

Investigating Green Synthesis of Copper Nanoparticles using the Bacterium *Pseudomonas Grimontii*, their Characterization, and Antibacterial Activity

Morahem Ashengroph*

Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, m.ashengroph@uok.ac.ir

Musa Muhtasam Zorab

Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, mrhashengroph@gmail.com

Abstract

Introduction: Copper nanoparticles (CuNPs) are used in various industries, including pharmaceutical and biomedical sciences, agricultural and food chemistry, electronics and environmental applications, due to their novel optical, chemical, photoelectrochemical, and electronic properties as well as antimicrobial activities. The aim of the present study was to evaluate the ability of endophytic bacteria to synthesize CuNPs.

Materials and Methods: Eighteen endophytic bacteria (CN1-CN18) were isolated from the root and crown rot of the bean. The agar dilution method was used to determine the intrinsic tolerance of endophytic bacterial isolates to copper ions. Characterization of CuNPs was performed using different methods including ultraviolet–visible spectroscopy (UV–Vis), field emission scanning electron microscope (FE-SEM), Fourier transform infrared (FTIR), X-ray energy diffraction spectroscopy (EDS), and powder X-ray diffraction (XRD). The antimicrobial activity of the copper nanoparticles was investigated by the agar well diffusion method.

Results: The results of the study indicated that isolate CN10 was able to reduce CuCl₂ to CuNPs. Based on the obtained phenotypic data and 16s rDNA sequence analysis (similarity above 99%), the isolate was identified as *Pseudomonas grimontii*. Additionally, spherical CuNPs with an average size of 24.8 nm were synthesized by resting cells of strain CN10 under 3 mM of copper chloride, pH 7.0, agitation 100 rpm, and 96 hours of incubation. The results of antimicrobial tests showed that the produced CuNPs exhibited the highest inhibitory effects on *Xanthomonas campestris* (19.2 mm) and the lowest inhibitory effects on *Staphylococcus aureus* (9.4 mm).

Discussion and Conclusion: The current study is the first report on the synthesis of CuNPs using a resting cell of *Pseudomonas grimontii*. The results suggested the synthesis of CuNPs using endophytic bacteria as a promising tool for the production of CuNPs in a controlled shape and size.

Key words: Endophytic Isolates, Copper Nanoparticles, Resting Cell, Spectroscopy, Antibacterial Properties

* Corresponding author

Received: April 17, 2021 / **Accepted:** May 19, 2021

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)

سال یازدهم، شماره ۴۱، بهار ۱۴۰۱، صفحه ۷۹ - ۶۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۰۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۹

Doi: [10.22108/BJM.2021.127918.1373](https://doi.org/10.22108/BJM.2021.127918.1373)

سنتر سبز نانوذرات مس توسط باکتری سودوموناس گرمونتی و تعیین ویژگی و فعالیت ضدباکتریایی آن

مراحیم آشنگروف*: دانشیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، m.ashengroph@uok.ac.ir
موسی معتمد زوراب: کارشناس ارشد گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، mrhashengroph@gmail.com

چکیده

مقدمه: نانوذرات مس با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد نوری، شیمیایی، فوتوالکتروشیمیایی، الکترونیکی و خواص ضد میکروبی، گزینه مناسبی برای کاربرد در صنایع مختلف شامل داروسازی، زیست پزشکی، الکترونیک، کشاورزی، غذایی و محیطی محسوب می‌شوند. هدف از پژوهش اخیر بررسی قابلیت باکتری‌های اندوفیت در سنتر نانوذرات مس بود.

مواد و روش‌ها: ۱۸ جدایه باکتری (نام گذاری شده با نام CNI-CN18) از ریشه و طوقه گیاه لوبیا جداسازی شدند. روش رقت در آگار برای تعیین الگوی تحمل پذیری ذاتی جدایه‌های باکتری اندوفیت نسبت به یون مس استفاده شد. تعیین ویژگی نانوذرات از طریق مشخصه‌یابی‌های طیف‌سنجی مرئی ماورای بنفش، تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی، طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس، آزمون پراش اشعه ایکس و طیف‌سنجی مادون قرمز فوریه انجام شد. فعالیت ضد میکروبی نانوذرات مس سنتزی به روش انتشار از چاهک بر سطح آگار بررسی شد.

نتایج: جدایه باکتری CN10 قادر به احیای کلرید مس به نانوذرات مس بود. براساس نتایج فنوتیپی و آنالیز توالی 16S rDNA (شبهات بالای ۹۹ درصدی)، جدایه مذکور با نام سودوموناس گرمونتی شناسایی شد. سوئیچ مدنظر پس از مواجهه با محلول کلرید مس (غلظت بهینه ۳ میلی مولار) قادر به سنتر نانوذرات مس کروی با میانگین اندازه ۲۴/۸ نانومتر در pH ۷ پس از ۹۶ ساعت گرماگذاری در شیکر انکوباتور با ۱۰۰ دور در دقیقه است. براساس نتایج تست‌های ضد میکروبی، بیشترین اثر بازدارندگی نانوذرات مذکور بر زانتوموناس کامپستریس با میانگین مهارکنندگی ۱۹/۲ میلی متر و کمترین میزان مهارکنندگی مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس با میانگین مهارکنندگی ۹/۴ میلی متر بود.

بحث و نتیجه‌گیری: این نخستین گزارش از سنتر نانوذرات مس توسط سلول در حال استراحت سودوموناس گرمونتی است. استفاده از باکتری‌های اندوفیت، در سنتر نانوذرات به عنوان نانوکارخانه‌های دست‌نخورده، ابزاری امیدوارکننده برای تولید زیستی نانوذرات مس در شکل و اندازه کنترل شده پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی: جدایه‌های اندوفیت، نانوذرات مس، سلول در حال استراحت، طیف‌سنجی، خواص ضدباکتری

* نویسنده مسئول مکاتبات



مقدمه

مس یک عنصر شیمیایی با نماد Cu با عدد اتمی ۲۹ است که در گروه ۱۱ جدول تناوبی قرار می‌گیرد. از خواص این فلز می‌توان به شکل پذیری، چکش‌خواری و رسانایی حرارتی و الکتریکی بالا اشاره کرد. از رنگ‌های حاوی این فلز برای بدنه قایق‌ها در حدود دو قرن استفاده می‌شد تا رشد گیاهان و جانوران دریایی روی بدنه این قایق‌ها کنترل شود. همچنین این فلز را در کشاورزی برای آفت‌کشی و تأمین مواد مغذی خاک به کار می‌گیرند. مس یک ماده معدنی ضروری برای اندام‌های زنده است؛ زیرا سهمی کلیدی در ساخت آنزیم تنفسی سیتوکروم اکسیداز C دارد (۱). در میان نانوذرات فلزی، نانوذرات عنصری مس به دلیل خواصشان کاربردهای زیادی در زمینه‌های مختلف از جمله کاتالیست‌ها، نگه‌دارنده چوب، حسگر گاز، روان‌کننده، نانوسیال، انتقال حرارتی، پوشش نانوکامپوزیتی و صنعت رنگرزی الیاف دارند (۲). در سالیان متمادی مس به دلیل داشتن خواص ضدباکتریایی و ضدویروسی به‌عنوان یک ترکیب ضدعفونی‌کننده استفاده شده است. به‌علت میزان بالای نسبت سطح به حجم، نانوذرات مس دارای خواص ضد میکروبی بسیار بالا هستند (۳). پیدا کردن فنون تولید مناسب در نانوفناوری موضوعی است که در چند سال اخیر به شدت درخور توجه پژوهشگران و دانشمندان بوده است. روش‌های فیزیکوشیمیایی مختلفی شامل فرزکاری شیمیایی^۲، سایش لیزری^۳، ذوب مکانیکی^۴، کندوپاش^۵، سل - ژل^۶، احیای شیمیایی و الکتروشیمیایی و همچنین آذرکافت^۷ برای تهیه مواد نانو ساختار با دو رویکرد بالا به پایین^۸ و پایین به بالا^۹ وجود دارند (۴). با وجود این، تولید فیزیکوشیمیایی نانوذرات علاوه بر هزینه‌های بالا،

آلودگی ناشی از مواد شیمیایی به کار گرفته شده و تولید فرآورده‌های جانبی خطرناک را به دنبال دارد؛ در نتیجه، همین موضوع کاربرد زیست پزشکی نانوذرات تولیدی مذکور را محدود کرده است؛ بنابراین، توسعه روش‌های قابل اعتماد، غیرسمی و سازگار با محیط زیست برای ساخت نانوذرات بسیار اهمیت دارد (۵). یکی از گزینه‌های پیش رو برای رسیدن به این هدف استفاده از روش‌های زیستی برای تولید نانوذرات است. در روش زیستی از میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و عصاره‌های گیاهی برای ساخت نانوذرات استفاده می‌شود. توسعه این روش‌های زیست‌سازگارانه برای ساخت نانوذرات بسیار مفید است. سنتز سبز، همانند روش کاهش شیمیایی، یک روش پایین به بالا است؛ البته با این تفاوت که در روش سنتز سبز عامل کاهش‌دهنده شیمیایی گران‌قیمت و بعضاً سمی با متابولیت‌های میکروبی یا عصاره‌های گیاهی برای سنتز نانوذرات اکسید فلزی یا فلزی جایگزین می‌شود. منابع زیستی پتانسیل بسیار زیادی برای تولید نانوذرات دارند؛ زیرا بدون استفاده از مواد شیمیایی سمی و گران‌قیمت فرایند احیا را انجام می‌دهند و به همین دلیل توجه بسیاری از محققان را به خود معطوف کرده‌اند (۶). طیف وسیعی از منابع زیستی شامل انواع پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها برای سنتز زیستی نانوذرات مختلف مانند طلا، نقره، مس، پلاتین، آهن و روی استفاده شده‌اند (۷). سیستم‌های میکروبی می‌توانند یون‌های فلزی را با کاهش یا رسوب یون‌های معدنی سمی محلول به نانو ساختارهای غیرسمی فلزی سمیت‌زدایی کنند. سم‌زدایی میکروبی با معدنی کردن خارج سلولی، رسوب یا ذخیره‌سازی داخل سلولی انجام می‌شود (۸). سالوادوری^{۱۰} و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند زیست‌توده

قارچ هایپوکریالیکیسی^{۱۱}، بعد از مواجهه با محلول کلرید مس، قادر به سنتز نانوذرات مس در شرایط بهینه شده از نظر دما، pH، غلظت اولیه یون مس و دور شیکر بوده است (۹). شانتکریتی^{۱۲} و رانی^{۱۳} (۲۰۱۴) با استفاده از سوپرناتانت عاری از کشت باکتری سودوموناس فلورسنس^{۱۴} موفق به تولید نانوذرات کروی مس به صورت برون سلولی با میانگین اندازه ۴۹ نانومتر در pH طبیعی و در مواجهه با محلول سولفات مس در غلظت ۳۱۸ میلی گرم در لیتر شدند (۱۰). تیواری^{۱۵} و همکاران (۲۰۱۶) با استفاده از سویه باکتری مقاوم به یون مس با نام باسیلوس سرئوس سویه SWSD1^{۱۶}، موفق به سنتز سبز نانوذرات مس در دامنه پراکنش ۱۱ تا ۳۳ نانومتر در مواجهه با محلول سولفات مس در غلظت ۱۰ میلی مولار شدند (۱۱). نابیلا^{۱۷} و کانایران^{۱۸} (۲۰۱۸) با استفاده از جدایه اکتینومیستی با نام VITBN4 موفق به سنتز نانوذرات اکسید مس با میانگین اندازه ذرات ۶۱/۷ نانومتر در مواجهه با نمک سولفات مس در غلظت نهایی ۱۰ میلی مولار شدند (۱۲). در جدیدترین مطالعه نومان^{۱۹} و همکاران (۲۰۲۰) یک سویه باکتری مقاوم به یون مس از جنس /شیریشیا^{۲۰} با نام SINT7 با قابلیت سنتز نانوذرات مس در دامنه پراکنش ۲۲/۳۳ تا ۳۹ نانومتر و میانگین اندازه ۲۸/۵۵ نانومتر جداسازی و تعیین ویژگی شد (۱۳). در دو دهه اخیر غربالگری های میکروبی زیادی برای تولید زیستی نانوذرات فلزی به دلیل خواص ویژه نوری، شیمیایی، الکتریکی و فوتوالکتریکی آنها صورت گرفته است که نشان دهنده کاربردهای متنوع این مواد در حوزه هایی همچون اپتیک، زیست واکنشگرها، داروهای زیستی، مکانیک، مغناطیس و انرژی است. اصولاً برای اینکه فرایندهای میکروبی قابلیت صنعتی شدن داشته باشند باید کم هزینه و دارای

سرعت تولید بالا و عملیات پیوسته باشند که در این راستا غربالگری سویه های میکروبی جدید برای رسیدن به این هدف از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۱۴). با توجه به مزایای استفاده از سویه های باکتریایی (توانایی بالا در سازگاری با شرایط محیطی، رشد سریع و کشت آسان) برای تولید صنعتی نانوذرات در این مطالعه، پتانسیل سویه های باکتریایی اندوفیت به عنوان زیست کاتالیزگر^{۲۱} در احیای زیستی نمک کلرید مس به نانوذرات مس بررسی شد.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی و محیط های کشت استفاده شده:

نمک کلرید مس دو آب (CuCl₂.2H₂O) با خلوص بالای ۹۹ درصد برای آزمایشات سنتز زیستی نانوذرات مس از شرکت سیگما - آلد ریچ آمریکا^{۲۲} خریداری شد. آگار، اسید هیدروکلریک، هیدروکسید سدیم و آب اکسیژنه از شرکت مرک آلمان^{۲۳} خریداری شدند. دیسک اکسیداز (ترا متیل پی فنیلین دی آمین دی هیدروکلراید) از شرکت پادتن طب ایران تهیه شد. کیت رنگ آمیزی گرم از تالیژن پارس ایران تهیه شد. قندهای گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز، آرابینوز، سوکروز از کیولب انگلستان^{۲۴} خریداری شدند. ال-هیستدین، ال-تریپتوفان و تریپتامین از مرک خریداری شدند. محیط های کشت نوترینت آگار، نوترینت براث و محیط کشت آگار زرده تخم مرغ^{۲۵} از هایمدیا هند^{۲۶} خریداری شدند. محیط کشت مولر هینتون آگار^{۲۷} از مرک خریداری شد. کیت استخراج DNA از شرکت متابیون آلمان^{۲۸} خریداری شد. مواد به کار گرفته شده در واکنش زنجیره ای پلیمرز^{۲۹} از شرکت سیناژن ایران تهیه شد.

باکتری‌های اندوفیت، شرایط رشد و بررسی الگوی

تحمل‌پذیری: ۱۸ جدایه باکتری اندوفیت جدا شده از ریشه و طوقه گیاه لوبیای جمع‌آوری شده از مزارع مختلف لوبیا در استان لرستان، به‌عنوان جدایه‌های منتخب در بررسی سنتز زیستی نانوذرات مس، از گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان تهیه شدند. جدایه‌های مذکور در محیط کشت نوترینت آگار به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در شرایط گرماگذاری ۲۵ درجه سانتی‌گراد با هدف فعال‌سازی و حصول اطمینان از خالص بودن، کشت خطی داده شدند. پس از تهیه استوک کلرید مس (۵۰ میلی‌مولار)، با هدف اضافه کردن غلظت‌های مختلف یون مس به محیط‌های کشت، از روش رقت در آگار^{۳۰} برای تعیین الگوی تحمل‌پذیری جدایه‌های باکتری اندوفیت استفاده شد (۱۵). به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت نوترینت آگار استریل ذوب‌شده، کلرید مس در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵، ۵ و ۵/۵ میلی‌مولار افزوده شد. سپس داخل پلیت‌های پلاستیکی استریل یکبار مصرف ۱۰ سانتی‌متری ریخته شد. پلیت‌های مذکور به مدت ۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا سطح مرطوب آنها خشک شود. سپس با سمپلر ۵۰ میکرولیتر از باکتری‌های مورد آزمایش در غلظت استاندارد نیم مک فارلند (10^8 cell/ml) به‌صورت کشت نقطه‌ای^{۳۱} قرار داده شد. پلیت‌های مذکور پس از ۲۴ تا ۷۲ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای بررسی رشد یا عدم رشد کلنی‌های باکتریایی از طریق مشاهدات چشمی بررسی شدند. همه آزمایشات سه بار تکرار شدند.

بررسی توانمندی سنتز نانوذرات مس توسط جدایه‌های باکتری اندوفیت مقاوم به یون مس توسط سلول درحال استراحت^{۳۲}: جدایه‌های باکتری اندوفیت با قابلیت تحمل‌پذیری بالا نسبت به مس به‌عنوان جدایه‌های منتخب برای سنتز زیستی نانوذرات مذکور توسط سلول درحال استراحت ارزیابی شدند (۱۶). برای تهیه سلول درحال استراحت، یک لوپ کامل از کلنی خالص باکتری‌های منتخب در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر انکوباتوردار (۲۰۰ دور در دقیقه)، به مدت ۲۴ تا ۲۸ ساعت (رسیدن به انتهای فاز رشد لگاریتمی) انکوبه‌گذاری شد. سپس توده زیستی باکتری^{۳۳} به کمک سانتریفیوژ یخچالی (۸۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۵ دقیقه و ۴ درجه سانتی‌گراد) جداسازی شد. پس از سه بار شستشو با آب دیونیزه استریل، معادل ۵ گرم از زیست‌توده خشک سلول، پس از خشک شدن در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و وزن کردن از طریق ترازو، به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه استریل غنی‌شده با ۲ میلی‌مولار کلرید مس استریل افزوده شد. سپس مخلوط واکنش زیست‌تبدیلی در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۲۰۰ rpm گرماگذاری شد. به‌طور همزمان از محلول کلرید مس (بدون تلقیح سلول درحال استراحت برداشت شده از انتهای فاز رشد لگاریتمی) و سلول درحال استراحت برداشت شده (بدون اضافه کردن محلول کلرید مس) به‌عنوان کنترل استفاده شد. وجود نانوذرات مس تشکیل شده در مخلوط واکنش، از طریق تغییر رنگ محلول واکنش کلرید مس تیمار شده با زیست‌توده تلقیحی و نیز طیف‌های جذبی

اسپکتروفوتومتری مرئی ماورای بنفش^{۳۴} در طول موج‌های ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر بررسی شدند (۱۷).

اثر فاکتورهای مختلف بر سنتز نانوذرات مس توسط سلول درحال استراحت: تأثیر فاکتورهای مختلف شامل اثر غلظت‌های اولیه کلرید مس (۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌مولار)، اثر غلظت اولیه زیست‌توده تلقیحی جدایه (۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۱۲/۵ گرم در لیتر برحسب وزن خشک) و اثر دوره گرماگذاری (۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت) بر سنتز نانوذرات مس توسط سلول درحال استراحت با بهینه‌سازی به روش تک عاملی بررسی شد (۱۸). تشکیل نانوذرات مس با آنالیز طیف‌سنجی اسپکتروفوتومتری سنجش شد. همه آزمایشات در سه تکرار انجام شدند.

شناسایی مورفولوژیک، بیوشیمیایی و ملکولی جدایه باکتری اندوفیت منتخب: شناسایی اولیه سوبه باکتری اندوفیت منتخب براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و آزمون‌های تشخیصی بیوشیمیایی معرفی شده در کتاب باکتری‌شناسی سیستماتیک برگی انجام شد (۱۹). بررسی ظاهر کلنی و بررسی میکروسکوپی مستقیم پس از رنگ‌آمیزی با استفاده از کیت رنگ‌آمیزی گرم و همچنین از طریق مشاهدات میکروسکوپ الکترونی روبشی^{۳۵} انجام شد. از تست KOH (۳ درصد) برای تأیید واکنش گرم استفاده شد. تست‌های کاتالاز و اکسیداز به ترتیب به کمک آب اکسیژنه ۳ درصد و دیسک اکسیداز، بررسی حرکت باکتری از طریق روش قطره معلق، بررسی تولید رنگدانه روی محیط کشت کینگ بی^{۳۶}، تست احیای نترات روی محیط کشت نترات براث برای بررسی حضور آنزیم نترات ردوکتاز، تست هیدرولیز نشاسته روی محیط کشت نشاسته آگار برای بررسی حضور آنزیم

آمیلاز، بررسی تولید لوآن روی محیط کشت نوترینت آگار غنی‌شده با سوکروز (سوکروز نوترینت آگار)، بررسی وجود آنزیم لسیتیناز روی محیط کشت پایه Egg Yolk Agar غنی‌شده با زرده تخم‌مرغ، رشد در دماها و pHهای مختلف و درنهایت تست‌های مرتبط با جذب و تخمیر قندها انجام شدند. به منظور شناسایی دقیق جدایه باکتری اندوفیت منتخب، از روش توالی‌یابی 16S rDNA استفاده شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت متابیون^{۳۷} بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. از پرایمرهای همگانی ژن 16S rDNA (5'- Fd1 Rp2 و 3'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) و (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') برای تکثیر توالی مربوط به 16S rDNA استفاده شد (۲۰). تعیین توالی قطعه حاصل از تکثیر ژن 16S rDNA توسط ABI3730xl DNA sequencer شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام شد. توالی‌های به دست آمده پس از ویرایش با نرم‌افزار BioEdit با توالی‌های موجود در بانک اطلاعات ژن^{۳۸} هم‌ردیف شدند. درختچه فیلوژنتیک بر مبنای روش Neighbor Joining با استفاده از نرم‌افزار MEGA ورژن 7.0 ترسیم شد (۲۱).

بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات مس سنتزی بر گونه‌های باکتریایی مختلف: فعالیت ضد میکروبی نانوذرات مس سنتز شده توسط جدایه باکتری اندوفیت منتخب توسط استراتژی سلول درحال استراحت، در برابر پاتوژن‌های باکتری انسانی (شریشیاکلی^{۳۹} با کد IBRC-M11038 و استافیلوکوکوس اورئوس^{۴۰} با کد IBRC-M10917) و گیاهی (سودوموناس سیرینگه^{۴۱} با کد IBRC-M10702 و زانتوموناس کامپستریس^{۴۲} با

درنهایت، پس از چند بار شستشوی نانوذرات با استفاده از آب دیونیزه‌شده سترون، نمونه نانوذره در دستگاه فریز درایر به مدت ۲۴ ساعت خشک شد (۲۳). نانوذرات مس به‌دست آمده در مخلوط واکنش حاصل از واکنش سلول درحال استراحت جدایه باکتری اندوفیت منتخب در معرض $CuCl_2$ ، با استفاده از مشاهدات چشمی، طیف‌های اسپکتروفتومتری، میکروسکوپ الکترونی روبشی مجهز به طیف‌سنج پراش انرژی پرتو ایکس^{۴۳}، طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز^{۴۴} و همچنین دستگاه طیف‌سنجی پراش اشعه ایکس^{۴۵} بررسی شدند.

نتایج

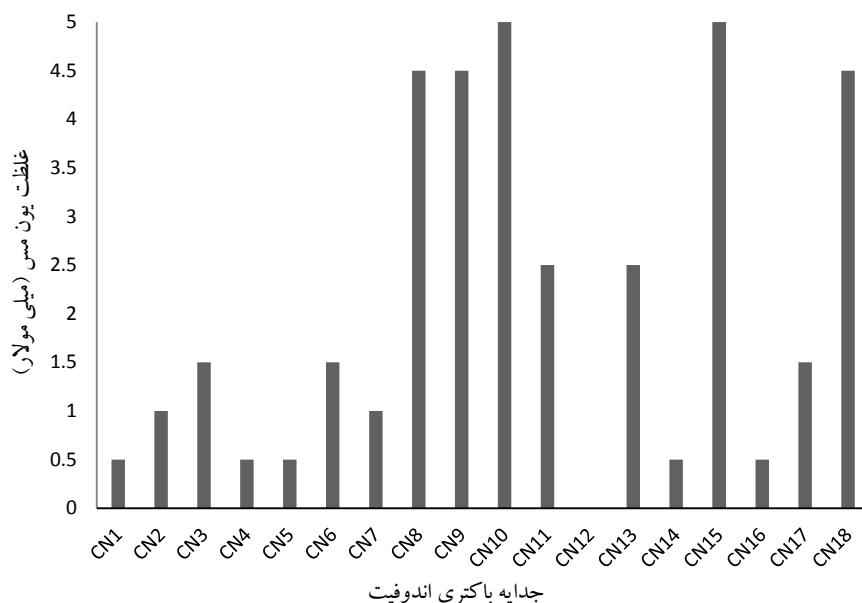
غربالگری جدایه‌های باکتری اندوفیت با قابلیت

تحمل‌پذیری بالا نسبت به مس: دستیابی به جدایه‌های باکتری مقاوم به یون سمی مس، گام نخست در توسعه سویه‌های باکتری با قابلیت احیای یون مس به نانوذرات مس است (۲۳). در این راستا، الگوی تحمل‌پذیری ۱۸ جدایه باکتری اندوفیت جداشده از ریشه و طوقه گیاه لوبیا نسبت به یون سمی مس در محیط نوترینت برات غنی‌شده با غلظت‌های مختلف کلرید مس از طریق روش رقت در آگار تعیین شد (شکل ۱). براساس نتایج به‌دست آمده میزان تحمل‌پذیری جدایه‌های باکتری منتخب بین ۰/۵ تا ۵ میلی‌مولار تعیین شد. در این میان، پنج جدایه باکتری (نام‌گذاری شده با عنوان CN8، CN9، CN10، CN15 و CN18) که بالاترین مقاومت نسبت به یون مس را داشتند (تحمل‌پذیری بالاتر از ۴ میلی‌مولار) به‌عنوان جدایه‌های برتر برای آزمایشات سنتز زیستی نانوذرات مس انتخاب شدند.

کد IBRC-M 11094 خریداری شده از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران، از طریق اندازه‌گیری هاله عدم رشد و به روش انتشار از چاهک بر سطح آگار سنجش شد (۲۲). در این روش، پس از آماده‌سازی سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل نیم مک فارلند (10^8 CFU/ml)، کشت چمنی با استفاده از میله شیشه‌ای سرکج استریل بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار انجام گرفت. پس از خشک شدن سطح پلیت‌های محیط کشت، به کمک پیت پاستور استریل، سه عدد چاهک به قطر ۵ میلی‌متر با فاصله مناسب از یکدیگر ایجاد شدند. سپس به میزان ۵۰ میکرولیتر از نانوذرات مس سنتز شده از واکنش سلول درحال استراحت، پس از رسوب توسط دستگاه سانتریفیوژ (۱۵۰۰۰ دور در دقیقه، ۴۵ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد)، خشک کردن توسط دستگاه فریز درایر و دیسپرس کردن در آب دیونیزه استریل از طریق حمام اولتراسونیک، در چاهک‌های ایجاد شده ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای باکتری‌های بیماری‌زای انسانی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد برای باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی گرماگذاری شدند. درنهایت، میزان حساسیت باکتری‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد سنجش شد.

تعیین ویژگی نانوذرات مس با روش‌های

طیف‌سنجی و میکروسکوپی: به‌منظور استخراج نانوذرات مس تشکیل شده در مخلوط واکنش، ابتدا سوپرناتانت عاری از توده زیستی باکتری از فیلترهای میلی پور سرسرنگی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد و سپس با هدف رسوب نانوذرات، از سانتریفیوژ با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۵ دقیقه استفاده شد.

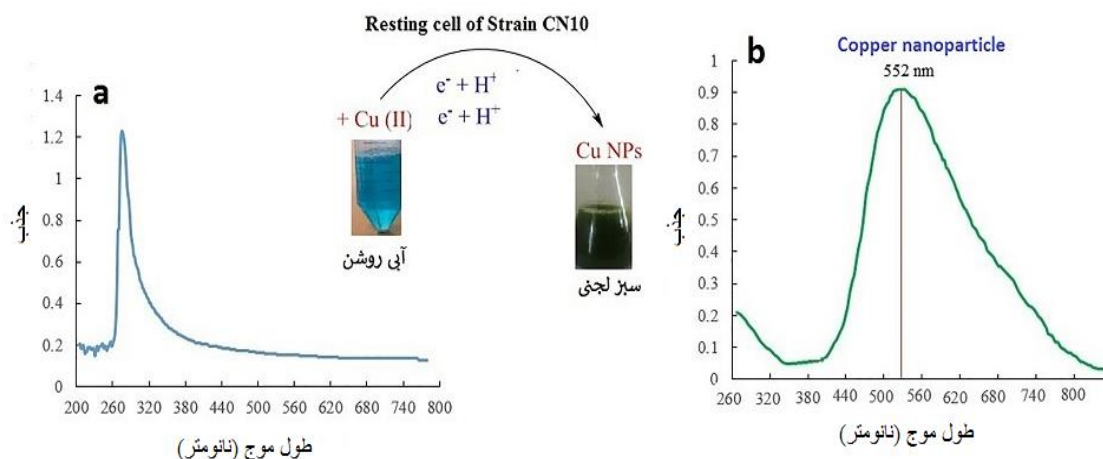


شکل ۱- الگوی تحمل‌پذیری جدایه‌های باکتری اندوفیت منتخب نسبت به یون سمی مس از طریق روش رقت در آگار در محیط نوترینت برات غنی شده با غلظت‌های مختلف کلرید مس در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری

(سبز لجنی) تغییر رنگ داده است. علاوه بر این، آنالیز نمونه‌ها با اسپکتروفتومتری UV-vis، یک پیک جذب مشخص را در طول موج ۵۵۲ نانومتر نشان داد که بیان‌کننده وجود نانوذرات مس در مخلوط واکنش است (۱۷). براساس منابع معتبر بیشینه پیک جذب نانوذرات مس در طول موج‌های ۵۵۰ تا ۶۰۰ نانومتر است (۲۴). در محلول کنترل (سلول در حال استراحت تیمارنشده با سوبسترای پیش‌ساز کلرید مس)، در طول موج‌های بین ۵۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر هیچ پیک جذبی مشاهده نشد. گفتنی است ظهور پیک جذبی در محدوده ۲۷۰ تا ۲۸۰ نانومتر در محیط کنترل، مربوط به پروتئین‌های ترشح‌شده از سلول‌های در حال استراحت در سوپرناتانت کشت است.

غربالگری جدایه‌های مقاوم به فلز مس با قابلیت

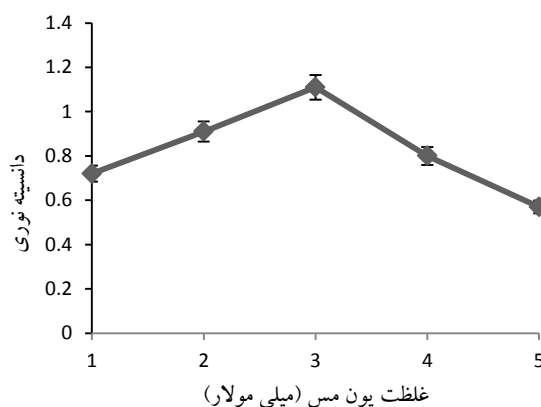
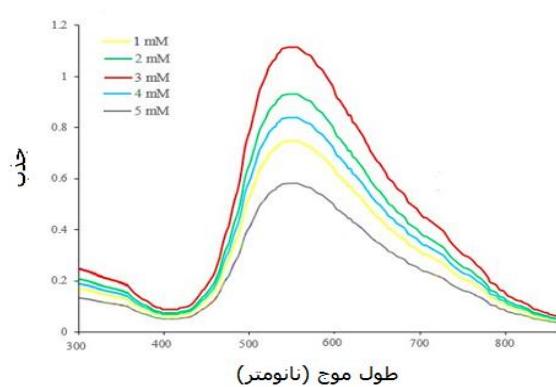
سنتز خارج سلولی نانو سولفید مس: پنج جدایه باکتری منتخب با قابلیت مقاومت بالا نسبت به یون سمی مس توسط استراتژی سلول در حال استراحت برای بررسی توانمندی سنتز نانوذرات مس بررسی شدند. براساس نتایج به دست آمده تنها جدایه باکتری CN10 (جداشده از ریشه گیاه لوییا) قادر به احیای کلرید مس به نانوذرات مس در غلظت ۲ میلی‌مولار از کلرید مس بود (شکل ۲). همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است براساس مشاهدات چشمی محلول کلرید مس تیمارنشده با سلول در حال استراحت (محیط کنترل) دارای رنگ آبی روشن است؛ درحالی‌که در نمونه تیمارنشده با سلول در حال استراحت رنگ محلول واکنش به دلیل تشکیل نانوذرات مس به رنگ سبز تیره



شکل ۲- طیف‌های جذبی اسپکتروفتومتری محلول کلرید مس (غلظت ۲ میلی‌مولار، pH ۷ و سلول در حال استراحت در غلظت ۵ گرم بر لیتر بر حسب وزن خشک سلول) و تغییر رنگ محلول واکنش (تغییر رنگ از آبی روشن به سبز لجنی) پس از ۴۸ ساعت واکنش زیست‌تبدیلی در ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر مدور (۲۰۰ دور در دقیقه)؛ a. محیط کنترل (سلول در حال استراحت تیمارنشده با محلول کلرید مس) و b. محیط واکنش زیست‌تبدیلی حاوی نانوذرات مس تشکیل شده

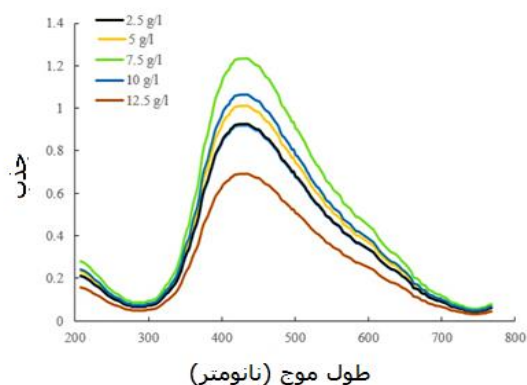
تبدیلی، بعد از ۴۸ ساعت گرماگذاری، در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد، pH برابر ۷ و دور شیکر ۲۰۰ rpm مشاهده شد. به عبارت دیگر از کلرید مس در غلظت ۳ میلی‌مولار به عنوان غلظت بهینه در آزمایشات بعدی استفاده شد؛ با وجود این، در غلظت‌های بالاتر از ۳ میلی‌مولار، به دلیل سمیت یون مس راندمان سنتز کاهش یافته است (شکل ۳).

اثر غلظت‌های مختلف کلرید مس، زیست‌توده تلقیحی جدایه و زمان گرماگذاری بر سنتز نانوذرات مس: در این بخش از پژوهش نتایج مرتبط با تأثیر فاکتورهای مختلف بر سنتز نانوذرات مس توسط سلول در حال استراحت سویه منتخب CN10 از طریق روش تک عاملی آورده شده است. با افزایش غلظت کلرید مس از ۱ تا ۳ میلی‌مولار، افزایش تدریجی در طیف جذبی مربوط به نانوذرات مس در واکنش زیست



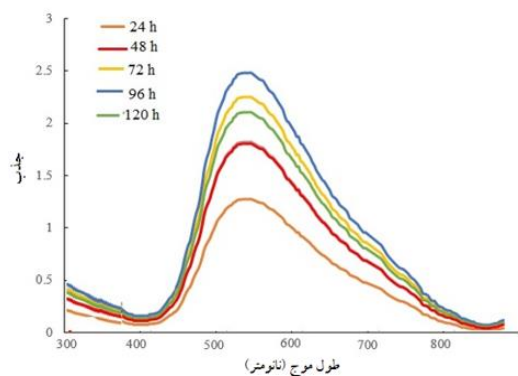
شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید مس بر سنتز نانوذرات مس در مخلوط واکنش حاوی ۵ گرم در لیتر سلول در حال استراحت سویه منتخب CN10، pH برابر ۷ و بعد از ۴۸ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر مدور (۲۰۰ دور در دقیقه)

سنتز نانوذرات مس در غلظت ۷/۵ گرم در لیتر وزن توده زیستی به دست آمده است. راندمان سنتز نانوذرات مس در غلظت‌های بالاتر کاهش یافته است؛ بنابراین، از غلظت بهینه ۷/۵ گرم در لیتر در آزمایشات بعدی استفاده شد.



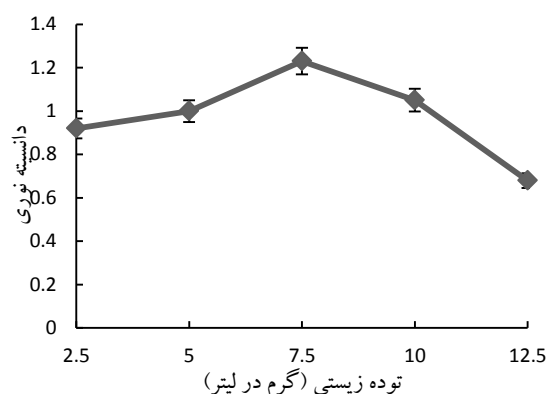
شکل ۳- تأثیر غلظت‌های زیست توده سلول بر حسب وزن خشک بر سنتز نانوذرات مس در مخلوط واکنش حاوی کلرید مس در غلظت بهینه ۳ میلی مولار، pH برابر ۷ و بعد از ۴۸ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد روی شیکر مدور (۲۰۰ دور در دقیقه)

در نهایت با هدف بهبود راندمان احیای زیستی کلرید مس به نانوذرات مس، اثرات دوره گرماگذاری در شرایط بهینه شده (غلظت‌های بهینه یون مس و توده زیستی) در مخلوط واکنش زیست تبدیلی مطالعه شدند (شکل ۵). همان گونه که در شکل مشاهده می شود یک افزایش منظم در پیک جذب مرتبط به نانوذرات مس از

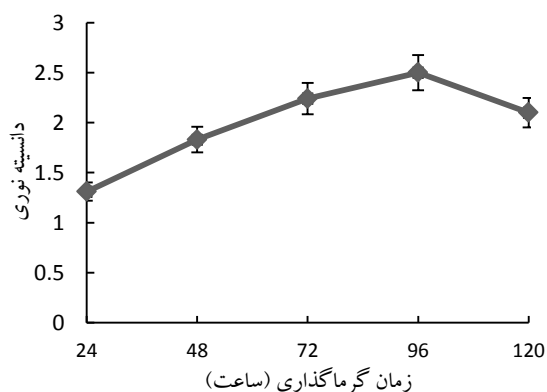


شکل ۴- اثر دوره گرماگذاری بر سنتز نانوذرات مس در مخلوط واکنش حاوی کلرید مس در غلظت بهینه ۳ میلی مولار، غلظت بهینه زیست توده سلول (۷/۵ گرم در لیتر)، دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، pH برابر ۷ و دور شیکر ۱۰۰ rpm

در ادامه و با هدف بهینه کردن غلظت زیست توده سلول، تأثیر غلظت‌های مختلف از توده زیستی برداشت شده از انتهای فاز رشد لگاریتمی در محیط واکنش حاوی ۳ میلی مولار از غلظت بهینه کلرید مس ارزیابی شد (شکل ۴). براساس نتایج، بیشترین راندمان



در نهایت با هدف بهبود راندمان احیای زیستی کلرید مس به نانوذرات مس، اثرات دوره گرماگذاری در شرایط بهینه شده (غلظت‌های بهینه یون مس و توده زیستی) در مخلوط واکنش زیست تبدیلی مطالعه شدند (شکل ۵). همان گونه که در شکل مشاهده می شود یک افزایش منظم در پیک جذب مرتبط به نانوذرات مس از

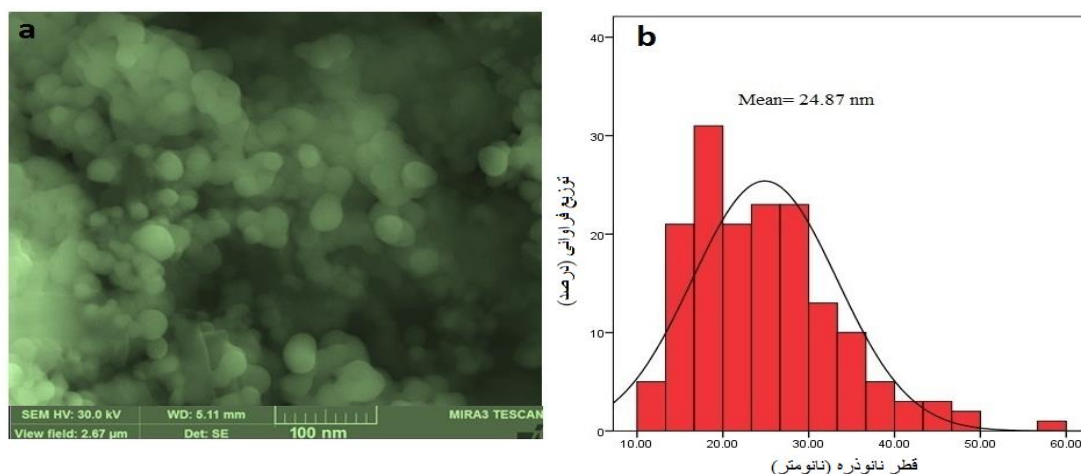


سنتزی، سنتز نانوذرات کروی با میانگین اندازه ۲۴/۸ نانومتری را نشان داد.

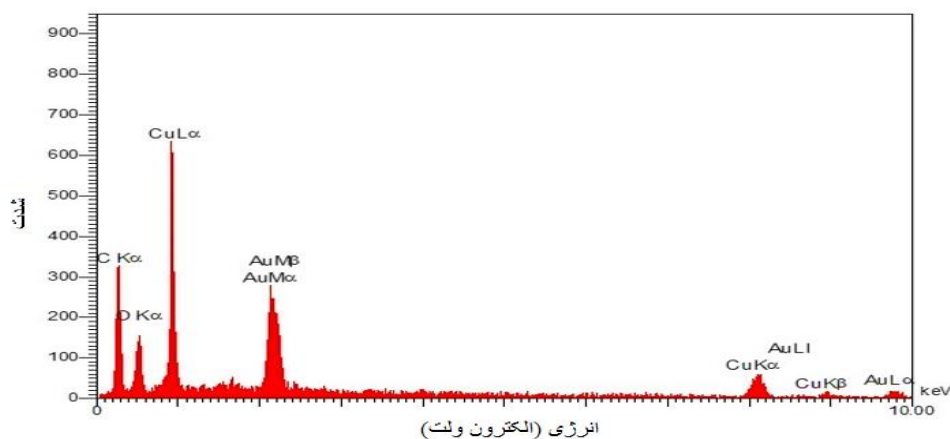
در ادامه طیف EDX که با هدف تجزیه و تحلیل ساختاری نانوذرات سنتزی انجام گرفت، حضور پیک‌های مربوط به مس را در نانوذرات سنتزی نشان داد (شکل ۷). گفتنی است وجود پیک‌های مرتبط با کربن و اکسیژن احتمالاً مرتبط به عامل پوشاننده 46 یا عامل احیاکننده دخیل در احیای کلرید مس به نانوذرات مس است.

نتایج مطالعات طیف‌سنجی و میکروسکوپی نانوذرات

مس سنتز شده توسط استراتژی سلول در حال استراحت: به دنبال بهینه‌سازی به روش تک فاکتوری سنتز زیستی نانوذرات مس توسط سلول‌های در حال استراحت جدایه باکتری منتخب CN10، نانوذرات مس سنتزی توسط سانتیفیوژ با دور بالا استخراج و پس از خشک کردن با دستگاه فریز درایر، مورفولوژی و دامنه پراکنش توزیع اندازه نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شدند. همان‌گونه که در شکل ۶ نشان داده شده است، تعیین خصوصیت ساختار سطحی نانوذرات مس



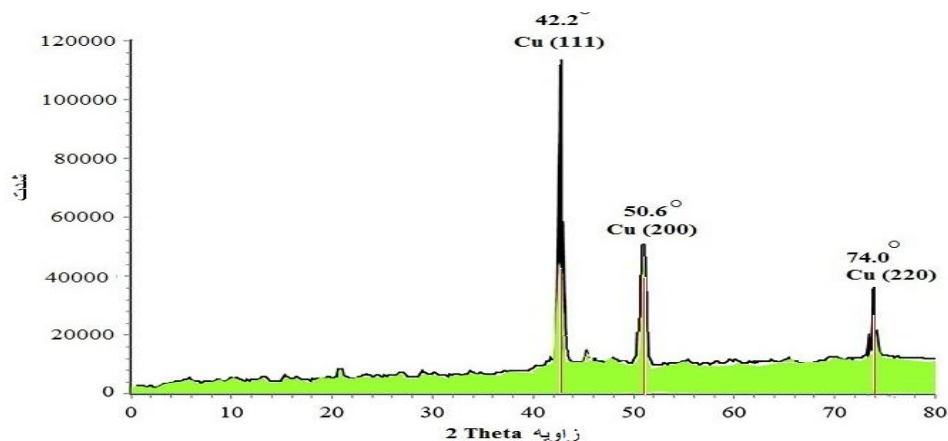
شکل ۶- a. میکروسکوپ الکترونی SEM و b. هیستوگرام توزیع اندازه نانوذرات مس سنتز شده در شرایط بهینه توسط سلول در حال استراحت جدایه باکتری CN10



شکل ۷- طیف EDX نانوذرات مس سنتزی توسط سلول در حال استراحت

باکتری CN10 در شکل ۸ نشان داده شده‌اند.

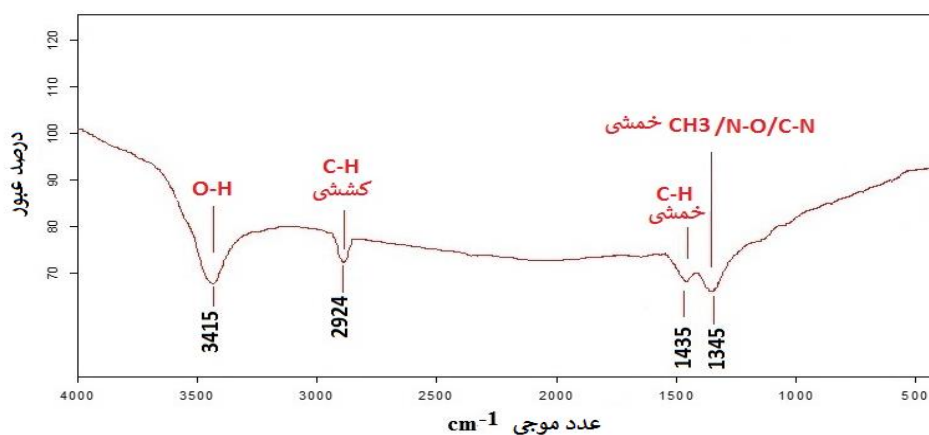
نتایج آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD) نانوذرات مس سنتزی توسط سلول در حال استراحت جداییه



شکل ۸- الگوی پراش پرتو ایکس نانوذرات مس سنتز شده توسط استراتژی سلول در حال استراحت

ظاهر شده در محدوده عدد موجی ۳۴۱۵ مربوط به گروه OH موجود در ساختار ماکرومولکول‌های احتمالی در نقش عامل پایدار کننده یا احیا کننده کلرید مس به نانوذرات مس است. همچنین پیک‌های ظاهر شده در عدد موجی ۲۹۲۴ مربوط به گروه C-H کششی، عدد موجی ۱۴۳۵ مربوط به گروه C-H خمشی و عدد موجی ۱۳۴۵ مربوط به گروه CH₃ خمشی یا N-O یا C-N مرتبط با ترکیبات آلی موجود در نانوذرات مس به عنوان عامل پوشاننده در سنتز زیستی نانوذرات مذکور هستند (۲۵).

نتایج آزمون XRD نشان دهنده پیک‌های قابل رؤیت در صفحات بلوری ۱۱۱، ۲۰۰ و ۲۲۰ است که منطبق بر صفحات و زوایای پراش آنها با نمونه استاندارد نانوذرات مس است (۱۷)؛ همین موضوع کریستالی بودن نانوذرات مس را تأیید کرد. با هدف بررسی گروه‌های عاملی پوشاننده دخیل در سنتز و پایداری نانوذرات مس سنتز شده توسط استراتژی سلول در حال استراحت، آنالیز مشخصه‌یابی طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) انجام شد (شکل ۹). با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز FTIR می‌توان گفت پیک

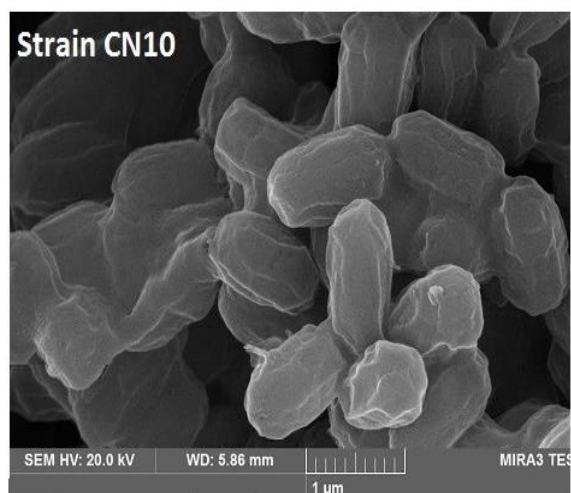


شکل ۹- طیف FTIR نانوذرات مس سنتز شده توسط استراتژی سلول در حال استراحت

میکروارگانیسم‌ها	قطر هاله توقف رشد (بر حسب میلی‌متر)
اشریشیا کلی	۱۴/۲
استافیلوکوکوس اورئوس	۹/۴
سودوموناس سیرینگه	۱۵/۶
زانتوموناس کامپسترینس	۱۹/۲



شکل ۱۰- نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات مس تشکیل شده توسط سلول در حال استراحت سویه منتخب CN10 به روش انتشار از چاهک بر سطح آگار



شکل ۱۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM سویه باکتری CN10

نتایج اثرات ضد میکروبی نانوذرات مس: نتایج

به دست آمده از بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات مس سنتز شده توسط سلول در حال استراحت جدایه منتخب CN10 به روش انتشار از چاهک بر سطح آگار نشان دهنده اثر مهارتی نانوذرات مس بر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی و گیاهی به کار گرفته شده در این مطالعه است. بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین اثر بازدارندگی نانوذرات مذکور علیه باکتری بیماری‌زای گیاهی زانتوموناس کامپسترینس با میانگین مهار کنندگی ۱۹/۲ میلی‌متر و کمترین میزان مهار کنندگی مربوط به باکتری بیماری‌زای انسانی استافیلوکوکوس اورئوس با میانگین مهار کنندگی ۹/۴ میلی‌متر است. در مجموع بر اساس نتایج به دست آمده، اثرات مهار کنندگی نانوذرات مس سنتز شده در این مطالعه بر باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی در مقایسه با باکتری‌های بیماری‌زای انسانی بالاتر بود (شکل ۱۰).

شناسایی فنوتیپی و فیلوژنتیکی جدایه منتخب: سویه

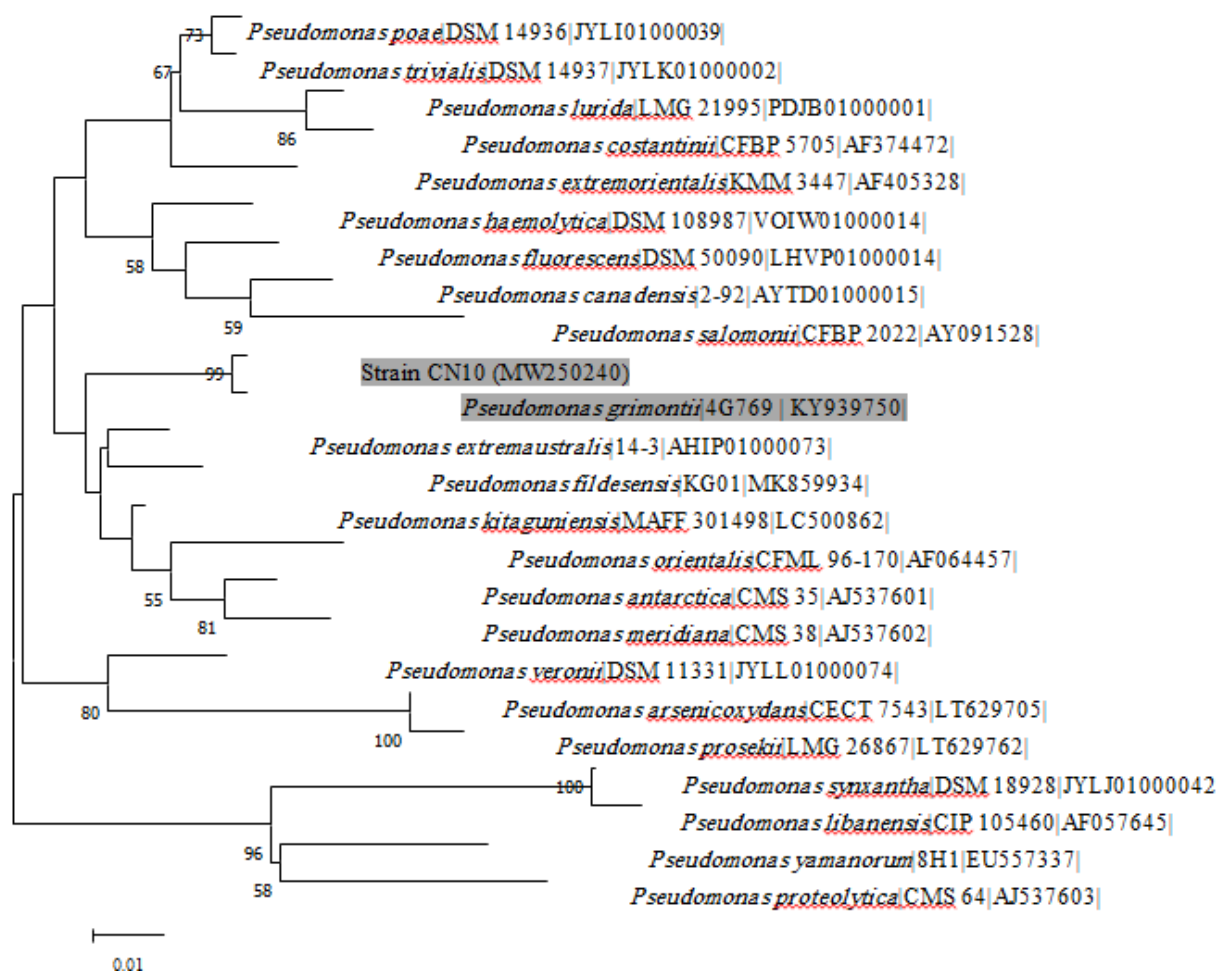
باکتری اندوفیت CN10 برای آزمایشات مربوط به تعیین هویت انتخاب شد که بر اساس آنالیزهای طیف‌سنجی و میکروسکوپی سویه برتر شناخته شد. بر اساس مطالعات میکروسکوپی (نوری و الکترونی) و واکنش رنگ آمیزی گرم و تأیید آن با تست KOH، سویه مذکور از نظر واکنش گرم و تست KOH به صورت گرم منفی و از نظر ریخت‌شناسی، میله‌ای شکل با میانگین ابعاد ۱ تا ۱/۲ میکرون طول و ۰/۵ تا ۰/۶ میکرون عرض بود (شکل ۱۱).

در ادامه و با هدف شناسایی بهتر جدایه منتخب، انواع تست‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مختلف مطابق با کتاب‌های مرجع و مقالات منتشر شده انجام شدند که نتایج در جدول ۱ آورده شده‌اند.

جدول ۱- ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی سویه باکتری

CN10			
ویژگی	سویه CN10	ویژگی	سویه CN10
-	لستیناز	+	واکنش گرم
+	رشد در ۴ درجه سانتی‌گراد	+	شکل
+	رشد در ۳۷ درجه سانتی‌گراد	+	کاتالاز
-	رشد در ۴۱ درجه سانتی‌گراد	+	اکسیداز
۱۰-۵	رشد در pHهای مختلف	+	حرکت
+	جذب منابع کربوهیدراتی: مانوز	-	تولید پیوسیانین
+	مانیتول		
+	ریبوز		
+	سوربیتول		
+	تری‌هالوز		
+	تست مصرف منابع قندی (به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی): گلوکز	+	احیای نیترات
+	فروکتوز		
+	گالاکتوز		
+	آرابینوز		
+	سوکروز		
		+	تولید لوان
		+	هیدرولیز نشاسته

براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و آزمون‌های بیوشیمیایی و بر طبق مقالات منتشر شده در این ارتباط جدایه مذکور به‌طور موقت سودوموناس گرمونتی^{۴۷} شناسایی شد. در ادامه و با هدف شناسایی دقیق جدایه باکتری مذکور، DNA ژنومی این باکتری از طریق کیت استخراج DNA بازیافت شد. سپس ژن کدکننده 16S rDNA از طریق آغازگرهای جهانی توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر شد. در ادامه و با توجه خلوص DNA مدنظر، تعیین توالی ژن مدنظر انجام شد. پس از تعیین توالی، توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه مذکور در سایت NCBI بلاست شد. براساس نتایج به‌دست آمده جدایه مذکور شباهت ۹۹/۷ درصدی با سویه‌های متعلق به سودوموناس گرمونتی داشت. آنالیز فیلوژنتیکی بر پایه ترسیم درخت فیلوژنی نیز تأیید کرد جدایه باکتری مذکور به جنس سودوموناس تعلق دارد و علاوه بر این به‌طور محتمل به‌عنوان سویه جدید متعلق به گونه سودوموناس گرمونتی می‌تواند طبقه‌بندی شود (شکل ۱۲).



شکل ۱۲- درخت فیلوژنی سویه منتخب CN10 و دیگر اعضای جنس سودوموناس بر اساس تکثیر توالی نوکلئوتیدی مربوط به ژن 16S rDNA. ترسیم درخت فیلوژنی بر پایه روش neighbor-joining با بوت استرپ ۱۰۰۰ انجام شد. شماره دسترسی سویه‌های ثبت شده در بانک ژنی در پرانتز آورده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

که برای سنتز نانوذرات استفاده می‌شوند و مشکلات روش‌های قبلی را ندارند؛ البته تولید نانوذرات توسط میکروارگانیسم‌ها معایبی مانند وقت‌گیر بودن کشت میکروب‌ها، سخت بودن کنترل شکل و اندازه نانوذره تولیدی و همچنین سرعت پایین در تولید نانوذرات دارند؛ با وجود این، بهینه‌سازی شرایطی مانند pH محیط، دما، زمان گرماگذاری، میزان استفاده از غلظت یون فلزی و انتخاب نوع میکروارگانیسم مناسب، امکان استفاده از روش‌های زیستی را برای تولید نانوذرات در

تولید زیستی نانوذرات فلزی یکی از جنبه‌های جذاب علم ریززیست‌فناوری است. نانوذرات مس به دلیل کاربردهای فراوان در علوم زیستی و همچنین سایر علوم شایان توجه قرار گرفته‌اند. تولید این نانوذرات در ابتدا با کمک روش‌های فیزیکی و شیمیایی انجام می‌شد که از نظر انرژی مقرون‌به‌صرفه نیستند و به‌طور کلی این روش‌ها برای محیط زیست مضرند. میکروارگانیسم‌ها ترکیباتی با قابلیت احیاکنندگی دارند

مقیاس بزرگ و کاربردهای صنعتی فراهم کرده است. همچنین، می‌توان با کشت و بهره‌گیری از میکروارگانیزم‌های دستکاری شده از نظر ژنتیکی برای تولید یک عامل احیاکننده، میزان تولید، شکل و اندازه نانوذرات را به‌طور مؤثرتری کنترل کرد. باکتری‌های موجود در گیاهان، به‌صورت بین سلولی یا داخل سلولی، در یک رابطهٔ همزیستی با گیاهان‌اند. معمولاً جمعیت بیشتری از باکتری‌های اندوفیت در ریزوسفر در مقایسه با قسمت‌های بالایی گیاه وجود دارند. برای همزیستی پایدار، اندوفیت‌ها ترکیبات مختلفی را ایجاد می‌کنند که رشد گیاه را تحریک می‌کنند و مکانیسم دفاعی گیاهان را بهبود می‌بخشند و آنها را از بیمارگرهای گیاهی محافظت می‌کنند. به تازگی، سنتز نانوذرات فلزی از طریق باکتری‌های اندوفیت، افق جدیدی از تحقیقات روی روابط زیست‌شناسی و فناوری نانو را به وجود آورده است. میکروب‌های اندوفیت همزیست با گیاهان، مخزن ویژه‌ای از متابولیت‌های ثانویهٔ بالقوه دارند که دارای تمایل به کاهش یون‌های فلزی به نانوذرات‌اند (۷). در این پژوهش، پتانسیل جدایی باکتری اندوفیت برای احیای زیستی کلرید مس به نانوذرات مس بررسی شد. در این راستا، الگوی تحمل‌پذیری ۱۸ جدایی باکتری اندوفیت جدا شده از ریشه و طوقه گیاه لوبیا نسبت به یون سمی مس با روش رقت در آگار تعیین شد. براساس نتایج به‌دست آمده میزان تحمل‌پذیری جدایی‌های باکتری منتخب بین ۰/۵ تا ۵ میلی‌مولار تعیین شد. در این میان، پنج جدایی باکتری با بالاترین مقاومت نسبت به یون مس (تحمل‌پذیری بالاتر از ۴ میلی‌مولار) به‌عنوان جدایی‌های برتر برای آزمایشات سنتز زیستی نانوذرات مس انتخاب شدند. سالوادوری و همکاران مقاومت ذاتی نسبت به یون مس را با روش رقت در

آگار تعیین کردند (۹). کواس^{۴۸} و همکاران نیز در مطالعهٔ خود، غلظت ۵ میلی‌مولار از یون مس را به‌عنوان غلظت نهایی در آزمایشات مربوط به سنتز نانوذرات مس و اکسید مس انتخاب کردند (۲۶). جلوگیری از تکثیر بیومس سلولی، جداسازی آسان‌تر محصول تولیدی، انجام فرایند زیست تبدیلی در شرایط غیراستریل و همچنین تنظیم بیومس سلولی ورودی از مزایای به‌کارگیری سلول در حال استراحت در مقایسه با سلول‌های رویشی است (۵)؛ بنابراین، برای بررسی قابلیت تولید نانوذرات مس، در ۵ جدایی باکتری منتخب با قابلیت مقاومت بالا نسبت به یون سمی مس، از سلول در حال استراحت استفاده شد که براساس نتایج حاصل شده تنها جدایی باکتری CN10 (جدا شده از ریشه گیاه لوبیا) قادر به احیای کلرید مس به نانوذرات مس در غلظت ۲ میلی‌مولار از کلرید مس بود. در مطالعهٔ پیش رو پس از انتخاب سویه باکتری اندوفیت CN10 به‌عنوان سویه برتر، این سویه از لحاظ ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی شد. نتایج به‌دست آمده از آنالیز توالی 16S rDNA نشان دادند سویه مذکور تشابه ۹۹/۷ درصدی با *سودوموناس گرمونتی* دارد. در ادامه، سنتز خارج سلولی نانوذرات مس توسط باکتری *سودوموناس گرمونتی* در شرایط بهینه واکنش زیست تبدیلی بررسی شد. طبق نتایج، سویه مدنظر پس از مواجهه با محلول کلرید مس (غلظت بهینه ۳ میلی‌مولار)، قادر به سنتز خارج سلولی نانوذرات مس کروی با میانگین اندازه ۲۸/۸ نانومتر در pH برابر ۷ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، پس از ۹۶ ساعت گرماگذاری در دور شیکر ۱۰۰ rpm است. حسن^{۴۹} و همکاران سنتز باکتریایی نانوذرات مس / اکسید مس را در جنس باکتری *سراشیا*^{۵۰} گزارش دادند (۲۷). قربانی^{۵۱} و

ضدباکتریایی نانوذرات مس گفتنی است این نانوذرات به آسانی به دیواره سلولی باکتری نفوذ می‌کنند. بار مثبت نانوذرات مس به‌طور الکترواستاتیک با بار منفی پروتئین‌های موجود در دیواره سلول باکتری تعامل برقرار می‌کند و باعث آزادسازی یون‌هایی می‌شود که با گروه‌های تیول پروتئین‌های موجود در دیواره سلول واکنش می‌دهند و در نهایت، موجب تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن^{۶۲} می‌شوند. افزایش سطح این گونه‌های فعال باعث افزایش استرس اکسیداتیو در سلول می‌شود. این استرس علاوه بر آسیب به غشای سلولی می‌تواند به DNA و سیستم‌های داخل سلولی مانند سیستم تنفسی صدمه بزند (۳۲).

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش نشان دادند باکتری‌های اندوفیت می‌توانند به‌عنوان کاتالیزور زیستی ارزان و دوستدار محیط‌زیست، جایگزین مناسبی برای روش‌های فیزیکی‌شیمیایی، برای سنتز نانوذرات مس باشند. به‌دلیل کاربردهای گسترده و ویژگی‌های ارزنده نانوذرات در علم فناوری نانو، این پژوهش می‌تواند زمینه‌ساز مطالعات فراگیرتر در زمینه استفاده از روش‌های زیستی برای تولید خارج سلولی نانوذرات مس باشد. همچنین امید است نتایج این پژوهش در سطح مجامع داخلی و بین‌المللی در راستای معرفی توان بالقوه باکتری اندوفیت سودوموناس گرمونوتی سویه CN10 برای سنتز نانوذرات مس، در مراکز علمی پژوهشی، دانشگاهی و نانو زیست‌فناوری با هدف بهره‌برداری تجاری و استفاده عملی در علوم پزشکی، دارویی و بهداشتی استفاده شوند.

همکاران نیز در مطالعه خود نشان دادند عصاره کشت باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم*^{۵۲} پس از مواجهه با محلول نیترات مس ۱ میلی‌مولار، قادر به سنتز خارج سلولی نانوذرات مس با میانگین اندازه ذرات ۴۹ نانومتر است (۲۸). حسن^{۵۳} و همکاران تولید خارج سلولی نانوذرات اکسید مس با میانگین اندازه ۷۸ و ۸۰ نانومتر را توسط دو سویه اندوفیت *استرپتومایسس زئوماستیکوس*^{۵۴} و *استرپتومایسس سودوگریزئولوس*^{۵۵} گزارش کردند (۲۹). در بخش پایانی این پژوهش خاصیت ضد میکروبی نانوذرات مس سنتز شده توسط سلول در حال استراحت جدایه باکتری اندوفیت *سودوموناس گرمونوتی* علیه برخی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی و گیاهی بررسی شد. در مجموع براساس نتایج به‌دست آمده، اثرات مهارکنندگی نانوذرات مس سنتز شده در این مطالعه علیه بیماری‌زاهای گیاهی در مقایسه با پاتوژن‌های انسانی بالاتر بود. در مطالعه انجام شده توسط آشنگراف و سهامی سلطانی کارایی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سولفید مس تشکیل شده توسط سوپرناتانت کشت باکتری *باسیلوس لیکنیفرمیس*^{۵۶}، علیه برخی باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و برخی قارچ‌های بیماری‌زا بررسی شد. نتایج نشان دادند نانوذرات زیستی سنتز شده، علیه همه میکروب‌های تست شده اثر مهارکنندگی رشد داشتند؛ اما حساسیت *سودوموناس آئروژینوزا*^{۵۷} و *باسیلوس سرئوس*^{۵۸} در مقایسه با سایر ارگانیسم‌های تست شده بیشتر بوده است (۲۳). در مطالعات متعددی اثرات ضد میکروبی نانوذرات مس علیه سویه‌های باکتریایی مختلفی از جمله *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، میکروکوکوس *لوتئوس*^{۵۹}، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا اینتریکا*^{۶۰} و *انتروباکتر آئروژنز*^{۶۱} به اثبات رسیده‌اند (۳۰ و ۳۱). در ارتباط با مکانیسم اثرات

biotechnology. 2016; 34 (7): 588-599.

- (8) Elblbesy MA, Madbouly AK, Hamdan TA. Bio-synthesis of magnetite nanoparticles by bacteria. *American Journal of Nano Research and Applications* 2014; 2 (5): 98-103.
- (9) Salvadori MR, Lepre LF, Ando RA, Oller do Nascimento CA, Correˆa 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.
- (10) Shantkriti S, Rani P. Biological synthesis of copper nanoparticles using *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2014; 3: 374-383.
- (11) Tiwari M, Jain P, Hariharapura RC, Narayanan K, Bhat U, Udupa N, et al. Biosynthesis of copper nanoparticles using copper-resistant *Bacillus cereus*, a soil isolate. *Process Biochemistry*. 2016; 51 (10):1348-1356.
- (12) Nabila MI, Kannabiran K. Biosynthesis, characterization and antibacterial activity of copper oxide nanoparticles (CuO NPs) from actinomycetes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2018; 15: 56–62.
- (13) Noman M, Shahid M, Ahmed T, Niazi MBK, Hussain S, Song F, et al. Use of biogenic copper nanoparticles synthesized from a native *Escherichia* sp. as photocatalysts for azo dye degradation and treatment of textile effluents. *Environmental Pollution*. 2019; 257: 113514.
- (14) Das S, Lyla PS, Khan SA. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current science*. 2006; 1325-1335.
- (15) Washington JA, Sutter VL. Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution procedures. In: Lennette EH, Balows A, Hausler JR and WJTruant J. editors. *Manual of clinical microbiology*, 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1980; p. 453-458.

سپاسگزاری

این مقاله پژوهشی مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشجوی بین الملل دانشگاه کردستان آقای موسی معتمد زوراب (کد رهگیری در ایران داک: ۱۵۶۸۵۰۵ تاریخ ۱۳۹۹/۰۳/۱۸) با راهنمایی دکتر مراحم آشنگر و با حمایت مالی و معنوی دانشگاه کردستان اجرا شده است که بدینوسیله، نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

References

- (1) William F, Smith Hashemi J. Foundations of materials science and engineering. McGraw-Hill; 2011.
- (2) Cioffi N, Torsi L, Ditaranto N, Tantillo G, Ghibelli L, Sabbatini L, Traversa E. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chemistry of Materials*. 2005; 17 (21): 5255-5262.
- (3) Borkow G, Gabbay, J. Copper as a biocidal tool. *Current medicinal chemistry*. 2005; 12 (18): 2163-2175.
- (4) Singh J, Dutta T, Kim KH, Rawat M, Samddar P, Kumar P. Green synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. *Journal of nanobiotechnology*. 2018; 16 (1): 84.
- (5) Bolbanabad EM, Ashengroph M, Darvishi F. Development and evaluation of different strategies for the clean synthesis of silver nanoparticles using *Yarrowia lipolytica* and their antibacterial activity. *Process Biochemistry*. 2020; 94: 319-328.
- (6) Hussain I, Singh NB, Singh A, Singh H, Singh SC. Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnology letters*. 2016; 38 (4): 545-560.
- (7) Singh P, Kim YJ, Zhang D, Yang DC. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends in*

- (16) 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.
- (17) Nasrollahzadeh M, Momeni SS, Sajadi SM. Green synthesis of copper nanoparticles using *Plantago asiatica* leaf extract and their application for the cyanation of aldehydes using K₄Fe(CN)₆. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2017; 506: 471-477.
- (18) Singh R, Wagh P, Wadhvani S, Gaidhani S, Kumbhar A, Bellare J, et al. Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *International Journal of Nanomedicine*. 2013; 8: 4277-4290.
- (19) Bergey DH, Holt JG. Williams, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1994.
- (20) Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 1991; 173 (2): 697-703.
- (21) Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 2016; 33: 1870-1874.
- (22) Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016; 6: 71-79.
- (23) Ashengroph M, Sahami-Soltani M. Antimicrobial effects of extracellular copper sulfide nanoparticles synthesized from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Microbial World*. 2018; 11 (3): 243-257.
- (24) El-Saadony MT, Abd El-Hack ME, Taha AE, Fouda MMG, Ajarem JS, Maodaa SN, et al. Ecofriendly synthesis and insecticidal application of copper nanoparticles against the storage pest *Tribolium castaneum*. *Nanomaterials*. 2020; 10: 587.
- (25) Mandal S, Phadtare S, Sastry M. Interfacing Biology with Nanoparticles. *Current Applied Physics*. 2005; 5: 118-127.
- (26) Cuevas R, Durán N, Diez MC, Tortella GR, Rubilar O. Extracellular biosynthesis of copper and copper oxide nanoparticles by *Stereum hirsutum*, a native white-rot fungus from Chilean forests. *Journal of Nanomaterials*. 2015; 789089.
- (27) Hasan S. A review on nanoparticles: their synthesis and types. *Research Journal of Recent Sciences*. 2015; 4: 9-11.
- (28) Ghorbani HR, Mehr FP, Poor AK. Extracellular synthesis of copper nanoparticles using culture supernatants of *Salmonella typhimurium*. *Oriental journal of chemistry*. 2015; 31 (1): 527-529.
- (29) Hassan SED, Fouda A, Radwan AA, Salem SS, Barghoth MG, Awad MA, et al. Endophytic actinomycetes *Streptomyces* spp. mediated biosynthesis of copper oxide nanoparticles as a promising tool for biotechnological applications. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2019; 24 (3): 377-393.
- (30) Kaur P, Thakur R, Chaudhury A. Biogenesis of copper nanoparticles using peel extract of *Punica granatum* and their antimicrobial activity against opportunistic pathogens. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2016; 9 (1): 33-38.
- (31) Jayarambabu N, Akshaykranth A, Rao TV, Rao KV, Kumar RR. Green synthesis of Cu nanoparticles using *Curcuma longa* extract and their application in antimicrobial activity. *Materials Letters*. 2020; 259: 126813.
- (32) Harishchandra BD, Pappuswamy M, Antony PU, Shama G, Pragatheesh A, Arumugam VA, et al. Copper nanoparticles: A review on synthesis, characterization and applications. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology*. 2020; 5 (4): 201-210.

- 1- Cytochrome c oxidase
- 2- Chemical milling
- 3- Laser Ablation
- 4- Mechanical milling
- 5- Sputtering
- 6- Sol-gel
- 7- Pyrolysis
- 8- top-down
- 9- bottom-up
- 10- Salvadori
- 11- *Hypocrea lixii*
- 12- Shantkriti
- 13- Rani
- 14- *Pseudomonas fluorescens*
- 15- Tiwari
- 16- *Bacillus cereus* strain SWSD1
- 17- Nabila
- 18- Kanabiran
- 19- Noman
- 20- *Escherichia* sp.
- 21- Biocatalyst
- 22- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- 23- E. Merck, Darmstadt, Germany
- 24- QUELAB, Engalnd
- 25- Egg Yolk Agar
- 26- HiMedia, India
- 27- Muller Hinton Agar
- 28- Mi-bacterial Genomic DNA Isolation Kit mi-BD 100, Germany
- 29- Polymerase chain reaction
- 30- Agar dilution method
- 31- Spot plate method
- 32- Resting cell
- 33- Biomass
- 34- UV-Vis spectrophotometer Specord 210, Germany
- 35- Scanning electron microscopy (SEM)
- 36- King's B medium
- 37- Mi-bacterial Genomic DNA Isolation Kit mi-BD 100
- 38- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- 39- *Escherichia coli*
- 40- *Staphylococcus aureus*
- 41- *Pseudomonas syringae*
- 42- *Xanthomonas campestris*
- 43- Field emission scanning electron microscopy; TESCAN Mira 3-LMu, Czech Republic
- 44- Fourier transform infrared spectroscopy; Bruker Vector 22 FT-IR Spectrometer
- 45- X-ray diffractometer (Philips X'Pert-MPD)
- 46- Capping agent
- 47- *Pseudomonas grimontii*
- 48- Cuevas
- 49- Hasan
- 50- *Serratia*
- 51- Ghorbani
- 52- *Salmonella typhimurium*
- 53- Hassan
- 54- *Streptomyces zaomyceticus*
- 55- *Streptomyces pseudogriseolus*
- 56- *Bacillus licheniformis*
- 57- *Pseudomonas aeruginosa*
- 58- *Bacillus cereus*
- 59- *Micrococcus luteus*
- 60- *Salmonella enterica*
- 61- *Enterobacter aerogenes*
- 62- Reactive Oxygen Species=ROS