



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 3060-7647
13rd Year, Vol. 13, No. 50, 2024 pp. 57-79
Received: 27/10/2023 Accepted: 25/12/2023

(Research Paper)

Microbial synthesis of copper oxide nanoparticles using a new bacterial strain (*Bacillus cytotoxicus* H2-7) and investigating different synthesis methods and factors affecting it

Kosar Taheri

Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Vanak St., Tehran, Iran. Email:

Ali Mohammadi *

Research Center for Applied Microbiology and Microbial Biotechnology (CAMB), Alzahra University, Tehran, Iran. Email:
A.Mohammadi@Alzahra.ac.ir

Abstract:

In the present research, extracellular green synthesis of copper oxide nanoparticles was studied through a simple rapid and environmentally friendly approach using a new bacterial strain isolated from Hoz Sultan Qom lake (*Bacillus cytotoxicus* H2-7). In addition to the different synthesis methods, the factors influencing the production such as salt type, concentration, temperature, pH and shaker cycle on the production of copper oxide nanoparticles were investigated based on the amount of UV-vis absorption. CuSO₄.H₂O salt at a concentration of 5 mM as the best precursor salt, a stirring speed of 150 rpm at a physiological pH of 7 and an optimal temperature of 30 degrees Celsius resulted in the synthesis of copper oxide nanoparticles with maximum efficiency. After optimizing the growth conditions, the produced nanoparticles were characterized using different UV-Vis, FTIR, XRD, DLS and zeta potential techniques. The produced nanoparticles had absorption in the range of 250-300 nm. The average particle size was 50-80 nm with spherical morphology. Also, the antibacterial activity of copper oxide nanoparticles against *E.coli* ATCC11725 and *S.aureus* ATCC25923 bacteria was investigated by agar well and microdilution methods. The present study can be developed to develop a controlled and scalable process for bacteriosynthesis of nanoparticles that can be used for diverse applications in various industries.

Keywords: antibacterial; copper oxide nanoparticles; Metal resistant bacteria

*Corresponding Author

3060-7647/ © 2024 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



Taheri, K. & Mohammadi, A. Microbial synthesis of copper oxide nanoparticles using a new bacterial strain (*Bacillus cytotoxicus* H2-7) and investigating different synthesis methods and factors affecting it. *Journal of Microbial Biology*, 2024; 13 (50): 57-79.

<https://doi.org/10.22108/bjm.2024.139609.1568>

Introduction:

Copper is one of the most consumed materials in the world. It is very important in all industries, especially in the electricity sector due to its low cost. It also plays various roles in humans, including the role of cofactor for several enzymes involved in neuropeptide production, regulation of cell signaling pathways, antioxidant defense, and immune cell function. Copper is required for a variety of metabolic and physicochemical processes in plants. It is considered one of the most important trace elements for plant growth. It is present in very small amounts in both humans and plants and helps to regulate various metabolic and biological activities due to its cofactor role. This substance is responsible for the normal function of various essential proteins and enzymes such as amino oxidase, cytochrome c oxidase and plastocyanin. On the other hand, copper oxide has antimicrobial, antibacterial, antifungal, biocidal, superconducting, catalytic, and optical properties. Based on this, the copper nanoparticles (CuNPs) as a promising bioactive agent for use in various industries has been considered, among which its green synthesis, especially with the help of microorganisms, has received much attention from researchers. In addition, the use of bacteria isolated from a challenging environment such as saline habitats is of double importance due to their potential for fine-tuning the stability, size and shape of NPs. Meanwhile, the synthesis of nanoparticles relies on the capacity of bacteria to tolerate toxic levels of heavy metals, and these microbes synthesize nanoparticles under stress by reducing metal ions to their metal oxides.

Material & Methods:

In the present research, extracellular green synthesis of copper oxide nanoparticles was studied through a simple, environmentally friendly and rapid approach using a new bacterial strain isolated from Hoz Sultan Qom lake (*Bacillus cytotoxicus* H2-7). The samples were collected in October 2019 from Hoz Sultan salt lake (34°58'58.2" 50°54'11.1" E), which is located about 40 km northeast of Qom and 85 km south of Tehran, Iran. Water, saline mud, salt and saline soil samples were separated in specific places, both on the surface and at a depth of up to 10 cm. At the time of sampling, the temperature varied between 19 and 22 degrees Celsius. After transferring the samples to the laboratory, the pH was determined to be 6.4-8.3. After collecting the samples in sterile plastic containers, they were cultured 24 hours later and immediately stored in a refrigerator at 4 degrees Celsius. For relatively halophilic bacteria, samples were cultured on nutrient agar and nutrient broth with 10% and 20% sea salt (g/l), respectively. The tolerance of bacterial isolates to copper was determined using the maximum tolerable concentration (MTC) method. In order to achieve the final concentration of copper ions in the ranges of 0.5, 1, 2.5 and 5 mM, test plates (nutrient agar) were prepared by adding different amounts of copper sulfate. The selected isolate was identified based on physiological, morphological and biochemical characteristics. After that, it was molecularly identified to confirm the identity of the isolated bacteria. For the extracellular synthesis of copper oxide nanoparticles, the bacterial isolate with the maximum amount of MTC was selected. Cell-free extract, supernatant, living and dead biomass methods were used in this research. In addition to the different synthesis methods, the factors influencing the production such as the type of salt, concentration, temperature, pH and shaker cycle and optimizing the production of copper oxide nanoparticles based on the amount of UV-vis absorption were investigated.

Discussion of Results & Conclusions:


Screening of bacteria from saline soil and saline mud of Hoz Sultan salt lake led to the isolation of 30 isolates based on optimal growth in environments with different concentrations of salt. Among all isolates, 15 isolates are moderately halophilic (10%) and 11 are extremely halophilic (20%). In

order to synthesize copper nanoparticles extracellularly, the bacterial isolate with the highest MTC value was selected (*Bacillus cytotoxicus* H2-7). According to the preliminary experiments, the cell-free extract method was chosen for the synthesis of copper oxide nanoparticles. The reason for choosing this method is that it is fast and does not require the separation of culture medium compounds and cell components from produced nanoparticles. Accordingly, the nanoparticles produced by this method are purer. After adding copper sulfate salt to the cell extract, the color changes from blue to deep green. This color change is due to reduction of copper ion to copper nanoparticles. When copper sulfate salt solution is exposed to cellular enzymes, the reduction process occurs; As a result, the color change can be considered the first sign of the production of copper oxide nanoparticles. 10 minutes after the addition of copper sulfate salt to the cell extract of isolate H2-7, a green precipitate was formed at the end of Erlen, which indicated the beginning of the copper ion reduction process. After the 48-hour incubation period, the color of the reaction solution changed to a deep green color, which indicated the production of copper oxide nanoparticles. Previous studies showed that the best time for the incubation and production of copper oxide nanoparticles in a single phase and with the highest production rate is between 36-48 hours, which was also achieved in our study. $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ at a concentration of 5 mM as the best precursor salt, a stirring speed of 150 rpm at a physiological pH of 7 and an optimal temperature of 30 degrees Celsius resulted in the synthesis of copper oxide nanoparticles with maximum efficiency. After optimizing the growth conditions, the produced nanoparticles were characterized using different UV-Vis, FTIR, XRD, DLS and zeta potential techniques. The produced nanoparticles had absorption in the range of 250-300 nm. The average particle size was 50-80 nm with spherical morphology. Also, the antibacterial activity of copper oxide nanoparticles against *E.coli* ATCC11725, *S.aureus* ATCC25923 was investigated by Agar well diffusion and microdilution methods. The present study can be used to develop a controlled and scalable process for bacteriosynthesis of nanoparticles that can be used for diverse applications in various industries.

سنتر میکروبی نانوذرات اکسید مس با استفاده از سویه باکتری جدید (*Bacillus cytotoxicus* H2-7) و بررسی روش‌های مختلف سنتر و عوامل مؤثر بر آن

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران
kade_a55@yahoo.com
مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی و بیوتکنولوژی میکروبی (CAMB)؛ دانشگاه الزهراء، تهران، ایران
A.Mohammadi@alzahra.ac

کوثر طاهری

علی محمدی * 

چکیده

در تحقیق حاضر، سنتر سبز خارج سلولی نانوذرات اکسید مس از طریق یک رویکرد ساده، سازگار با محیط زیست و سریع، با استفاده از یک سویه باکتریایی جدید جدا شده از دریاچه حوض سلطان قم (*Bacillus cytotoxicus* H2-7) مطالعه شد. علاوه بر آن، روش‌های مختلف سنتر، عوامل تأثیرگذار بر تولید مانند نوع نمک، غلظت، درجه حرارت، pH و دور شیکر بر تولید نانوذرات اکسید مس براساس میزان جذب UV-vis بررسی شدند. نمک $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ در غلظت ۵ میلی‌مولار به‌عنوان بهترین نمک پیش‌ساز، سرعت هم‌زدن ۱۵۰ دور در دقیقه در pH فیزیولوژیکی برابر با ۷ و دمای بهینه ۳۰ درجه سانتی‌گراد باعث سنتر نانوذرات اکسید مس با حداکثر بازده شد. پس از بهینه‌سازی شرایط رشد، نانوذرات تولید شده با استفاده از تکنیک‌های مختلف Vis-UV، FTIR، XRD، DLS و پتانسیل زتا مشخص شدند. نانوذرات تولید شده در محدوده ۳۰۰-۲۵۰ نانومتر جذب داشتند. متوسط اندازه ذرات ۸۰-۵۰ نانومتر با مورفولوژی کروی بود. همچنین فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید مس علیه باکتری‌های *S. aureus* ATCC25923، *E. coli* ATCC11725 با روش‌های انتشار از چاهک بر سطح آگار و میکروداپلوشن بررسی شد. مطالعه حاضر را برای توسعه یک فرایند کنترل شده و مقیاس پذیر برای باکتریوسنتر نانوذرات می‌توان توسعه داد که برای کاربردهای متنوع در صنایع مختلف استفاده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌باکتریال، نانوذرات اکسید مس، باکتری‌های مقاوم به فلز

* نویسنده مسئول مکاتبات

طاهری، کوثر و محمدی، علی. سنتر میکروبی نانوذرات اکسید مس با استفاده از سویه باکتری جدید (*Bacillus cytotoxicus* H2-7) و بررسی روش‌های مختلف سنتر و عوامل مؤثر بر آن. زیست‌شناسی میکروبی. ۱۴۰۳، ۱۳ (۵۰): ۵۷-۷۹. <https://doi.org/10.22108/bjm.2024.139609.1568>

مقدمه

دارند. در روش داخل سلولی، سلول میکروبی دارای سیستم انتقال یون است. به دلیل تعامل الکتروستاتیک، دیواره سلولی که دارای بار منفی است، بار مثبت یون‌های فلزی را جذب می‌کند. علاوه بر آن، دیواره سلولی حاوی آنزیم‌هایی است که یون‌های فلزی را از طریق احیا به نانوذرات آن فلز تبدیل می‌کند. این مکانیسم شامل مراحل به دام انداختن یون فلزی، کاهش و پوشش گذاری است؛ درحالی که در روش خارج سلولی، سلول میکروبی ردوکتازهایی را ترشح می‌کند که این آنزیم‌ها موجب احیای یون فلزی می‌شوند (۱). سنتر خارج سلولی شامل ترشح آنزیم و سپس کاهش یون فلزی و پوشش گذاری نانوذرات تولید شده است. یافته‌های حاصل از پژوهش‌ها بیان می‌کنند تولید خارج سلولی نانوذرات به دلیل ساده‌تر بودن و خلوص بیشتر بر تولید درون سلولی ارجحیت دارد (۶).

مطالعات نشان داده‌اند متابولیت‌ها و آنزیم‌های ثانویه موجود در باکتری‌ها مسئول تشکیل نانوذرات در فرایندهای خارج سلولی هستند. به همین دلیل، یک سیستم باکتریایی منبع بالقوه‌ای برای بیوسنتر خارج سلولی نانوذرات فلزی بدون استفاده از حلال‌های سمی است (۷).

تاکنون نانوذرات فلزی مختلفی مانند اکسید آهن مغناطیسی (۸)، اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم (۴) سنتر شده‌اند. علاوه بر این، این مطالعات گزارش کردند برخی از این نانوذرات فلزی دارای فعالیت‌های بیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلفی هستند که در این میان، اخیراً به CuNPها توجه شده است.

مس یکی از پرمصرف‌ترین مواد در جهان است، در تمام صنایع به‌ویژه در بخش برق به دلیل هزینه کم، اهمیت زیادی دارد و همچنین نقش‌های مختلفی در انسان دارد؛ از جمله نقش کوفاکتور برای آنزیم‌های

باکتری‌ها به‌طور مداوم در معرض شرایط محیطی سخت ناشی از غلظت بالای یون‌های فلزات سنگین در محیط اطراف خود هستند. با این حال، باکتری‌ها در طول تکامل، مکانیسم‌های دفاعی مختلفی را مانند جداسازی درون سلولی، پمپ‌های خروجی، تغییر در غلظت یون فلزی و رسوب گذاری خارج سلولی را برای مقابله با استرس ناشی از فلزات کسب کرده‌اند (۱). آن‌ها توانایی منحصربه‌فردی در کاهش یون‌های فلزی به نانوذرات فلزی دارند و همچنین به دلیل سهولت کارکرد، نرخ رشد بالا و امکان دستکاری ژنتیکی، یکی از گزینه‌های مطلوب برای تولید زیستی نانوذرات محسوب می‌شوند (۲).

رویکردهای بیولوژیکی، فیزیکی و شیمیایی مختلفی برای سنتر نانوذرات فلزی پیشنهاد شده است. بیونانو تکنولوژیست‌ها علاقه زیادی به بیوسنتر CuNPهای فلزی دستکاری نشده در یک فاز آبی دارند؛ زیرا به دلیل تمایل مس به اکسید شدن سریع در دمای اتاق، سنتر مس پایدار با اندازه و شکل مطلوب و کنترل شده را بسیار دشوار می‌کند. به‌طور کلی، اسید اسکوربیک، اتیلن گلیکول، هیدرازین، بورو هیدرید سدیم و هیپوفسیت سدیم به‌عنوان عوامل تثبیت کننده در سنتر CuNPs استفاده می‌شوند (۳). در این میان، روش‌های بیولوژیکی، به‌ویژه روش‌های مبتنی بر باکتری، به دلیل ویژگی‌های عالی‌شان، مانند عدم نیاز به عوامل پایدار و تثبیت کننده خارجی، هزینه کمتر و سهولت دستکاری سلول، نسبت به سایرین مزایای برتری دارند (۴). به‌طور کلی، تشکیل نانوذرات فلزی می‌تواند به‌صورت خارج سلولی یا درون سلولی انجام شود (۵). میکروارگانیزم‌های مختلف توانایی تولید نانوذرات فلزی را از هر دو طریق درون سلولی و برون سلولی

محیط سخت است. این مطالعه به سنتز سبز نانوذرات مس با استفاده از یک باکتری جدید *Bacillus cytotoxicus H2-7* جدا شده از دریاچه حوض سلطان در ایران در شرایط رشد بهینه اختصاص یافته است. نانوذرات اکسید مس بیوسنتز شده توسط UV-vis, FE-SEM, FTIR, DLS, XRD آنالیز شدند و در نهایت، فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس بیوسنتز شده تعیین شدند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها در اکتبر ۲۰۱۹ از دریاچه نمک حوض سلطان (۳۴°۵۸'۲۵" N، ۵۰°۵۴'۱۱" شرقی) جمع‌آوری شدند که در حدود ۴۰ کیلومتری شمال شرقی قم و ۸۵ کیلومتری جنوب تهران، ایران قرار دارد. نمونه‌های آب، گل شور، نمک و خاک شور در مکان‌های خاص، هم در سطح و هم در عمق تا ۱۰ سانتی‌متر جداسازی شدند. در زمان نمونه‌برداری، دما بین ۱۹ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد متغیر بود. pH محیط پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه ۸/۳-۶/۴ تعیین شد. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری در ظروف پلاستیکی استریل، ۲۴ ساعت بعد کشت داده شدند و بلافاصله در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای باکتری‌های نسبتاً هالوفیلیک، نمونه‌ها به ترتیب روی نوترینت آگار و برات غذایی با ۱۰ و ۲۰ درصد نمک دریایی (g/l) کشت داده شدند (NaBr 0.026, NaHCO₃ 0.06, KCl₂ 2, CaCl₂ 3.6, MgCl₂.H₂O 7.0, (MgSO₄.7H₂O 9.7, and NaCl 81 (۱۱).

بررسی تحمل فلزی جدایه‌های باکتریایی

توانایی تحمل جدایه‌های باکتریایی نسبت به مس با استفاده از روش حداکثر غلظت قابل تحمل (MTC) تعیین شد. به منظور دستیابی به غلظت نهایی یون مس در

متعددی که در تولید نوروپتید، تنظیم مسیر سیگنال‌دهی سلولی، دفاع آنتی‌اکسیدانی و عملکرد سلول‌های ایمنی نقش دارند. مس برای انواع فرایندهای متابولیک و فیزیوشیمیایی گیاهان مورد نیاز است، یکی از مهم‌ترین عناصر کمیاب برای رشد گیاه محسوب می‌شود، هم در انسان و هم در گیاهان به مقدار بسیار کم وجود دارد و به دلیل نقش کوفاکتوری به تنظیم فعالیت‌های متابولیکی و زیستی مختلف کمک می‌کند. این ماده مسئول عملکرد طبیعی پروتئین‌ها و آنزیم‌های ضروری مختلف مانند آمینواکسیداز، سیتوکروم c اکسیداز و پلاستوسیانین است. از سوی دیگر، اکسید مس دارای خواص ضدباکتریایی، ضد میکروبی، ضدقارچی، زیست‌کشی (بیوسیدال)، ابررسانایی، کاتالیزوری و نوری است (4). براساس این، استفاده از نانوذرات مس (CuNPs) به عنوان یک عامل زیست فعال امیدوارکننده برای به کارگیری در صنایع مختلف درخور توجه قرار گرفته است که در این میان محققان به سنتز سبز آن به خصوص با کمک میکروارگانیسم‌ها بسیار توجه کرده‌اند. ضمن اینکه استفاده از باکتری‌های جدا شده از یک محیط چالش برانگیز مانند زیستگاه‌های نمکی، به دلیل داشتن پتانسیل برای تنظیم دقیق پایداری، اندازه و شکل NPها، از اهمیت دوچندانی برخوردار است (9) که در این میان سنتز نانوذرات به ظرفیت باکتری‌ها برای تحمل سطوح سمیت فلزات سنگین متکی است و این میکروب‌ها با احیای یون‌های فلزی به اکسید فلز خود، نانوذرات را تحت استرس سنتز می‌کنند (10). با این حال، مطالعات مربوط به سنتز باکتریایی نانوذرات اکسید مس به ویژه با استفاده از باکتری‌های جدا شده از محیط‌های چالش برانگیز محدود است. به همین دلیل، رویکرد بیوسنتز نانوذرات اکسید مس در این تحقیق شامل استفاده از میکروارگانیسم‌های جدا شده از یک

سنتز زیستی برون سلولی نانوذرات توسط عصاره عاری از سلول

برای سنتز خارج سلولی نانوذرات اکسید مس، ایزوله باکتریایی با حداکثر مقدار MTC انتخاب شد. در این تحقیق از روش‌های عصاره بدون سلول، مایع رویی، زیست توده زنده و مرده استفاده شد. باکتری منتخب شناسایی شده (*Bacillus cytotoxicus H2-7*) با شماره دسترسی OK175630.1 در پایگاه داده (NCBI) در محیط کشت براث تلقیح شد و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با هم‌زدن ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه شد. هر دو زیست توده و مایع رویی پس از سانتریفیوژ شدن کشت در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه برای مطالعه بعدی جمع‌آوری شدند. زیست توده زنده به‌عنوان زیست توده معلق در ۲۰ میلی لیتر آب یونیزه استریل شده با $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ۵ میلی مولار ترکیب داده شد. مقدار کافی زیست توده زنده برای زیست توده مرده جمع‌آوری شد و در ۱۵ psi به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو شد. در روش رویی، ۱۰۰ میلی لیتر مایع رویی به ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه حاوی $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ اضافه شد. پس از آن، هر دو روش (زیست توده و مایع رویی) در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با هم‌زدن ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه شدند تا فرایند بیوسنتز آغاز شود. تولید نانوذرات اکسید مس از طریق مشاهده تغییر رنگ و طیف‌سنجی ماورای بنفش - مرئی UV-vis ارزیابی شدند. این روش از بین پنج روش استفاده شده انتخاب شد. برای این کار، فلاسک حاوی براث مواد مغذی استریل با کشت خالص سویه H2-7 تلقیح شد و فلاسک به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه انکوبه شد. پس از سانتریفیوژ، ۲ درصد وزنی از زیست توده باکتریایی به ۱۰۰ میلی لیتر آب

محدوده‌های ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ میلی مولار، پلیت‌های آزمایشی (نوترینت آگار) با افزودن مقادیر مختلف سولفات مس تهیه شد. به‌عنوان شاهد، از صفحات بدون یون مس استفاده شد. پس از تقسیم هر پلیت به چهار بخش مساوی، باکتری‌های جداشده (1.08×10^5 ml/CFU) روی سطح محیط کشت توزیع شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ روز پس از تلقیح برای مشاهده رشد باکتری انکوبه شدند. MTC به‌عنوان حداکثر غلظت یون مس در محیطی تعریف شد که باکتری‌ها را قادر می‌کند در هر سه تکرار رشد کنند.

شناسایی جداییه باکتریایی

جدایه انتخاب شده براساس ویژگی‌های فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی و پس از آن، برای تأیید هویت باکتری‌های جداشده، به‌صورت مولکولی شناسایی شد. تکنیک استخراج DNA ژنومی پیشنهاد شده در این مقاله شامل جوشاندن ساده است (۱۲). عصاره‌های DNA دست‌نخورده به‌عنوان الگو برای تکثیر PCR 16s rDNA با استفاده از پرایمرهای جهانی با توالی نوکلئوتیدی 5'-8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) و 3'-CACGGATCCTACGGGTACCTTGTTACGACTT (3) و دمای ذوب ۵۵ درجه سانتی گراد استفاده شدند. الکتروفورز در ژل آگارز برای آنالیز مقدار کمی محصول PCR استفاده شد. باندهای DNA مشاهده شدند و تصاویر با استفاده از UVP به دست آمدند. نزدیک‌ترین گونه‌ها با مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل با استفاده از خدمات شبکه اصلی ابزار جست‌وجوی هم‌ترازی محلی (BLAST) پایگاه داده NCBI شناسایی شدند. سپس توالی‌ها برای دریافت شماره‌های الحاق به GenBank ارسال شدند.

Shimadzu، توکیو، ژاپن) برای تشخیص طیف UV-Vis تشکیل نانوذرات اکسید مس در محدوده ۲۰۰-۸۰۰ نانومتر استفاده شد. (WALLIS) Tech Cordouan، 2VASCO (فرانسه) برای انجام پراکندگی نور پویا (DLS) و پتانسیل زتا استفاده شد. (MIRA) Tescan II، جمهوری چک) با تجهیزات SEM-FE برای انجام طیف‌سنجی پراکنده انرژی (EDS) روی نمونه‌های خشک‌شده استفاده شد. دستگاه طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) در محدوده ۴۰۰-۴۰۰۰ سانتی‌متر^{-۱} - با استفاده از اسپکتروفتومتر TENSOR 27 انجام شد تا مشخص شود کدام ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره باکتری در کاهش و تثبیت نانوذرات اکسید مس نقش دارند.

فعالیت ضدباکتریایی

انتشار چاهک بر سطح آگار

این روش در مرحله اول برای تجزیه و تحلیل فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید مس تولیدشده در برابر دو باکتری *E. coli* ATCC11725 و *S. aureus* ATCC25923 استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از یک سوپانسیون باکتریایی ۲۴ ساعته (۱,۵ × ۱۰^۸ CFU/ml) با استفاده از یک میله L شکل روی محیط کشت پخش شد. نانوذرات اکسید مس سنتز شده در آب مقطر رقیق شده و غلظت‌های مختلف آن (۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به کار گرفته شد و سپس محیط کشت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. قطر (mm) ناحیه بازدارنده اندازه‌گیری و ثبت شد (۱۵).

استریل شده اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط مشابهی گرماگذاری شد که قبلاً توضیح داده شد. مایع رویی به دست آمده پس از سانتریفیوژ با عصاره بدون سلول یکسان بود. ۲۰ میلی‌لیتر CuSO₄.5H₂O به فلاسک با عصاره بدون سلول اضافه شد و روی شیکر چرخشی (۱۵۰ دور در دقیقه) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. کنترل مثبت (عصاره بدون سلول) و کنترل منفی (محلول نمک پیش‌ساز خالص) با فلاسک‌های آزمایشی انکوبه شدند (۱۳). به منظور جداسازی نانوذرات تولیدشده، محلول حاوی رسوب در دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب به دست آمده با آب دیونیزه شست‌وشو داده و با دستگاه فریز درایر خشک شد.

تأثیر پارامترهای مختلف بر بیوستنز نانوذرات

اکسید مس

برای سنجش تأثیر پارامترهای مختلف در بیوستنز نانوذرات اکسید مس، پارامترهای مختلفی از جمله نمک فلزی (سولفات مس و کلرید مس)، غلظت نمک فلزی (۱۰، ۷/۵، ۵، ۲/۵ میلی‌مولار)، pH (۲، ۷، ۱۰)، درجه حرارت (۲۵، ۳۰، ۳۵ درجه سانتی‌گراد)، چرخش شیکر (۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ دور در دقیقه) بر تولید نانوذرات اکسید مس به وسیله عصاره سلولی جدایه H₂-7 سنجش شدند (۱۴). تمامی عوامل با ۳ بار تکرار، آزمایش و با استفاده از طیف‌سنجی UV-vis مقایسه شدند.

شناسایی نانوذرات سنتز شده

آزمون پراش اشعه ایکس (XRD) برای تجزیه و تحلیل نانوذرات اکسید مس سنتز شده با استفاده از پراش سنج اشعه ایکس (Holland, ۱۳۰ PW Philips) استفاده شد. یک اسپکتروفتومتر (UV ۱۸۰۰،

تعیین MIC و MBC

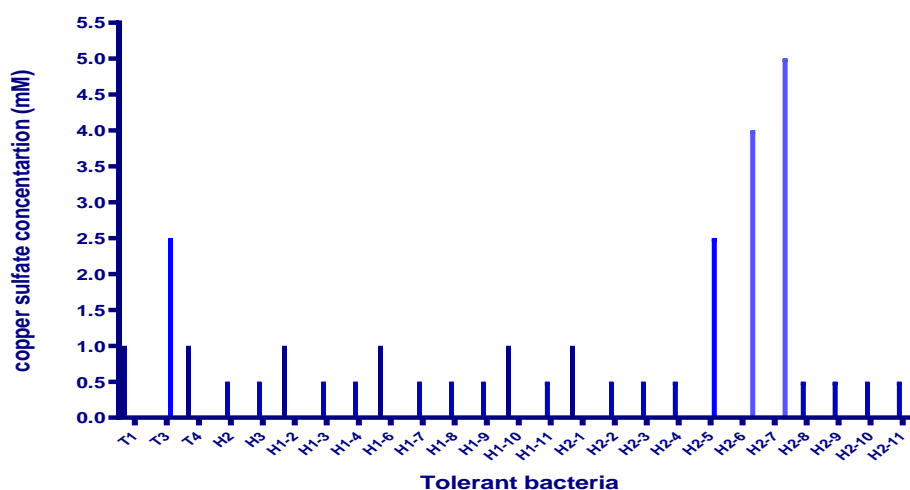
غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس ($\mu\text{g/ml}$) ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۶۰۰ با رقیق‌سازی مداوم نمونه‌ها با محیط براث غذایی در یک صفحه ۹۶ چاهی به دست آمدند. غلظت نهایی سویه‌ها براساس پروتکل‌های منتشرشده تعیین شد. جذب پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دستگاه ELISA Reader ارزیابی شد. ۱۰۰ میکرولیتر نمونه از چاه‌های بدون رشد روی نوترینت آگار قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ارزیابی حداقل غلظت باکتری کش (MBC) انکوبه شد (۱۶).

تجزیه و تحلیل آماری

یافته‌های هر آزمایش در سه تکرار اجرا شد و مایکروسافت اکسل همه آنها را به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) گزارش کرد. برای ارزیابی آماری داده‌ها از ANOVA یک‌طرفه ($p\text{-value} < 0.05$) استفاده شد.

نتیجه و بحث

غربالگری باکتری‌ها از خاک شور و گل شور دریاچه نمک حوض سلطان منجر به جداسازی ۳۰ جدایه براساس رشد بهینه در محیط‌های با غلظت‌های مختلف نمک شد. از بین تمامی جدایه‌ها، ۱۵ جدایه نسبتاً هالوفیل (۱۰ درصد) و ۱۱ جدایه فوق‌العاده هالوفیل (۲۰ درصد) هستند. به‌منظور سنتز نانوذرات مس به صورت خارج سلولی، جدایه باکتریایی با بالاترین مقدار MTC انتخاب شد. از بین ۴ سویه باکتریایی با تحمل بالا به سولفات مس، یک سویه (*Bacillus cytotoxicus H2-7*) با بیشترین جذب توسط طیف‌سنجی UV-vis انتخاب شد. برای بررسی سنتز خارج سلولی نانوذرات اکسید مس، *Bacillus cytotoxicus H2-7* انتخاب شد؛ زیرا سطح بالاتری از تحمل فلز مس را نسبت به دیگر جدایه‌های باکتری نشان داد که همین امر باعث می‌شود ضمن رهاشدن از اثرات سمی فلز سنگین بتواند با ظرفیت بیشتری آن را به نانوذرات تبدیل کند.



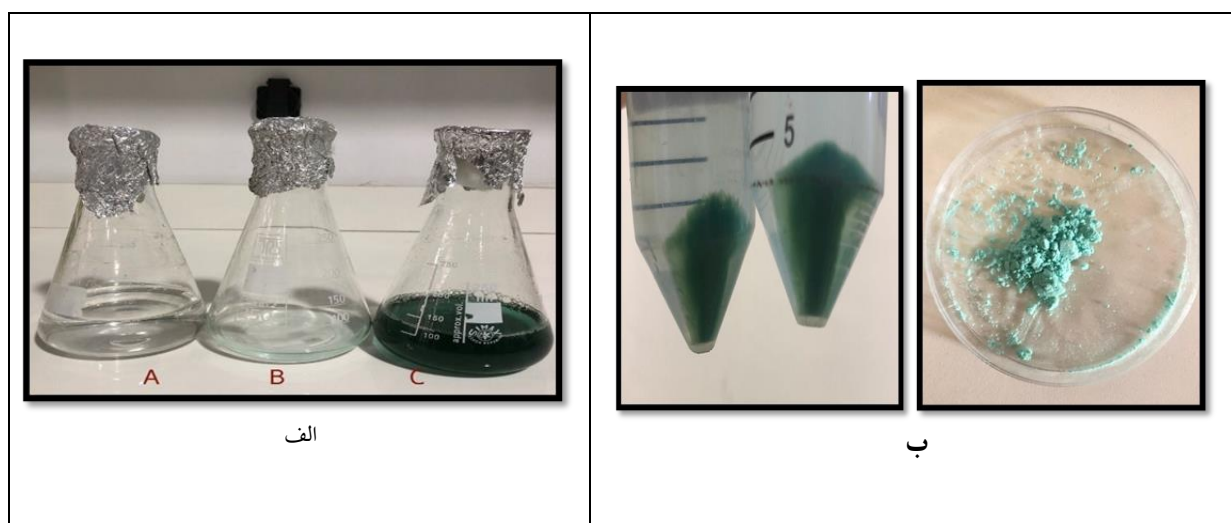
شکل ۱. مشخصات تحمل به غلظت‌های مختلف سولفات مس توسط جدایه‌های باکتریایی که جدایه H2-6 و H2-7 به ترتیب بالاترین میزان تحمل را نشان دادند.

Figure 1. isolates bacterial by sulfate copper of concentrations different to tolerance of Characteristics, H2-7 and H2-6 isolates showed the highest levels, respectively.

بررسی تولید نانوذرات

در این مرحله با توجه به آزمایش‌های اولیه، روش عصاره‌گیری از سلول برای سنتز نانوذرات اکسید مس انتخاب شد. علت انتخاب این روش سریع بودن و عدم نیاز به جداسازی ترکیبات محیط کشت و اجزای سلولی از نانوذرات تولیدی است. براساس واین، نانوذرات تولیدشده با این روش خالص‌تر هستند (۱۷). پس از اضافه شدن نمک مس سولفات به عصاره سلولی، تغییر رنگ از آبی به سبز پررنگ رخ می‌دهد. این تغییر رنگ به علت احیای یون مس به نانوذرات مس است. هنگامی که محلول نمکی مس سولفات در معرض آنزیم‌های سلولی قرار می‌گیرد، فرایند احیا رخ می‌دهد؛ در نتیجه،

تغییر رنگ را می‌توان اولین نشانه تولید نانوذرات اکسید مس به حساب آورد (۱۸). ۱۰ دقیقه پس از افزودن نمک مس سولفات به عصاره سلولی جدایه H2-7 رسوب سبز رنگی در انتهای ارلن تشکیل شد که بیان‌کننده آغاز فرایند احیای یون مس بود. پس از سپری شدن دوره ۴۸ ساعته انکوباسیون، رنگ محلول واکنش به رنگ سبز پررنگ تغییر پیدا کرد که بیان‌کننده تولید نانوذرات اکسید مس بود. مطالعات قبلی نشان دادند بهترین زمان برای انکوباسیون و تولید نانوذرات اکسید مس به صورت تک‌فاز و با بیشترین میزان تولید بین ۳۶-۴۸ ساعت است (۱۹) که در مطالعه ما نیز چنین نتیجه‌ای حاصل شد.



شکل ۲. ۱) سنتز نانوذرات اکسید مس توسط عصاره جدایه H2-7 پس از ۴۸ ساعت (الف: کنترل عصاره سلولی H2-7 به همراه آب مقطر ب: کنترل نمک مس سولفات ج: عصاره سلولی به همراه نمک مس سولفات). ۲) رسوب شسته شده حاصل از سانتریفیوژ محلول حاوی نانوذرات

اکسید مس تولیدشده توسط جدایه H2-7

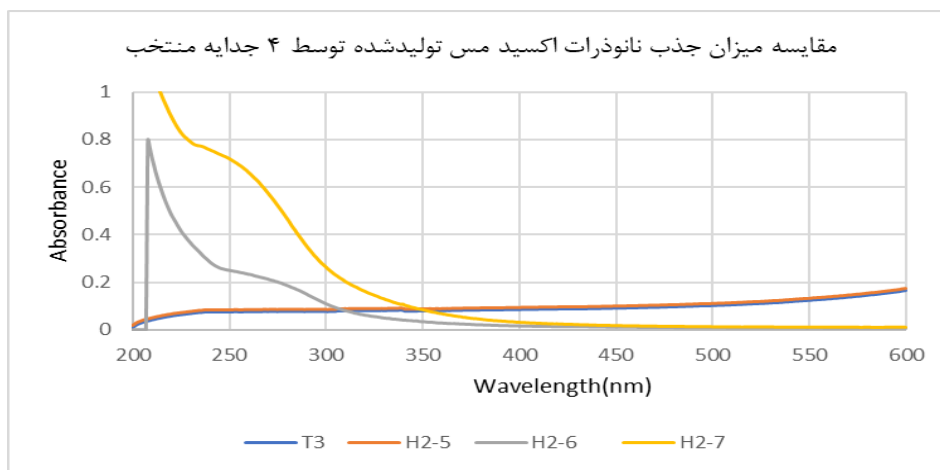
Figure 2. 1) H by nanoparticles oxide copper of Synthesis2-7 after extract isolate 48 H :A hours 2-7 with control extract cell .(ltsa sulfate copper with extract cell :C control salt sulfate copper :B water distilled2) from obtained precipitate Washed H by produced nanoparticles oxide copper containing solution a of centrifugation2-7. isolation

دارای پیک هستند (۲۰). طیف جذبی هر چهار جدایه در طول موج ۲۰۰-۸۰۰ نانومتر خوانده شد. جدایه‌های T3 و H2-5 در محدوده ۲۰۰-۳۰۰ نانومتر هیچ‌گونه

علاوه بر تغییر رنگ، تولید نانوذرات با مشاهده پیک SPR در ناحیه ۲۰۰-۳۰۰ نانومتر توسط طیف‌سنجی UV-vis بررسی شد. نانوذرات اکسید مس در این ناحیه

شد. در پژوهش Tiwari که توسط *Bacillus cereus* صورت گرفته بود، دو پیک SPR، یکی در ناحیه ۳۰۰-۲۰۰ نانومتر و دیگری در ناحیه ۶۳۰-۵۷۰ شکل گرفته بود که نشان‌دهنده تولید نانوذرات به صورت اکسید مس و مس بود (۲۲). علاوه بر آن، پیک SPR ایجاد شده در پژوهش El-Saadony که با استفاده از *Pseudomonas fluorescens* اقدام به تولید نانوذرات مس کردند، در محدوده ۵۵۰-۶۰۰ نانومتر بود که این امر نشان‌دهنده تفاوت پیک جذبی نانوذرات مس و نانوذرات اکسید مس است (۱۴).

پیک ایجاد نکردند که به معنای عدم تولید نانوذرات توسط این دو جدایه است. دو جدایه H2-6 و H2-7 در ناحیه ذکر شده بین ۳۰۰-۲۵۰ نانومتر پیک SPR داشتند که به معنای تولید نانوذرات اکسید مس است (۲۱). پیک جذبی جدایه H2-7 نسبت به H2-6 بیشتر بود که می‌تواند به علت تولید بیشتر نانوذره، اندازه بیشتر ذرات یا پایداری بیشتر آنها باشد. علاوه بر آن، تغییر رنگ به علت احیای بیشتر یون مس در این سویه بیشتر بود. به همین دلیل، سویه H2-7 به عنوان جدایه منتخب این پژوهش انتخاب شد و مابقی آزمایشات توسط این جدایه انجام



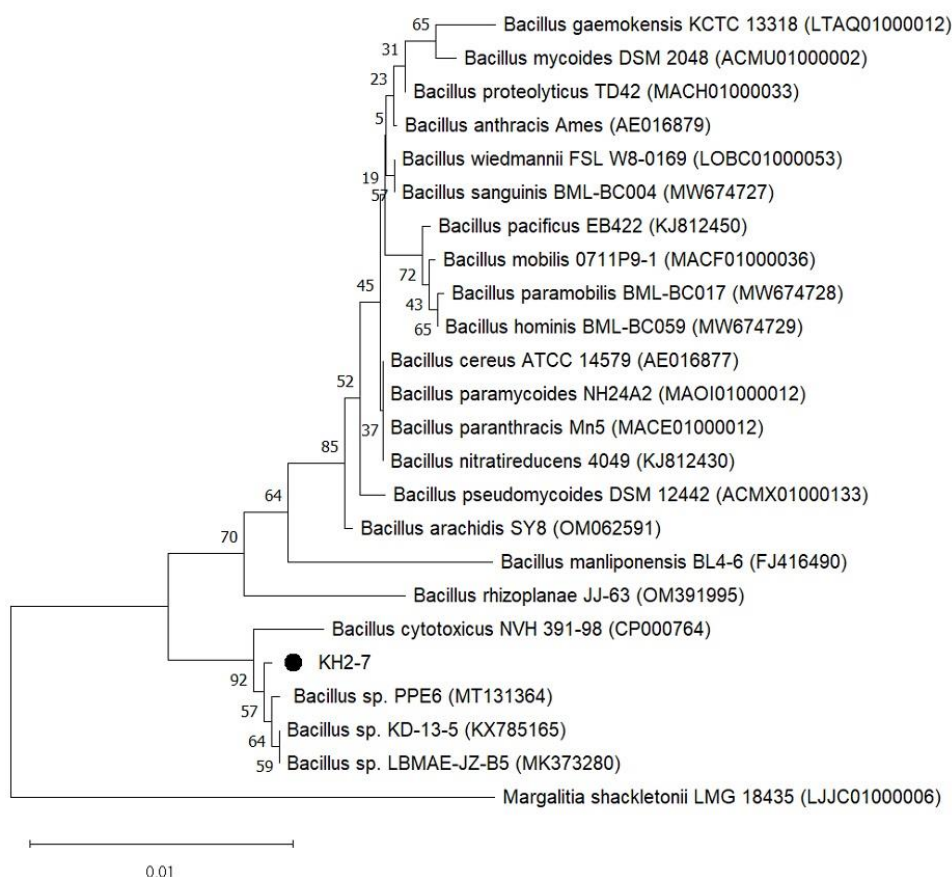
شکل ۳. مقایسه تولید نانوذرات اکسید مس توسط جدایه‌های منتخب در شرایط یکسان دما، pH و دور شیکر

Figure 3. of conditions same the under isolates selected by nanoparticles oxide copper of production of Comparison cycle shaker and pH ,temperature

و تحلیل بیوشیمیایی همچنین تأیید کرد که سویه متعلق به جنس باسیلوس است. این سویه احتمالاً به عنوان سویه جدید باسیلوس سوبتیلیس طبقه‌بندی می‌شود. براساس تجزیه و تحلیل توالی ژن 16s rDNA، درخت فیلوژنتیک با روش همسایه-جوینینگ ترسیم شد (شکل ۴) و موقعیت این سویه در بین گونه‌های دیگر نشان داده شد.

شناسایی ایزوله باکتریایی

پس از تعیین توالی ژن 16s rDNA سویه مدنظر و انفجار آن در محل NCBI، سویه انتخابی شناسایی شد. براساس نتایج حاصل از بلاست، این سویه شباهت ۹۹ درصدی با سویه‌های متعلق به *Bacillus subtilis* داشت. پس از تعیین توالی ژن 16s rDNA، این ژن با شماره دسترسی OK175630.1 در پایگاه داده ژن ثبت شد. تجزیه



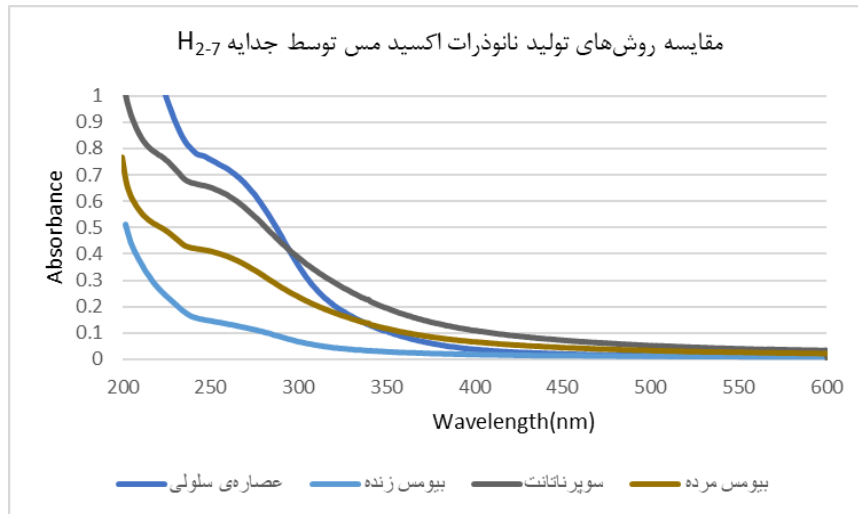
شکل ۴- درخت فیلوژنی سویه H2-7 و اعضای دیگر جنس *Bacillus* بر مبنای ژن تکثیر یافته 16S rDNA

Figure 4. H strain of tree Phylogeny 2-7 amplified the on based *Bacillus* genus the of members other and 16 gene rDNA S

روش‌های دیگر برای مطالعه سنتز نانوذرات استفاده شد؛ اما روش‌های رقت، مایع رویی و زیست‌توده به‌دلایلی مانند ناخالصی نانوذرات تولیدشده و راندمان پایین کنار گذاشته شدند. پس از ۴۸ ساعت، تمام رسوبات جمع‌آوری شدند و نانوذرات با شست‌وشو با آب دیونیزه خالص و با خشک‌کن فریز خشک شدند.

بیوستنر خارج سلولی نانوذرات اکسید مس

بهترین روش با استفاده از پیک‌های جذب به‌دست‌آمده از اسپکتروفتومتر UV-vis در شکل ۵ مشخص شد. همان‌طور که مشاهده می‌کنید بالاترین پیک مربوط به روش عصاره سلولی است که با مطالعه قبلی ما نیز مطابقت دارد (۱۱). روش عصاره سلولی به دلیل کارایی بالا و پیک جذب بالاتر نسبت به



شکل ۵. مقایسه روش‌های تولید نانوذره اکسید مس به وسیله جدایه H2-7 در شرایط یکسان دما، PH و دور شیکر که روش عصاره سلولی بالاترین بازدهی را به همراه داشت.

Figure 5. isolate by methods production nanoparticle oxide copper of sonCompari H2-7 of conditions same the under efficiency highest the yielded method extract cell the ,cycle shaker and pH ,temperature

روی، مکعبی و در اندازه ۱۵ تا ۲۰ نانومتر بودند. علاوه بر این، تمایل آنها به تجمع و آگلومره شدن مشاهده شد. نکته جالب توجه اینکه استفاده از نمک‌های مختلف حتی می‌تواند بر فعالیت بیولوژیکی نانوذرات نیز تأثیر بگذارد. فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی به دست آمده از نیترات روی در برابر سویه‌های باکتریایی بارزتر بود؛ در حالی که آنهایی که با استفاده از سولفات روی تولید شدند، در برابر سویه‌های مختلف اسپرزیلوس کارآمدتر بودند (24). خلاصه اینکه نوع نمک پیش‌ساز در مقدار تولید، اندازه، شکل و پایداری نانوذرات اهمیت به‌سزایی دارد. نمک مس کلرید در مقایسه با نمک مس سولفات در تهیه نانوذرات با غلظت ۵ میلی‌مولار بررسی شد. پس از سه بار تکرار آزمایش، مشخص شد براساس میزان جذب طیف $vis-UV$ نمک سولفات مس توانایی بهتری در سنتز نانوذرات مس در مقایسه با نمک مس کلرید دارد؛ بنابراین، این نمک برای ادامه مطالعات انتخاب شد.

بررسی عوامل بهینه سنتز نوع نمک پیش‌ساز

برای به دست آوردن یک نوع NP می‌توان از نمک‌های پیش‌ساز مختلف استفاده کرد. مطالعات قبلی نشان دادند خواص نانوذرات تولیدشده از طریق رویکردهای سبزر را می‌توان به‌سادگی تحت تأثیر پیش‌ساز انتخابی قرار داد. با این حال، اطلاعات درباره اثر نمک‌های پیش‌ساز مختلف بر ویژگی‌های NP سبزر محدود است. دروپنو و همکاران نشان دادند نانوذره‌های اکسید روی با قطر تقریباً ۱۰۷ نانومتر با مخلوط کردن استات روی و عصاره برگ *Anacardium occidentale* به دست آمده‌اند. استفاده از کلرید روی منجر به سنتز نانومیله‌های اکسید روی با طول ۱۶۷ نانومتر و عرض ۶۸ نانومتر شده است. با این حال، هر دو نمونه با تجمع مواجه شدند (23). نانوذرات ZnO سنتز شده از سولفات روی دارای مورفولوژی نانومیله و اندازه متوسط ۳۰ نانومتر بودند. برعکس، نانوذرات به‌دست آمده با همان روش، اما با استفاده از نمک نیترات روی یا استات

سطوح pH

مطالعات قبلی نشان دادند شکل و اندازه نانوذرات را می‌توان با سطوح pH کنترل کرد (۲۵). پیک شناسایی شده در نمونه در pH اسیدی ۲ نشان داد که pH پایین باعث کاهش بیوسنتز نانوذرات اکسید مس می‌شود که همین امر منجر به کوچک شدن پیک جذب مربوطه شده است؛ بنابراین، بیوسنتز نانوذرات اکسید مس در این مطالعه با pH پایین محدود شد. شکل نشان می‌دهد pH ۷ بهترین شرایط برای بیوسنتز نانوذرات است. همان‌طور که قبلاً توسط ایسمیل و همکارانش بیان شد، *capsulate Rhodopseudomonas* در pH ۷ بیشترین مقدار نانوذرات طلا را تولید می‌کند (۳). رانی و شانتکریتی گزارش کردند که pH ۷ به‌عنوان pH بهینه برای تولید CuNP توسط *Pseudomonas uorescens* MTCC ۱۰۳ است (۱۸) که با نتایج به‌دست آمده ما مطابقت دارد. pH قلیایی موجب تجمع ذرات و افزایش ابعاد آنها می‌شود.

درجه حرارت

این فاکتور در سه دمای مختلف ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. مقایسه پیک‌های حاصله نشان دادند دمای بهینه برای بیوسنتز نانوذرات اکسید مس توسط عصاره بدون سلول ۳۰ درجه سانتی‌گراد است. شکل نتایج نشان داد بیوسنتز نانوذرات اکسید مس با افزایش دما کاهش می‌یابد و این کاهش می‌تواند به دلیل غیرفعال شدن یا تخریب ترکیبات زیستی در مخلوط واکنش مسئول فرایند کاهش زیستی رخ دهد (۳). با افزایش دمای واکنش در مخلوط واکنش، هم سرعت سنتز و هم تبدیل به نانوذرات مس در محیط افزایش یافت؛ این نتیجه با مطالعات دیگر مطابقت دارد که نشان داده شد سرعت سنتز و تبدیل به نانوذرات با افزایش دمای واکنش بهبود می‌یابد (۲۶).

غلظت CuSO4.H2O

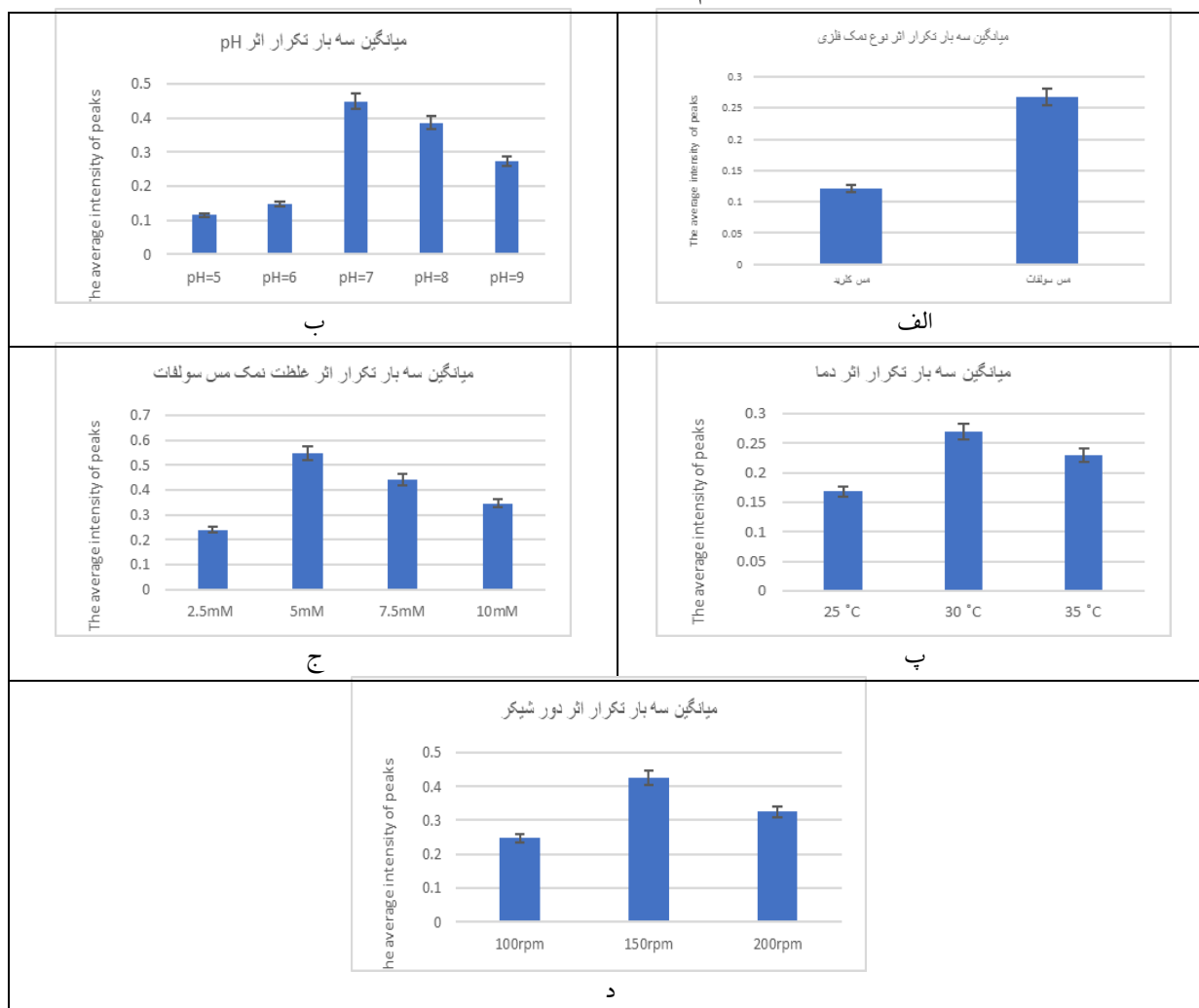
برای مطالعه تأثیر غلظت CuSO4.H2O، از غلظت‌های ۱۰، ۷/۵، ۵، ۲/۵ میلی‌مولار استفاده شد. نمونه‌های کنترل هیچ پیک مشخصی را در محدوده مربوطه نشان ندادند که نشان‌دهنده عدم تشکیل CuNPs بودند. هنگامی که عصاره سلولی با غلظت ۵ میلی‌مولار سولفات مس ۵ آبه مواجه شد، پیک جذب شفافی نمایان شد؛ اما با افزایش بیشتر غلظت نمک مس، پیک‌های بعدی کوچک‌تر شدند. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است، نتایج این قسمت نشان دادند غلظت ۵ میلی‌مولار سولفات مس بهترین غلظت برای بیوسنتز نانوذرات مس است. هنگامی که غلظت نمک از این مقدار بیشتر یا کمتر شود، میزان جذب کاهش می‌یابد. افزایش غلظت بیشتر موجب اشباع ظرفیت باکتری در سنتز نانوذرات می‌شود (۱۱). این نتایج با مطالعات قبلی نیز مطابقت دارد که با افزایش غلظت نمک مس تا یک مقدار مشخص بالاترین پیک به دست می‌آید؛ اما در اینجا افزایش غلظت موجب بالاتر رفتن پیک نمی‌شود (۳).

سرعت هم‌زدن (دور شیکر)

سرعت هم‌زدن یک عامل حیاتی در بیوسنتز و پایداری نانوذرات است. احتمال تماس یون‌های فلزی با مولکول‌های زیستی در مخلوطی بیشتر است که پیوسته هم زده می‌شود؛ بنابراین، رابطه بین سرعت واکنش سنتز و سرعت هم‌زدن باید مستقیماً متناسب باشد. این نقش هم‌زدن زمانی تأیید شد که نانوذرات آهن با استفاده از زیست‌توده قارچی سنتز شدند. آنالیزهای Vis-UV نشان دادند جذب مخلوط هم‌زده در مقایسه با جذب استاتیک دو برابر است (۲۷). در مطالعه ما، اثر سه دور شیکر مختلف که عبارت‌اند از ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ rpm بر تولید

تشکیل نانوذرات سریع تر بود و به ۷-۵ دقیقه در ۷۰۰ دور در دقیقه رسید. با این حال، نتایج نشان دادند سرعت بیش از حد می تواند روی مولکول های زیستی درگیر در فرایند سبز تأثیر بگذارد. این می تواند دلیلی باشد که سرعت واکنش در سرعت هم زدن بیش از ۷۰۰ دور در دقیقه تحت تأثیر منفی قرار می گیرد (۲۸) که در مطالعه ما نیز با افزایش دور تا ۲۰۰ میزان سنتز با کاهش مواجه شد.

نانوذرات اکسید مس ارزیابی شد. پس از سه بار تکرار آزمایش دور شیکر ۱۵۰ rpm بالاترین پیک را ایجاد کرد؛ بنابراین، این عدد به عنوان دور مناسب برای تولید نانوذرات اکسید مس به وسیله عصاره جدایه H2-7 انتخاب شد. این واقعیت که سرعت هم زدن می تواند سرعت واکنش را افزایش دهد نیز توسط مطالعه سلواکومار و همکاران تأیید می شود که در آن، سنتز NP نقره بر اساس مولکول های موجود در برگ های *hispidia Acalypha* بود. با افزایش سرعت هم زدن،



شکل ۶. مقایسه جذب طیف UV-vis فاکتورهای مختلف (الف) نمک پیش ساز (ب) pH (پ) درجه حرارت (ج) غلظت نمک (د) سرعت هم زدن در بیوسنتز نانوذرات مس توسط *Bacillus cytotoxicus* H2-7

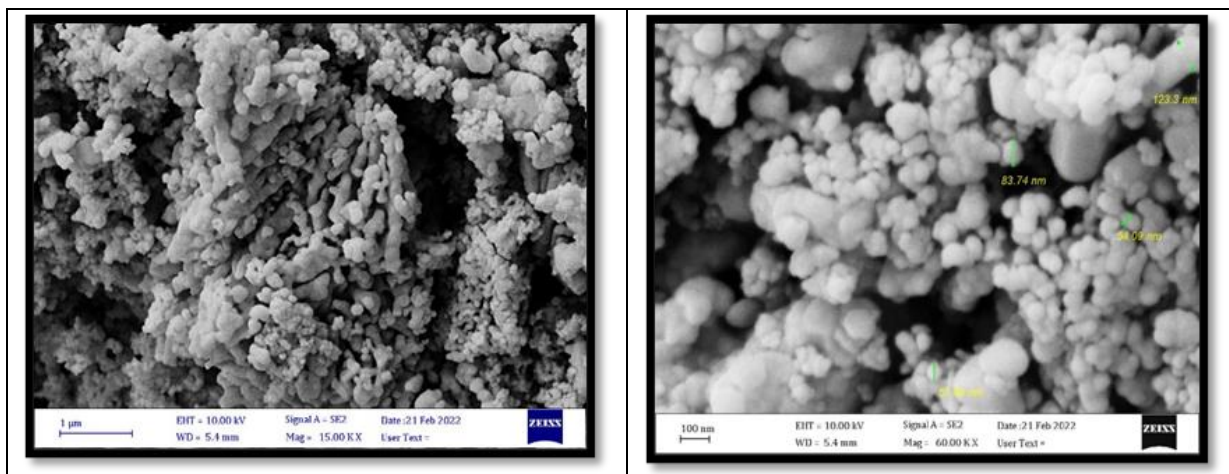
Figure6: salt (D) temperature (c) pH (b) salt precursor (a) :factors different of spectrum absorption vis-UV of Comparison *cytotoxicus Bacillus* by nanoparticles copper of biosynthesis the in speed stirring (E) concentration H2-7

آنالیز FE-SEM

شناسایی نانوذرات اکسید مس

متوسط اندازه نانوذرات اکسید مس بین ۸۰-۵۰ نانومتر است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند شکل و اندازه نانوذرات تابعی از فعالیت آنزیمی میکروارگانیسم‌ها، گروه‌های عاملی سطح نانوذرات و شرایط محیطی مانند دما است (۱).

تصاویر FE-SEM در دو بزرگ‌نمایی ۱ میکرومتر و ۱۰۰ نانومتر ثبت شدند. مورفولوژی نانوذرات اکسید مس تولیدشده با استفاده از عصاره سلولی جدایه H2-7 به شکل کروی است. نتایج این تصویربرداری مشخص می‌کند اندازه نانوذرات تولیدشده متنوع است؛ اما



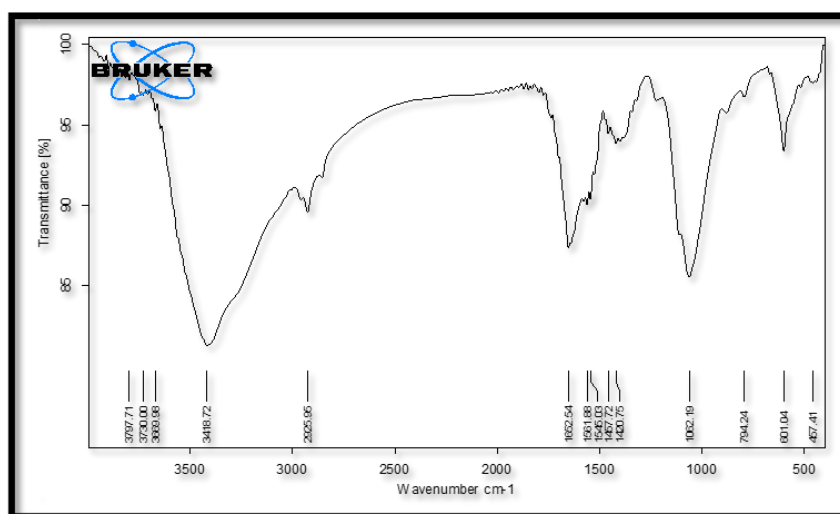
شکل ۷. آنالیز FE-SEM نانوذرات اکسید مس تولیدشده (a: بزرگ‌نمایی ۱ میکرومتر؛ b: بزرگ‌نمایی ۱۰۰ نانومتر)
Figure7: a nanoparticles oxide copper produced of analysis SEM-FE:1 b magnification µm:100 nm magnification nm

پیوند O-H در الکل یا فنول است. پیک جذب در 1 cm^{-1} تا 3418 cm^{-1} مربوط به پیوندهای N-H در گروه‌های آمید یا آمین است. پیک جذب در 1 cm^{-1} تا 2925 cm^{-1} مربوط به پیوند C-H در متیلن است. پیک تیز در 1 cm^{-1} تا 1652 cm^{-1} مربوط به کتون است. پیک جذب در 1 cm^{-1} تا 1561 cm^{-1} مربوط به پیوند N-H در آمین‌های نوع دو است. پیک‌های کوتاه و تیز در محدوده 1 cm^{-1} تا $1450-1550\text{ cm}^{-1}$ مرتبط با حضور حلقه‌های آروماتیک است. پیک تیز و بلند در 1 cm^{-1} تا 1062 cm^{-1} مربوط به پیوند C-O در الکل‌های نوع ۱ است. پیک کوتاه و تیز در 1 cm^{-1} تا 794 cm^{-1} بیان‌کننده پیوند قوی بین C-Cl است. با توجه به نتیجه حاصل، پروتئین‌ها و ترکیبات آلی موجود در عصاره سلولی جدایه H2-7

آنالیز FTIR

در این آنالیز پیک جذب در ناحیه اثر انگشت، در دو طول موج 1 cm^{-1} تا 457 cm^{-1} و 1 cm^{-1} تا 601 cm^{-1} تأیید‌کننده وجود نانوذره CuO است. علاوه بر آن، هیچ‌گونه پیکی در محدوده 1 cm^{-1} تا $660-605\text{ cm}^{-1}$ ثبت نشده است که بیان می‌کند نانوذرات اکسید مس به صورت Cu₂O تولید نشده‌اند و به صورت تک‌فاز به فرم CuO هستند. همچنین پیک‌های ثبت‌شده دیگر مربوط به گروه‌های عاملی هستند که به عنوان عامل احیاکننده، عامل پوششی و عامل پایدارکننده باعث تولید نانوذرات اکسید مس شده‌اند. این گروه‌های عاملی مربوط به آنزیم‌ها و ترکیبات موجود در باکتری تولیدکننده است (۱۴). پیک جذب در محدوده 1 cm^{-1} تا $3550-3700\text{ cm}^{-1}$ مربوط به

باعث احیای یون فلزی مس و پوشش دهی نانوذرات تولیدشده به منظور پایدارسازی شده‌اند.



شکل ۸- آنالیز طیف سنجی FTIR نانوذرات اکسید مس تولیدشده به وسیلهٔ عصارهٔ سلولی جدایهٔ H2-7
Figure8. isolate of extract cell the by produced nanoparticles oxide copper of analysis spectroscopic FTIR H2-7.

آنالیز DLS و پتانسیل زتا

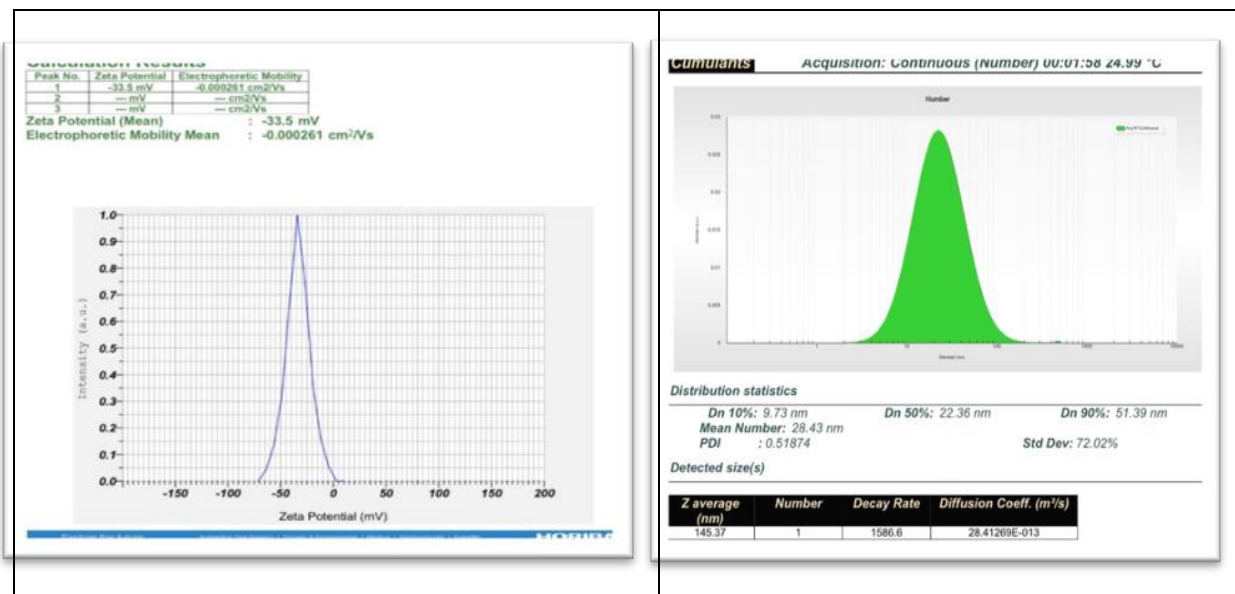
مناسب نانوذرات برای ایجاد پایداری است. مقدار پتانسیل زتا بینشی از پایداری کلئید است. نانوذرات مس و اکسید مس که پتانسیل زتای آنها بیشتر از +۳۰ میلی‌ولت یا کمتر از -۳۰ میلی‌ولت باشند، پایدار محسوب می‌شوند. علاوه بر این، بر نتیجهٔ آنالیز DLS و پتانسیل زتا شرایط محیطی آزمایش اعم از pH، دما، غلظت و ویسکوزیتهٔ نمونه تأثیر گذار است (۱۴).

مطالعات قبلی حاکی از آن است که نانوذرات CuO را می‌توان از باکتری گرم منفی متعلق به جنس *Serratia stutzeri* *Pseudomonas* غیر بیماری‌زا می‌تواند CuNP های کروی با محدوده اندازه بین ۸ تا ۱۵ نانومتر تولید کند. با این حال، می‌تواند CuNP های مکعبی به اندازه ۵۰ تا ۱۵۰ نانومتر را سنتز کند. علاوه بر این، اشرفیسا کلی می‌تواند نانوذرات CuO را با اندازه‌ها و شکل‌های متغیر سنتز کند (۱۴). نانوذرات سنتز شده در

میانگین شعاع هیدرودینامیکی نانوذرات اکسید مس تولیدشده، در حالتی که در آب مقطر پراکنده شده‌اند، برابر با ۱۴۵/۳۷ نانومتر است. با توجه به حضور مولکول‌های آب در اطراف ذرات و خطای آگلومره شدن ذرات، نتیجهٔ حاصل از DLS بزرگ‌تر از FE-SEM است. شاخص پراکنده‌گی اندازهٔ ذرات $PDI \square$ برابر با ۰/۵۱۸۷۴ است که بیان‌کنندهٔ طیف نسبتاً گستردهٔ اندازهٔ ذرات است و نانوذرات اکسید مس تولیدشده به فرم Polydisperse نزدیک‌تر هستند. این نتیجه با تصاویر حاصل از FE-SEM مطابقت دارد که وجود ذرات با اندازه‌های مختلف را نشان می‌داد. پراکنده‌گی اندازهٔ ذرات به طیف مختلف ترکیبات احیاکننده و پوشش‌دهندهٔ نانوذرات مرتبط است. پتانسیل زتا نیز برابر با ۳۳/۵- میلی‌ولت است که نشان‌دهندهٔ بار سطحی

پارامترهای مؤثر متفاوت بوده است.

این مطالعه از نظر کروی بودن با مطالعات قبلی شباهت دارد؛ اما از نظر روش سنتز و همچنین تأثیر‌گذاری



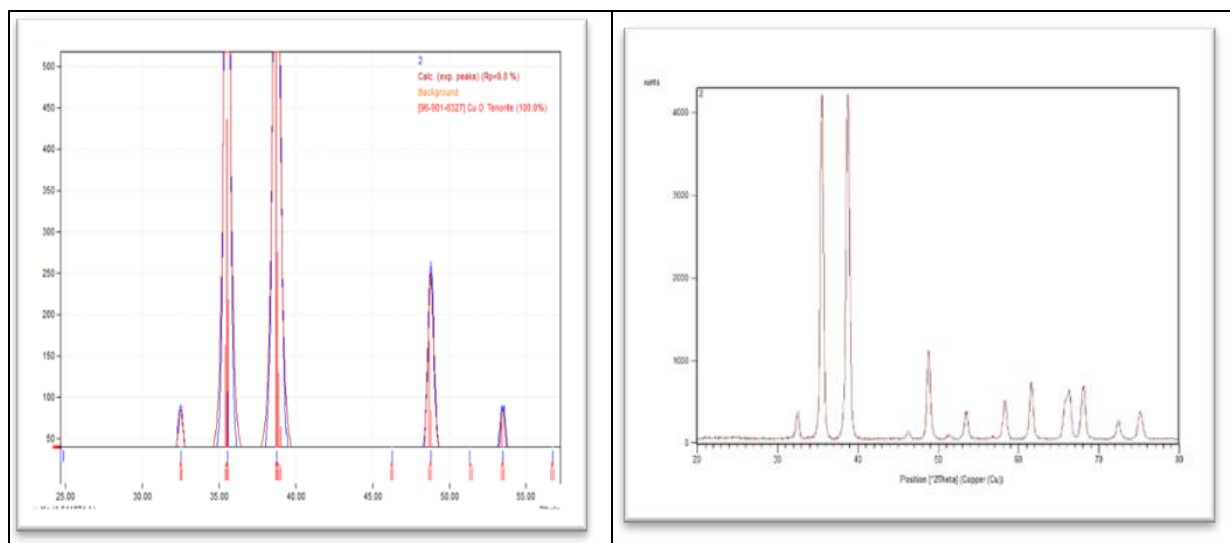
شکل ۹ - نتیجه آنالیز DLS و پتانسیل زتا نانوذرات اکسید مس تولید شده

Figure 9. nanoparticles oxide copper produced of potential zeta and isanalyz DLS of result The

مطابقت داشت. وجود دو پیک تیز در موقعیت $35/37^\circ$ و $38/59^\circ$ بیان‌کننده ساختار کاملاً کریستاله نانوذرات تولید شده است. الگوی ایجاد شده مطابق موقعیت θ_2 ثبت شده در پژوهش سینگه در تولید باکتری *E. coli* بود (۱۹). در این پژوهش نیز نانوذرات اکسید مس به صورت تک‌فاز CuO تولید شدند؛ در نتیجه، زمان ۴۸ ساعته انکوباسیون برای تولید نانوذرات اکسید مس توسط جدایه H2-7 مناسب بود. نرم‌افزار مشخص کرد ساختار کریستالی نانوذرات اکسید مس تولید شده از نوع Monoclinic است. همچنین مس ۷۹/۸۹ درصد و اکسیژن ۲۰/۱۱ درصد معلوم شد.

آنالیز XRD

با استفاده از نرم‌افزار Match نسخه ۳، نتایج حاصل از آنالیز XRD تحلیل و بررسی شدند. از این نرم‌افزار برای شناسایی نوع ماده، تعیین ساختار کریستالی، تعیین شکل و اندازه واحدهای سازنده یک ماده و تعیین فاز از طریق تطابق با پایگاه داده COD به بهره‌گرفته می‌شود. پیک‌های ثبت شده در موقعیت θ_2 نمونه پودر نانوذرات اکسید مس تولید شده توسط نرم‌افزار با COD9016326 تطبیق داده شدند. نتیجه تأیید‌کننده تولید نانوذرات اکسید مس بود. همچنین تعیین فاز نشان داد نانوذرات اکسید مس تولید شده کاملاً تک‌فاز و به فرم CuO تولید شده‌اند که با نتیجه آنالیز FTIR نیز



شکل ۱۰- نتیجه آنالیز پراش پرتو ایکس
Figure 10. analysis diffraction ray-X of result The

فعالیت ضد میکروبی نانوذرات بیوستتزشده

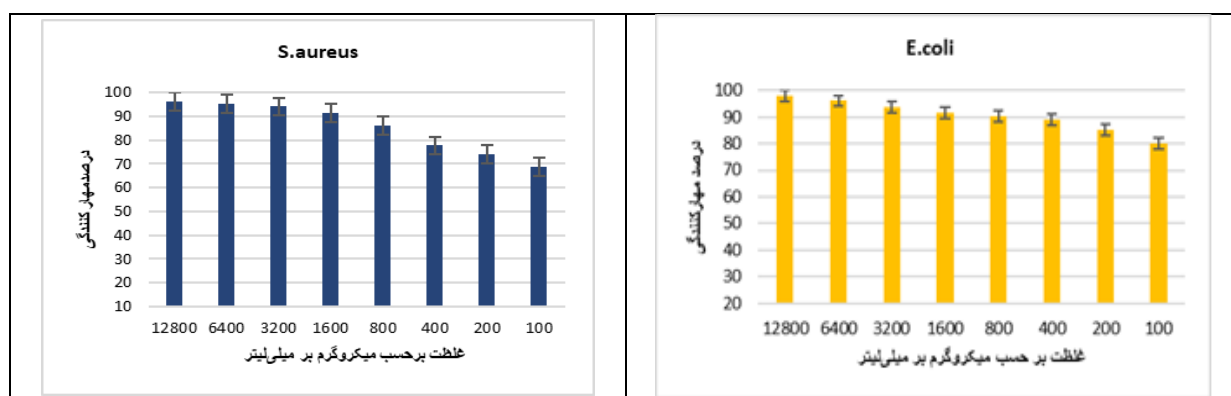
در این مطالعه، از تکنیک انتشار چاه آگار و میکرودایلوشن برای ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات بیوستتزشده علیه باکتری‌های *coli.E* و *aureus.S* استفاده شد. جدول ۱ مقدار متوسط منطقه بازدارنده را در برابر این باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس نشان می‌دهد. شکل همچنین ۱۱ درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف نانوذرات مس را نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده مقدار MIC و MBC را به ترتیب ۸۰۰ و ۱۶۰۰ $\mu\text{g/ml}$ برای *coli.E* و ۱۶۰۰ و ۳۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ برای *aureus.S* تعیین کرد. افزایش چشمگیر در اثرات بازدارندگی با افزایش غلظت نانوذرات بیوستتزشده مشاهده شد که به طور

مشابه در مطالعات دیگری نیز گزارش شد (۲۹). در تحقیق عمر و همکارانش نشان داده شد که *aureus.S* نسبت به *coli.E* به فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی بیوستتزشده حساس‌تر است (۳۰). معمولاً باکتری‌های گرم منفی به دلیل ساختار دیواره سلولی خاص خود (لایه ضخیم بیرونی غشای سلولی و وجود لیپوپلی ساکارید روی دیواره سلولی) به نانوذرات مقاوم‌اند (۳۱)؛ اما نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان دادند بیشترین اثر مهاری نانوذرات مس سنتزشده بر باکتری *coli.E* است که با نتایج مطالعات مشابه، کمی متفاوت است که شاید این امر به ساختار و عملکرد متفاوت نانوذرات مس مربوط باشد و نیاز است در این خصوص مطالعات دیگری صورت پذیرد.

جدول ۱: نتایج فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید مس به روش چاهک آگار

Table 1. method well agar by nanoparticles oxide copper of activity antibacterial of Results .

هاله عدم رشد (میلی متر)		
<i>E.coli</i> ATCC 11725	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	غلظت ($\mu\text{g/ml}$)
۵	۵	۱۰۰
۱۹	۶	۲۰۰
۲۲	۱۶	۴۰۰
۲۵	۱۷	۸۰۰
۲۸	۱۹	۱۶۰۰



شکل ۱۱. نتایج فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید مس به روش میکرودایلوشن و تعیین MIC در باکتری *E.coli* و *S.aureus*

Figure 11. Results of antibacterial activity of copper oxide nanoparticles by microdilution method and MIC determination in *E.coli* and *S.aureus* bacteria

نتیجه گیری

به صورت CuO با ساختمان کاملاً کریستالی Monoclinic و با متوسط شعاع هیدرودینامیکی ۱۴۵ نانومتر با پایداری مناسب از نظر پتانسیل زتا (-۳۳ میلی ولت) هستند. علاوه بر این، ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید مس، در برابر اشیریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس، فعالیت ضدباکتریایی قدرتمندی را نشان دادند؛ به خصوص اینکه روی باکتری گرم منفی مؤثرتر از گرم مثبت عمل کردند. به طور کلی، مطالعات ما نشان دادند باکتری منتخب دریاچه نمک قم، نانوذرات اکسید مس با فعالیت‌های ضدباکتریایی چشمگیری سنتز کردند که در این میان پارامترهای مختلفی بر میزان نانوذرات سنتز شده مؤثر هستند که می‌تواند در صنایع مختلفی استفاده شوند.

بر اساس مطالعه حاضر، روشی مقرون به صرفه و کارآمد برای بیوسنتز نانوذرات اکسید مس با استفاده از *Bacillus cytotoxicus* H2-7 مقاوم به مس به دست آمده از دریاچه نمک حوض سلطان به کار گرفته شد. مشاهده پیک در طول موج مرتبط با اکسید مس، تکنیک اولیه برای درک تشکیل نانوذرات بود. گروه‌های عاملی (گروه‌های کربوکسیل، هیدروکسیل و آمین) با استفاده از FTIR تعیین شدند و به عنوان عوامل تثبیت کننده و کاهنده عمل کردند. تجزیه و تحلیل DLS حاکی از پراکنندگی متوسط ذرات بود و میکروگراف‌های الکترونی نشان دادند ذرات کروی شکل با متوسط اندازه ۸۰-۵۰ نانومتر هستند که

References

- (1) Ovais M, Khalil AT, Ayaz M, Ahmad I, Nethi SK, Mukherjee S. Biosynthesis of metal nanoparticles via microbial enzymes: a mechanistic approach. *International journal of molecular sciences*. 2018 Dec 18;19(12):4100. <https://doi.org/10.3390/ijms19124100>
- (2) Vosoughian N, Mohammadi A, Hamayeli H. Bacteria as an efficient bacteriosystem for the synthesis of nanoparticles: a bibliometric analysis. *Nano*. 2021 Dec 30;16(14):2130014. <https://doi.org/10.1142/S1793292021300140>
- (3) Ismail MI. Green synthesis and characterizations of copper nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*. 2020 Jan 15; 240:122283. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys>
- (4) Vosoughian N, Mohammadi A. Microorganisms as biologically safe sources for the synthesis of metal nanoparticles. *Journal of Biosafety*. 2020 Dec 10;13(3):13-32. <http://journalofbiosafety.ir/article-1-376-en.html>
- (5) Zare E, Pourseyedi S, Khatami M, Darezereshki E. Simple biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using nature's source, and its in vitro bio-activity. *Journal of Molecular Structure*. 2017 Oct 15; 1146:96-103. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.05.118>
- (6) Tsekhmistrenko SI, Bityutskyy VS, Tsekhmistrenko OS, Horalskyi LP, Tymoshok NO, Spivak MY. Bacterial synthesis of nanoparticles: A green approach. *Biosystems Diversity*. 2020;28(1):9-17. <https://doi.org/10.15421/012002>
- (7) Mohd Yusof H, Mohamad R, Zaidan UH, Abdul Rahman NA. Microbial synthesis of zinc oxide nanoparticles and their potential application as an antimicrobial agent and a feed supplement in animal industry: a review. *Journal of animal science and biotechnology*. 2019 Dec;10:1-22. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0368-z>
- (8) Isik Z, Bouchareb R, Arslan H, Özdemir S, Gonca S, Dizge N, Balakrishnan D, Prasad SV. Green synthesis of iron oxide nanoparticles derived from water and methanol extract of *Centaurea solstitialis* leaves and tested for antimicrobial activity and dye decolorization capability. *Environmental Research*. 2023 Feb 15; 219:115072. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.115072>
- (9) Vosoughian N, Mohammadi A. A comparative study of microbial synthesis of zinc nanoparticles via two methods and using a novel *Bacillus subtilis* NH its antimicrobial and antioxidant activity. *Int J Biol Macromol*. 2023. [In Press].
- (10) Al-Kordy HM, Sabry SA, Mabrouk ME. Statistical optimization of experimental parameters for extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticles by a novel haloaliphilic *Alkalibacillus* sp. W7. *Scientific reports*. 2021 May 25;11(1):10924. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90408-y>
- (11) Vosoughian N, Asadbeygi M, Mohammadi A, Soudi MR. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using novel bacterium strain (*Bacillus subtilis* NH1-8) and their in vitro antibacterial and antibiofilm activities against *Salmonella typhimurium*. *Microbial Pathogenesis*. 2023 Dec 1; 185:106457. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106457>
- (12) Junior JC, Tamanini R, Soares BF, de Oliveira AM, de Godoi Silva F, da Silva FF, Augusto NA, Beloti V. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. *Semina: Ciências Agrárias*. 2016;37(5):3069-78. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5p3069>
- (13) Kundu D, Hazra C, Chatterjee A, Chaudhari A, Mishra S. Extracellular biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Rhodococcus pyridinivorans* NT2: multifunctional textile finishing, biosafety evaluation and in vitro drug delivery in colon carcinoma. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*. 2014 Nov 1; 140:194-204. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.08.001>

- (14) El-Saadony MT, Abd El-Hack ME, Taha AE, Fouda MM, Ajarem JS, N. Maodaa S, Allam AA, Elshaer N. Ecofriendly synthesis and insecticidal application of copper nanoparticles against the storage pest *Tribolium castaneum*. *Nanomaterials*. 2020 Mar 23;10(3):587. <https://doi.org/10.3390/nano10030587>
- (15) Wayne PA. National committee for clinical laboratory standards. *Performance standards for antimicrobial disc susceptibility testing*. 2002; 12:01-53.
- (16) Mohammadi A, Hashemi M, Hosseini M. Antimicrobial Activity of Essential Oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Mentha piperita*, *Zataria multiflora* Boiss and *Thymus vulgaris* Against Pathogenic Bacteria. *Medical Laboratory Journal*. 2016 Mar 1;10(2). <https://doi.org/10.18869/acadpub.mlj.10.2.32>
- (17) Barani M, Masoudi M, Mashreghi M, Makhdoumi A, Eshghi H. Cell-free extract assisted synthesis of ZnO nanoparticles using aquatic bacterial strains: Biological activities and toxicological evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021 Sep 5; 606:120878. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120878>
- (18) Shantkriti S, Rani P. Biological synthesis of copper nanoparticles using *Pseudomonas fluorescens*. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2014;3(9):374-83. <https://www.ijcmas.com/vol-3-9/S.Shantkriti%20and%20P.Rani.pdf>
- (19) V Singh A, Patil R, Anand A, Milani P, Gade WN. Biological synthesis of copper oxide nano particles using *Escherichia coli*. *Current Nanoscience*. 2010 Aug 1;6(4):365-9. <https://doi.org/10.2174/157341310791659062>
- (20) Prakash S, Elavarasan N, Venkatesan A, Subashini K, Sowndharya M, Sujatha V. Green synthesis of copper oxide nanoparticles and its effective applications in Biginelli reaction, BTB photodegradation and antibacterial activity. *Advanced Powder Technology*. 2018 Dec 1;29(12):3315-26. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2018.09.009>
- (21) Sankar R, Manikandan P, Malarvizhi V, Fathima T, Shivashangari KS, Ravikumar V. Green synthesis of colloidal copper oxide nanoparticles using *Carica papaya* and its application in photocatalytic dye degradation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014 Mar 5;121:746-50. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.12.020>
- (22) Tiwari M, Jain P, Hariharapura RC, Narayanan K, Bhat U, Udupa N, Rao JV. Biosynthesis of copper nanoparticles using copper-resistant *Bacillus cereus*, a soil isolate. *Process Biochemistry*. 2016 Oct 1;51(10):1348-56. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.08.008>
- (23) Droepenu EK, Asare EA, Wee BS, Wahi RB, Ayertey F, Kyene MO. Biosynthesis, characterization, and antibacterial activity of ZnO nanoaggregates using aqueous extract from *Anacardium occidentale* leaf: comparative study of different precursors. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2021 Dec;10:1-0. <https://doi.org/10.1186/s43088-020-00091-7>
- (24) Miu BA, Dinischiotu A. New green approaches in nanoparticles synthesis: An overview. *Molecules*. 2022 Oct 1;27(19):6472. <https://doi.org/10.3390/molecules27196472>
- (25) Verma A, Mehata MS. Controllable synthesis of silver nanoparticles using Neem leaves and their antimicrobial activity. *Journal of radiation Research and applied sciences*. 2016 Jan 1;9(1):109-15. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.11.001>
- (26) Lee SH, Jun BH. Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. *International journal of molecular sciences*. 2019 Feb 17;20(4):865. <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>
- (27) Mohamed AA, Abu-Elghait M, Ahmed NE, Salem SS. Eco-friendly mycogenic synthesis of ZnO and CuO nanoparticles for in vitro antibacterial, antibiofilm, and antifungal applications. *Biological trace element research*. 2021 Jul;199(7):2788-99. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02369-4>
- (28) Selvakumar P, Sithara R, Viveka K, Sivashanmugam P. Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of

- Acalypha hispida and its application in blood compatibility. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2018 May 1;182:52-61. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.03.018>
- (29) Ogunyemi SO, Abdallah Y, Zhang M, Fouad H, Hong X, Ibrahim E, Masum MM, Hossain A, Mo J, Li B. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using different plant extracts and their antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2019 Dec 4;47(1):341-52. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.03.018>
- (30) Umar H, Kavaz D, Rizaner N. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Albizia lebbek* stem bark, and evaluation of its antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic activities on human breast cancer cell lines. *International journal of nanomedicine*. 2019 Dec 20:87-100. <https://doi.org/10.2147/IJN.S186888>
- (31) Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, Kaus NH, Ann LC, Bakhori SK, Hasan H, Mohamad D. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-micro letters*. 2015 Jul;7:219-42. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>

[□]index Polydispersity

^{□□}Crystallography Open Database