سنتز خارج سلولی نانوذرات نقره استفاده شد. سوپرناتانت جدا شده کشت باکتری در محیط بافری فسفات و در حضور ۱ گرم در لیتر یون نقره در دستگاه همزن با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۲۰rpm به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. ویژگی نانو ذرات تشکیل شده در محلول واکنش زیست تبدیلی، تحلیل‌های UV، XRD و SEM شد.

شناسایی فنوتیپی و مولکولی سویه باکتری SM8

شناسایی اولیه سویه SM8 براساس مشاهدات ریخت‌شناسی و انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی (رنگ آمیزی گرم، تولید اسید از گلوکز، آزمایش اکسیداز، آزمایش کاتالاز، آزمایش اکسیداتیو- تخمیر (O/F)، آزمایش حرکت، تولید پیگمان و رشد در شرایط بی‌هوازی) انجام شد (۱۷). سپس برای تایید جنس سویه یاد شده از تعیین ترادف ژن 16S rDNA استفاده شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش جوشاندن انجام شد (۱۸). در این روش سوسپانسیونی از کلونی خالص باکتری در یک میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر استریل تهیه و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار داده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه برروی یخ قرار داده و پس از آن در دور g × ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. به دنبال سانتریفیوژ کردن، ۲ میکرولیتر از مایع رویی حاوی DNA به عنوان DNA الگو برای واکنش PCR استفاده شد. تکثیر ژن 16S rDNA به‌وسیله پرایمرهای همگانی:

F۸ (۵-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) و

R۱۵۴۱ (۵-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3)

براساس اطلاعات جداول ۱و ۲ انجام شد. پس از انجام شدن PCR، محصول برروی ژل آگاروز ۱ درصد در شرایط بافری TAE تحت تاثیر ولتاژ ۸۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شد. محصول حاصل از PCR (تقریبا کل ترادف ژنی 16S rDNA) با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR شرکت فرمنتاز، تخلیص و برای تعیین توالی به شرکت فزاپژوه ارسال شد. توالی به دست آمده با استفاده از نرم افزار NCBI BLAST[11]، از نظر میزان تشابه ژنتیکی با سایر گونه‌های باکتری موجود در بانک ژنومی مقایسه شد.

جدول ۱- مواد و مقادیر مورد نیاز برای انجام واکنش PCR در سویه SM8

مواد	حجم لازم برای واکنش با حجم نهایی ۵۰ (میکرولیتر)	غلظت نهایی
بافر PCR ۱۰X	۵	۱X
مخلوط dNTP (۴۰ میلی مولار)	۱	۸۰۰ میکرو مولار
$MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)	۲	۲ میلی‌مولار
پرایمر Forward	۱	۰/۵ میکرو مولار
پرایمر Reverse	۱	۰/۵ میکرو مولار
Taq polymerase (۵ واحد آنزیم در میکرولیتر)	۱	۰/۱ واحد آنزیم
DNA الگو	۲	۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر
آب تزریقی	اضافه نمودن تا حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر	-

جدول ۲- چرخه حراتی واکنش PCR انجام شده برای تعیین جنس

ردیف	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
سیکل اول	۹۵	۲	۱
سیکل دوم	۹۴	۱	۳۰
	۵۵	۱	
	۷۲	۲	
سیکل سوم	۷۲	۱۰	۱

تعیین ویژگی نانو ذرات نقره

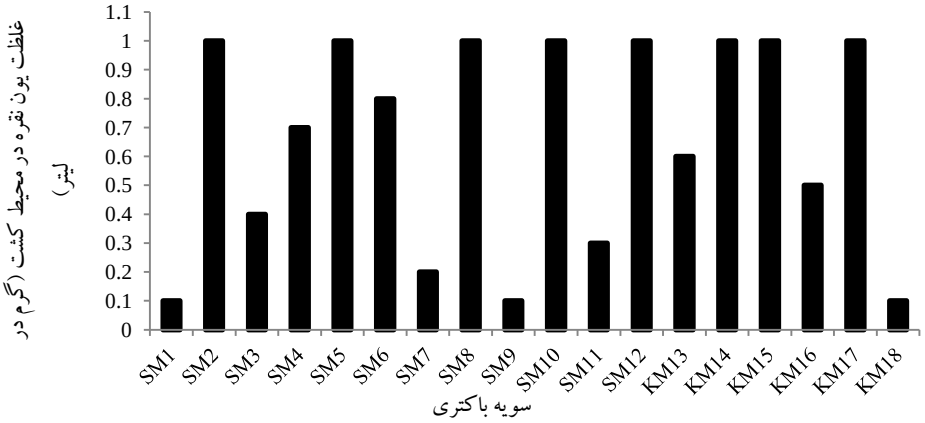
تشکیل نانوذرات نقره در مخلوط واکنش زیست تبدیلی میکروبی با استفاده از مشاهدات چشمی، آزمایش‌های اسپکتروفتومتری UV-vis[۱۲]، تحلیل پراش اشعه ایکس[۱۳] و همچنین، تصویر برداری با میکروسکوپ الکترونی SEM[۱۴] انجام شد. در مرحله اول، تشکیل نانو ذرات با مشاهده تغییر رنگ محلول واکنش حاوی سوپرناتانت کشت باکتری و محلول نیترات نقره ($AgNO_3$) مشخص شد. به منظور تعیین طیف جذبی محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، نمونه‌ها با سرعت ۵۰۰۰×g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس تحلیل‌های XRD و SEM با هدف بررسی وضعیت نانو کریستال‌های تشکیل شده و همچنین، بررسی شکل و اندازه آن‌ها انجام شد.

برای این منظور ابتدا سوپرناتانت عاری از توده زیستی[۱۵] باکتری، از فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد و سپس با هدف رسوب نانو ذرات نقره نمونه‌ها با سرعت g × ۱۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شد. پس از شستشوی رسوب حاصل با آب مقطر دو بار تقطیر استریل، نمونه‌ها در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند.

نتایج

جداسازی سویه‌های باکتری دارای تحمل پذیری بالا به یون نقره

با توجه به سمیت یون نقره بر روی سلول‌های باکتریایی، شناسایی باکتری‌های تحمل پذیر به غلظت‌های بالای یون نقره، قدم اول در جهت انتخاب سویه برتر جهت مطالعات زیست تبدیلی یون نقره به نانوذره نقره است. در این راستا، ۱۸ سویه باکتری از خاک‌های معادن مس و طلا براساس تکنیک غنی‌سازی جدا شدند. تحمل پذیری ذاتی این سویه‌ها نسبت به یون سمی نقره به‌وسیله روش رقت در آگار تعیین شد (شکل ۱).



شکل ۱- الگوی تحمل پذیری به یون نقره در سویه‌های باکتری جدا شده از خاک‌های معادن مس و طلا

از بین ۱۸سویه باکتری که براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی از خاک معادن مس و طلا جداسازی شدند، ۸ سویه باکتری (SM2، SM5، SM8، SM10، SM12، KM14، KM15 و KM17) که بالاترین تحمل پذیری را نسبت به یون سمی نقره از خود نشان دادند انتخاب شده (شکل ۱) و برای بررسی قابلیت احیای یون‌های نقره به نانو ذرات نقره (به‌شکل خارج سلولی) در محیط لوریا برتانی فاقد نمک بررسی شدند.

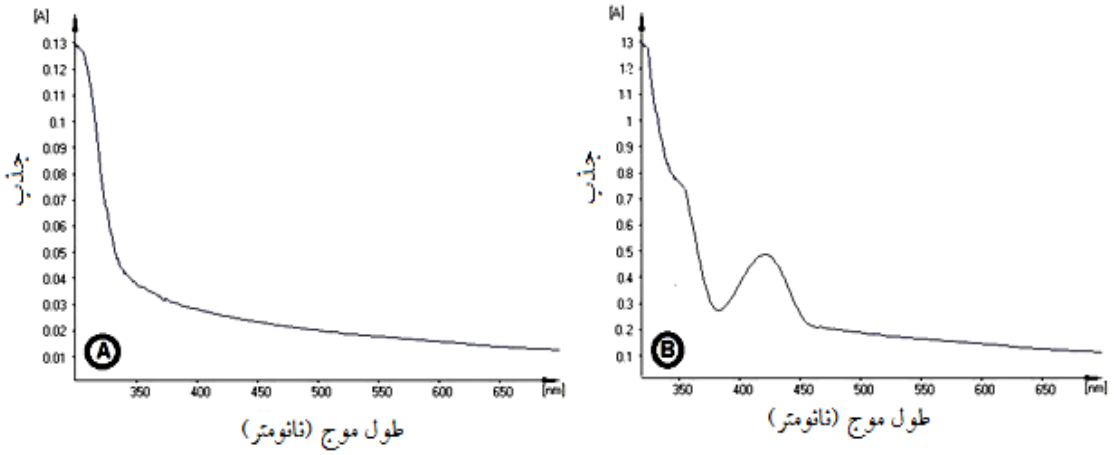
غربال‌گری سویه‌های باکتری با قابلیت سنتز خارج سلولی نانو ذرات نقره

از میان ۸ سویه باکتری با قابلیت تحمل پذیری بالا نسبت به یون سمی نقره، تنها سوپرناتانت کشت سویه SM8، جدا شده از معدن مس سرچشمه کرمان، قادر به احیای خارج سلولی یون‌های نقره به نانوذرات نقره، در غلظت ۱ گرم در لیتر از یون سمی نقره، بود که با ایجاد تغییر رنگ محلول واکنش زیست تبدیلی از سفید به قهوه ای شناسایی شد (شکل ۲- قسمت B). در محلول کنترل (نیترات نقره عاری از سوپرناتانت کشت سویه SM8) هیچ تغییر رنگی در محلول واکنش مشاهده نشد (شکل ۲- قسمت A). باکتری‌هایی که قادر به احیای یون نقره هستند، رنگ محلول نیترات نقره را به شکل ارغوانی، قهوه ایی، زرد و خاکستری تغییر می‌دهند که دلیل ایجاد رنگ‌های متفاوت، مکانیسم‌های متفاوت در احیای زیستی یون‌های نقره به نانو ذرات نقره است که به تولید نانوذرات با ابعاد و اشکال متفاوت منجر شده و در نهایت رنگ‌های مختلفی از نانوذرات ظاهر می‌شود (۱۹).

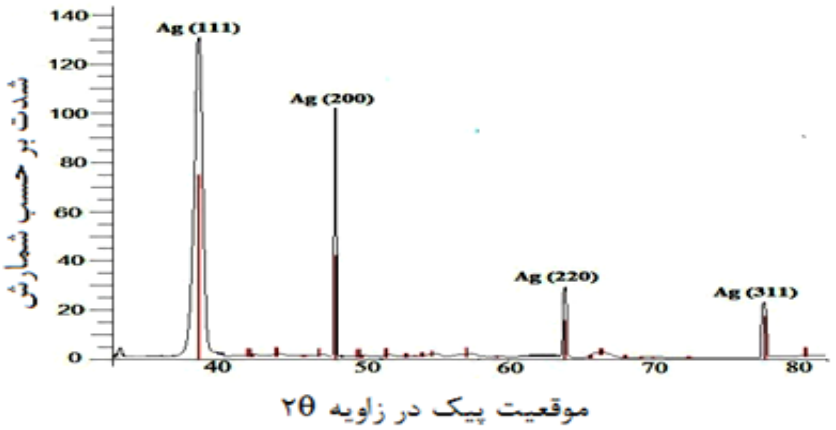
شکل ۲- محلول‌های نیترات نقره (غلظت یون نقره ۱ گرم در لیتر، اسیدیته برابر ۷) ، عاری از سوپرناتانت (قسمت A) و به دنبال اضافه کردن سوپرناتانت کشت سویه SM8 (قسمت B) ، پس از ۴۸ ساعت گرما گذاری در ۲۸ درجه سانتی‌گراد روی همزن مدور (۱۲۰ دور در دقیقه).

تحلیل نمونه‌ها با اسپکتروفتومتری UV-vis، یک پیک جذبی مشخص را در طول موج ۴۳۰ نانومتر (پیک اختصاصی برای نانوذرات نقره) را نشان داد که بیانگر وجود نانوذرات نقره در محلول واکنش زیست تبدیلی است (شکل ۳- B). براساس منابع معتبر، بیشینه پیک جذبی نانوذرات نقره در طول موج‌های ۴۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر است (۲۰). در محلول کنترل (عاری از سوپرناتانت کشت باکتری)، در طول موج‌های بین ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر هیچ پیک جذبی مشاهده نشد (شکل ۳- A).

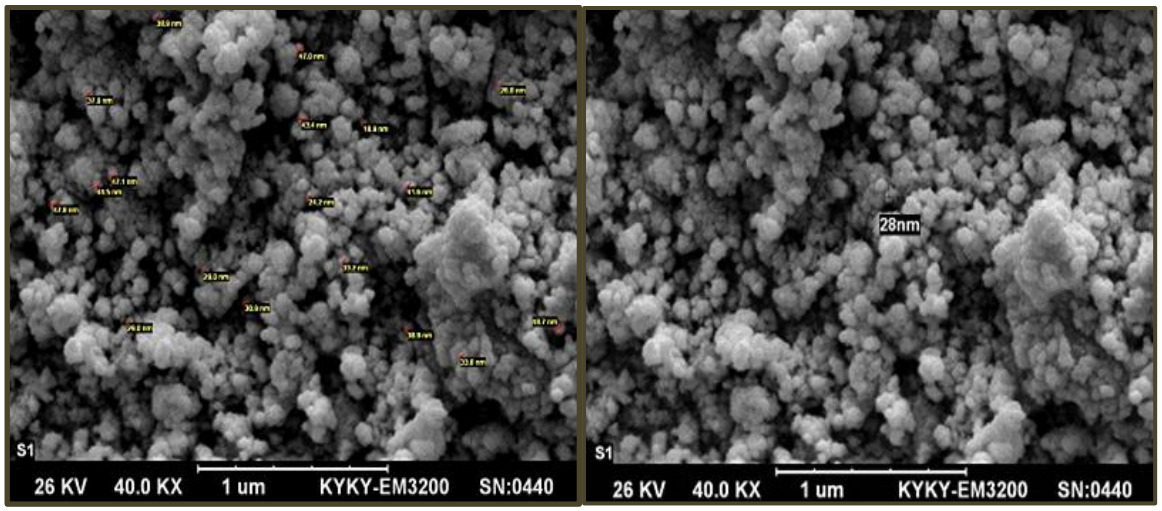
در ادامه این پژوهش، تحلیل XRD به منظور اثبات نانوکریستال‌های فلزی نقره انجام شد. براساس نتایج به دست آمده که در شکل (۴) نشان داده شده است، نانوذرات کریستالی نقره در سطوح ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰ و ۳۱۱ به ترتیب پیک‌های با مقادیر $۳۸/۲^{o}$، $۴۶/۴^{o}$، $۶۴/۶^{o}$ و $۷۷/۶^{o}$ را نشان داد که با نمونه استاندارد نانوکریستال‌های نقره کاملا همخوانی دارد (۲۱).



شکل ۳- طیف‌های اسپکتروفتومتری محلول‌های نیترات نقره (غلظت یون نقره ۱ گرم در لیتر، اسیدیته برابر ۷) ، عاری از سوپرناتانت (A) و به دنبال اضافه کردن سوپرناتانت کشت سویه SM8 (B) ، پس از ۴۸ ساعت گرما گذاری در ۲۸ درجه سانتی‌گراد روی همزن مدور (۱۲۰ دور در دقیقه).



شکل ۴- تحلیل پراش اشعه ایکس (XRD) نانو ذرات سنتز شده توسط سویه SM8

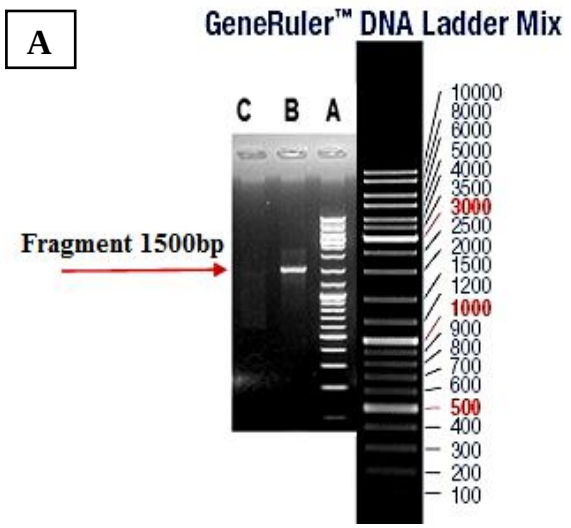


شکل ۵- میکروگراف‌های SEM حاصل از نانوذرات نقره سنتز شده توسط سویه باکتری SM8

تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی SEM نیز سنتز نانوذرات نقره با ابعاد ۲۰ تا ۵۰ نانومتر و اشکال کروی را نشان داد (شکل ۵). پس از قطعی شدن توانایی تولید نانوذرات نقره توسط سویه SM8، شناسایی سویه منتخب با استفاده از روش‌های فنوتیپی و مولکولی انجام شد.

شناسایی مولکولی سویه باکتری**SM8**

به دنبال شناسایی اولیه براساس مشاهدات ریخت‌شناسی و آزمایش‌های بیوشیمیایی اولیه، برای شناسایی دقیق سویه SM8، به استخراج DNA ژنومی و تکثیر ژن ۱۶S rDNA با استفاده از پرایمرهای همگانی F۸ و R۱۵۴۱ اقدام کردیم. همان‌گونه که در شکل (۶-A) مشاهده می‌شود، محصول PCR در ناحیه ۱/۵کیلو بازی نمایان شده است که حکایت از خلوص DNA استفاده شده برای تعیین توالی دارد. پس از مشخص شدن توالی ژن ۱۶S rDNA سویه یاد شده (شکل ۶- B) و بلاست نمودن آن در سایت اینترنتی NCBI، باکتری مورد نظر شناسایی شده و در جنس *Ralstonia* sp. قرار گرفته است. براساس نتایج حاصل از بلاست (جدول ۳) این سویه دارای مشابهت ۹۹ درصدی با سویه‌های جنس *Ralstonia* sp. است.



B

AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCA
TGATCTAGCTTGCTAGATTGATGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAG
TGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAGTGGGGGACGGC
AAGGCCTCATGCTATAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGC
GACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCACACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGA
AGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCGCACTTACAAATATTAGGTGTGGA
TGACGGTACCGGAAGAATAAGGACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCA
AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTGTGCAAGACCGATGTGAAATCCCC
GGGCTTAACCTGGGAATTGCATTGGTGACTGCACGGCTAGAGTGTGTCAGAGGGGGGTAGAATTCCAC
GTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGATAACA
CTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAA
CGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGG
GGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTG
CATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCAT
TAGGTGCTCGAAAGAGAAAGTGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCTAGTTGCTACGAAAGGGCACTCTAGAGAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCA
CACGTCATACAATGGTGCATACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAATGCA
TCGTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTACGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC
ATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCC
AGAAGTAGTTAGCCTAACCGCAAGGGGGGCGATTACCACGGCAGGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCG
TAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCT

شکل۶- (A) الکتروفورز محصول PCR ژنوم باکتریA: DNA. SM8 نشانگر، B: سویه باکتری SM8 تولید کننده نانوذره نقره، C: کنترل منفی. B): توالی نوکلئوتیدی ژن ۱۶S rDNA سویه باکتری SM8.

جدول ۳- نتایج حاصل از بلاست کردن سویه باکتری SM8 در سایت اینترنتی NCBI.

میکروارگانیسم	Max score	Total score	Query cover (درصد)	E value	Max identity (درصد)	شماره دسترسی
Ralstonia sp. NT80	۲۷۳۶	۲۷۳۶	۱۰۰	۰/۰	۹۹	AB740040
Ralstonia sp. H13.	۲۶۶۶	۲۶۶۶	۹۷	۰/۰	۹۹	EF554889
Ralstonia sp. EF1.	۲۶۶۴	۲۶۶۴	۹۷	۰/۰	۹۹	EF554880
Ralstonia sp. EF28	۲۶۶۳	۲۶۶۳	۹۷	۰/۰	۹۹	EF554881
Ralstonia picketti 12D	۲۶۵۰	۵۳۰۰	۱۰۰	۰/۰	۹۸	CP001644
Ralstonia detusculanense	۲۶۴۸	۲۶۴۸	۹۹	۰/۰	۹۸	AF280433

بحث و نتیجه‌گیری

جذابیت استفاده از میکروارگانیسم‌ها درتولید نانوذرات فلزی به علت تمیزی وسازگاری بسیار بالا با محیط زیست، توزیع مناسب و یکنواخت ذرات تولید شده، پایداری بالا، انعطاف پذیری بیشتر، انتشار نور بهتر و آسانی تولید است. در دو دهه اخیر غربال‌گری‌های میکروبی زیادی برای تولید زیستی نانوذرات به علت خواص ویژه نوری، شیمیایی، الکتریکی و فوتوالکتریکی آن‌ها انجام شده است که موید استفاده‌های گوناگون این مواد در زمینه‌هایی چون کاتالیست‌ها، اپتیک، دانش داروهای زیستی، مکانیک، مغناطیس و انرژی است (۳). سنتز زیستی نانوذرات نقره یک دستاورد علمی از علم فناوری نانو است که در عرصه‌های مختلف علوم پزشکی و صنایع مختلف از جمله غذایی، آرایشی و بهداشتی، دامپروری و کشاورزی کاربردهای فراوان دارد (۴). اساسا برای این‌که فرآیندهای میکروبی قابلیت صنعتی شدن پیدا کنند باید کم هزینه، 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. مطالعه اخیر در راستای جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتری بومی با پتانسیل سنتز خارج سلولی نانو ذرات نقره انجام شد. در این پژوهش، ۱۸ سویه باکتری تحمل پذیر نسبت به یون سمی نقره، از نمونه‌های مختلف خاک جمع آوری از معادن مس و طلا در مناطق مختلف ایران جداسازی شدند. سویه‌های جدا شده از نظر تحمل پذیری بالا ارزیابی شدند. براساس یافته‌های به دست آمده ۸ سویه دارای بیشترین تحمل پذیری (بالاتر از ۱ گرم در لیتر) نسبت به یون سمی نقره بودند (شکل ۱). در ادامه این تحقیق، تولید زیستی نانو ذرات نقره به‌شکل خارج سلولی در ۸ سویه با تحمل پذیری بالا نسبت به یون نقره ارزیابی شد. براساس یافته‌های به دست آمده، تنها سوپرناتانت سویه SM8 جدا شده از معدن مس سرچشمه کرمان، قادر به تولید زیستی نانو ذرات نقره بود. سویه یاد شده براساس ویژگی‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و فیلوژنیکی تحت عنوان *Ralstonia* sp. SM8 شناسایی شد. سویه SM8 میله ای شکل، گرم منفی، شدیدا هوازی، اکسیداز و کاتالاز مثبت و متحرک بوده و دارای مشابهت بیش از ۹۹ درصدی با سویه‌های ثبت شده در جنس *Ralstonia* sp. بود. توالی نوکلئوتیدی ژن ۱۶S rDNA سویه SM8 با شماره دسترسی[۱۶]

KF264453 در بانک جهانی اطلاعات ژنی[17] قابل دسترسی است. اگرچه سنتز زیستی نانو ذرات نقره در انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌ها از قبیل کپک‌های رشته ای، مخمرها و باکتری‌ها گزارش شده است. با این حال به جز چند استثنا، درسایر مطالعات انجام شده تولید نانو ذرات یاد شده به شکل داخل سلولی گزارش شده است. از میان نانوذرات فلزی تولید شده با استفاده از میکروارگانیسم‌های مختلف، نانو ذره فلزی نقره از مهم‌ترین نانو فلزاتی است که بیشترین تحقیقات را در این زمینه به خود اختصاص داده است. در یکی از تحقیقات انجام شده درباره سنتز نانو ذرات نقره، از کشت باکتری *Bacillus* sp.، برای احیای یون‌های یک ظرفیتی نقره از یک محلول نیتراتی به منظور دستیابی به نانو ذرات ۵ تا ۱۵ نانومتری، در دما و فشار محیط استفاده شده است (۱۱). *Shewanella algae*، باکتری احیاء کننده آهن Fe (III) ، نیز در محیط بی هوازی و در حضور گاز هیدروژن قادر به احیای یون‌های نقره و طلا و ایجاد نانو ذرات ۱۰ تا ۲۰ نانومتری است (۲۲). *Pseudomonas stutzeri* AG259، قادر است که نانوذرات نقره با اندازه ۳۵ تا ۴۶ نانومتری را در دیواره خود از محیط سولفیدی بازیابی کند (۲۳). باکتری‌های لاکتیک اسید موجود در آب پنیر و شیر که تحمل غلظت بالای یون‌های فلزی را ندارند نیز قادر به احیای یون‌های طلا و نقره و ایجاد نانوذرات مربوطه به‌شکل داخل سلولی هستند (۸). اگرچه چندین سال است که از مخمرها برای تولید نانو ذرات به‌شکل داخل سلولی استفاده می‌شود، ولی در پژوهش‌های اخیر نانوذرات نقره به‌شکل خارج سلولی و با استفاده از سویه مخمر MKY3 با ابعاد دو تا پنج نانومتر در مرحله رشد لگاریتمی، هنگام تقابل با نیترات نقره تولید شده است (۲۴). در سال‌های اخیر کپک‌های رشته ای نیز به فهرست میکروارگانیسم‌های استفاده شده در تولید نانوذرات فلزی اضافه شده است. جذابیت استفاده از قارچ‌ها در تولید نانوذرات به علت وجود مقادیر قابل ملاحظه ای از آنزیم‌ها و پروتئین‌های ویژه در این میکروارگانیسم‌ها، سهولت کار با آن‌ها در آزمایشگاه، سهولت دسترسی به مقادیر زیادی توده زیستی سلولی و شاید از همه مهمتر فرآیند پایین دستی ساده‌تر است. با این حال دستکاری ژنتیکی این ارگانیسم‌های یوکاریوتی در مقایسه با پروکاریوت‌ها بسیار دشوارتر است. از میان قارچ‌های تولید کننده نانوذرات فلزی نقره سه جنس *Verticillium*، *Aspergillus* و *Fusarium* بسیار مطالعه شده‌اند (۳ و ۲۵– ۲۷). در یکی از جدیدترین تحقیقات انجام شده در ارتباط با تولید خارج سلولی نانو ذرات نقره با استفاده از سویه‌های باکتری، نتایج تحقیقات فخری و همکارانش[18] (۱۵) نشان داد که سوپرناتانت کشت باکتری *Streptomyces* sp. ERI-3، پس از مواجهه با محلول نیتراتی نقره، قادر به سنتز نانوذرات نقره در ابعاد ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بوده است. با این وجود استفاده از سویه‌های استرپتومیستی، با توجه به رشد کمابیش پایین، نیازمندی‌های غذایی کمابیش پیچیده و از همه مهمتر با توجه به رشته ایی بودن که باعث بروز مشکلات جدی در فرآیندهای پایین دستی و افزایش نرخ این فرآیندها می‌شود، تا حدود بسیار زیادی در فرآیندهای صنعتی محدود شده است. با وجود اهمیت تولید زیستی نانوذرات نقره و با وجود مطالعات وسیع در این ارتباط، مطالعات بسیار کمی در سطح

کشور انجام شده و مطالعه حاضر می‌تواند سهمی در معرفی سویه‌های بومی جدید با پتانسیل تولید خارج سلولی نانوذرات نقره در مجامع ملی و بین المللی داشته باشد. مزیت سنتز خارج سلولی نانو ذره نقره توسط باکتری *Ralstonia* sp. SM8 جدا شده در تحقیق حاضر در این است که تولید داخل سلولی نانو ذره یاد شده پر هزینه بوده و نیاز به مراحل اضافی برای استخراج نانو ذرات از درون سلول دارد (۲۸). بنابراین، به‌وسیله باکتری *Ralstonia* sp. SM8 می‌توان به تولید خارج سلولی نانو ذرات نقره، بدون نیاز به مراحل پیچیده استخراج، دست یافت. امید است با بهینه‌سازی شرایط واکنش زیست تبدیلی *Ralstonia* sp. SM8 و محلول $AgNO_3$، از نظر دما، اسیدیته، مدت زمان گرماگذاری، غلظت اولیه یون سمی نقره، غلظت اولیه سوپرناتانت عاری از کشت باکتری و سایر شاخص‌های مربوطه، در آینده از سویه بومی جدا شده در این پژوهش، به‌عنوان یک زیست واکنشگر موثر و کارآمد در احیای میکروبی محلول نیترات نقره به نانوذرات فلزی نقره به‌شکل خارج سلولی در مقیاس صنعتی بهره برداری کرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح پژوهشی به شناسه ۴/۴۲۳۷۷/۱۳۹۱ با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان انجام شده است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine*: *NBM* 2009; 6(2): 257-62.

(2) Salata OV. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotech* 2004; 2(3): 1-6.

(3) Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv Colloid Interface Sci* 2010; 156(1-2): 1-13.

(4) Souza GIH, Marcato PD, Durán N, Esposito E. Utilization of *Fusarium oxysporum* in the biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activities**.** In *IX National Meeting of Environmental Microbiology*; Curtiba, PR (Brazil); 2004; Abstract pag. 25.

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

(6) Klaus T, Joerger R, Olsson E, Granqvist CG. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(24): 13611–4.

(7) Zhang H, Li Q, Lu Y, Sun D, Lin X, Deng X, et al. Biosorption and bioreduction of diamine silver complex by *Corynebacterium*. *J Chem Technol Biotechnol* 2005; 80(3): 285–90.

(8) Nair B, Pradeep T. Coalescence of nanoclusters and formation of submicron crystallites assisted by *Lactobacillus* strains. *Cryst Growth Des* 2002; 2(4): 293-8.

(9) Mouxing FU, Qingbiao LI, Daohua SUN, Yinghua LU, Ning HE, Xu DENG, et al. Rapid preparation process of silver nanoparticles by bioreduction and their characterizations. *Chinese J Chem Eng* 2006; 14(1): 114-7.

(10) Barud HS, Barrios C, Regiani T, Marques RFC, Verelst M, Dexpert-Ghys J, et al. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. *Mat Sci Eng C* 2008; 28(4): 515-8.

(11) Pugazhenthiran N, Anandann S, Kathiravan G, Kanna- ian N, Prakash U, Crawford S, et al. Microbial synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus* sp. *J Nanopart Res* 2009; 11(7): 1811-5.

(12) Parikh RP, Singh S, Prasad BLV, Patole MS, Sastry M, Shouche YS. Extracellular synthesis of crystalline silver nanoparticles and molecular evidence of silver resistance from *Morganella* sp.: towards understanding biochemical synthesis mechanism. *Chem biochem* 2008; 9(9): 1415-22.

(13) (13) Lengke MF, Fleet ME, Southam G. Biosynthesis of silver nanoparticles by filamentous cyanobacteria from silver (I) nitrate complex. *Langmuir* 2007; 23(5): 2694–9.

(14) Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine* 2007; 3(2): 168-71.

(15) Faghri ZN, Salouti M. Extracelluar biosynthesis of silver nanoparticles using cell filtrate of *Streptomyces* sp. ERI-3. *Scientia Iranica* 2011; 18(6): 1631-5.

(16) Washington JA, Sutter VL. Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution procedures. In: Lennette EH, Balows A, Hausler JR, WJTruant, J.(Eds.) , Manual of Clinical Microbiology, 3 rd ed., Washington *DC*; American Society for Microbiology; 1980.

(17) Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey ' s manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore, Maryland**;** Williams and Wilkins; 1994.

(18) Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(1): 290-6.

(19) Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 2004; 275(1): 177-82.

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

(21) Magudapathy P, Gangopadhyay P, Panigrahi BK, Nair KGM, Dhara S. Electrical transport studies of Ag nanocrystallites embedded in glass matrix. *Physics B* 2001; 299(1-2): 142-6.

(22) Konishi Y, Nomura T, Tsukiyama T, Saitoh N. Microbial preparation of gold nanoparticles by anaerobic bacterium. *Trans Mater Res Soc Jpn* 2004; 29(5): 2341–3.

(23) Slawson RM, Vandyke MI, Lee H, Trevor JT. Germanium and silver resistance, accumulation and toxicity in microorganisms. *Plasmid* 1992; 27(1): 72–9.

(24) Kowshik M, Ashtaputre S, Kharrazi S, Vogel W, Urban J, Kulkarni S, et al. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver - tolerant yeast strain MKY3. *Nanotechnology* 2003; 14(1): 95-100.

(25) Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Khan MI, Kumar R, et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Coll Surf B* 2003; 28(4): 313–8.

(26) Bhainsa KC, D'Souza SF. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticle using the fungus *Aspergillus fumigates*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006; 47(2): 160-4.

(27) Khosravi A, Shojaosadati SA. Evaluation of silver nanoparticles produced by fungus *Fusarium oxysporum*. *Int J Nanothechnol* 2009*;* 6(10-11): 973-83.

(28) Ahmad A, Senapati S, Islam Khan M, Kumar R, Ramani R, Srinivas V, et al. Intracelluar synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* sp. *Nanotechnology* 2003; 14(7): 824-8.

---

[1]. Technology
[2]. Monodispersity
[3]. Biocatalyst
[4]. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
[5]. E. Merck, Darmstadt, Germany
[6]. Luria Bertani
[7]. Agar dilution method
[8]. Plates
[9]. Sampler
[10]. Shaker
[11]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/blast
[12]. Analytik Jena's spectrophotometer SPECORD 210, Carel Zeiss Technology, Germany
[13]. X-ray Diffractometer, D8ADVANCE, Bruker, Germany
[14]. KYKY-EM3200, KYKY Technology Development Ltd. , China
[15]. Biomass
[16]. Accession number
[17]. NCBI
[18]. Faghri et al

Extracellular Synthesis of Silver Nanoparticles by *Ralstonia* sp. SM8 Isolated from the Sarcheshmeh Copper Mine

Morahem Ashengroph *
Assistant Professor of Microbiology, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, m.ashengroph@uok.ac.ir

Abstract

Introduction: The biological synthesis of nanoparticles has gained enormous importance due to the development of clean and environmentally-friendly processes. Silver is highly toxic to microbial cells, Nevertheless, it has been reported that several microorganisms are silver resistance and corroborate the microbial reduction of water soluble Ag^+ to Ag^0 nanoparticles. In this study, native strains of bacteria screen for use as biocatalysts for extracellular synthesis of silver nanoparticles.

Materials and methods: Eight different strains of bacteria exhibiting high silver tolerance were isolated from collecting soil samples from copper and gold mines and characterized using morphological observations and preliminary biochemical tests. The bacterial strains in the presence of 1 g/l Ag^+ solution at pH 7 were incubated at 28º C for 48 h in an orbital shaker. The silver nanoparticles formation was investigated by visual observations (changing the color of the reaction solution), spectroscopic techniques and microscopic observations.

Results: Among the 8 strains giving high Ag^+ tolerance, the strain SM8, isolated from the Sarcheshmeh Copper Mine, Kerman, showed the capability of promoting the formation extracellular Ag nanoparticles. The strain was selected and identified as *Ralstonia* sp. SM8 (GenBank accession number KF264453) based on morphological and biochemical characteristics and its molecular phylogenetic analysis. Results obtained by visual observations, spectral data achieved from UV–vis, XRD spectrum and SEM micrographs revealed the extracellular formation of spherical silver nanoparticles in the size range of 20-50 nm with the culture supernatants of *Ralstonia* sp. SM8.

Discussion and conclusion: Based on the results obtained, fast and extracellular synthesis of silver nanoparticles, without the need for complicated extraction steps, can be taken by using the culture supernatants of *Ralstonia* sp. SM8. The current study is the first report on the biological synthesis of Ag nanoparticles using genus of *Ralstonia*.

Key words: Silver nanoparticles, Biological synthesis, *Ralstonia* sp. SM8

* Corresponding author
Received: July 27, 2013 / **Accepted:** November 6, 2013