مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره سوم (پیاپی ۱۶) پاییز ۱۳۹۲
صفحات ۲۱۱-۱۹۸

Original Article

تولید بیولوژیکی و بررسی خواص ضد باکتریایی نانوذرات طلا

پرستو پورعلی*[۱]، مجید باصری صالحی[۲]، سیما افشار نژاد[۳]، جواد بهروان[۴]

[۱] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، دانشکده پزشکی، گروه پزشکی، [۲] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، دانشکده علوم، گروه میکروب شناسی، [۳] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، [۴] استاد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

چکیده

سابقه و هدف: نانوذرات تولید شده با روش بیولوژیکی در عین بی خطر بودن، دارای اثرات ضد باکتریایی مناسبی بر علیه جدایه های مسبب عفونت های انسانی می باشند. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی سویه های تولید کننده نانوذرات طلا از خاک به صورت درون و برون سلولی و نیز بررسی خواص ضد باکتریایی نانوذرات طلای تولیدی بر علیه ۱۰ باکتری بیماری زا انجام شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه پس از جداسازی باکتری ها از خاک و تولید نانوذرات طلا توسط روماند و سلول های آن ها، تولید بیولوژیکی نانوذرات از طریق اسپکتروفوتومتر، میکروسکوپ الکترونی گذاره و پراش اشعه اکس تایید گردید. به منظور شناسایی سویه های تولید کننده نانوذرات طلا از روش PCR و سپس تعیین توالی استفاده شد. در نهایت خواص ضد باکتریایی نانوذرات تولیدی بر علیه ۱۰ باکتری بیماری زا با روش چاهک گذاری مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در مجموع ۳۸ سویه قادر به تولید نانوذرات طلا به صورت خارج سلولی بودند. از این میان ۱۶ سویه توانایی تولید نانوذرات طلا به صورت درون سلولی را نیز دارا بودند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره حاصل از نانوذرات طلا نشان داد که نانوذرات دارای ابعادی کمتر از ۱۰۰ نانومتر بوده اند و نتایج پراش اشعه اکس حضور ساختار کریستالین نانوذرات طلا را تایید نمود. ۳ سویه برتر تولید کننده نانوذرات طلا شامل *باسیلوس موجاونسیس*، *باسیلوس اسپیزیزنی* و *باسیلوس والیسمورتیس* بودند. نتایج بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات طلا تولیدی نشان داد که نانوذرات تولیدی به روش خارج سلولی بهتر از نانوذرات تولیدی به روش درون سلولی توانایی مهار رشد باکتری های بیماری زا را دارند.

نتیجه‌گیری: تولید نانوذرات طلا با روش بیولوژیکی قابل انجام است و نانوذرات طلا تولیدی دارای خواص ضد باکتریایی مشابه بر علیه باکتری های گرم مثبت و منفی می باشند.

واژگان کلیدی: تولید بیولوژیکی، نانوذرات طلا، اثرات ضد باکتریایی.

دریافت مقاله: اردیبهشت ۹۱ پذیرش برای چاپ: مهر ماه ۹۱

مقدمه

"نانو" پیشوندی یونانی به معنای $۱۰^{-۹}$ می باشد. امروزه از این واژه در فناوری نانو استفاده می گردد (۱). از کاربردهای نانوذرات می توان به مواد کامپوزیت، کاتالیزور، بسته‌بندی، روکش‌ها، افزودنی‌های سوخت، ساینده‌ها، باتری‌ها، روان کننده ها، پزشکی و داروسازی، دارو رسانی و تشخیص پزشکی اشاره نمود. در سال های اخیر نانوذرات فلزی به دلیل کاربردهای متنوع در زمینه های مختلف، به طور گسترده ای مورد مطالعه قرار گرفته اند (۲ و ۳).

*) آدرس برای مکاتبه: شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، دانشکده پزشکی، گروه پزشکی. تلفن: ۰۹۱۵۵۱۳۹۳۸۰ پست الکترونیک: parastoo_pourali@yahoo.com

به منظور تولید نانوذرات فلزات مختلف سه روش شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی وجود دارد (۴). از این میان روش های فیزیکی و شیمیایی به منظور تولید نانوذرات فلزی به دما، فشار و زمان بالا نیاز دارند و همچنین پر هزینه نیز می باشند. از طرفی باقی ماندن میزان کمی از پیش ماده های سنتز نانوذرات بر روی سطح نانوذرات تولیدی، سبب ایجاد سمیت در بدن انسان می گردد. بنابراین به دست آوردن نانوذراتی که دارای سازگاری بیشتری با بدن باشند، از اهداف مهم تحقیقات نانو می باشد. روش بیولوژیکی عمدتاً توسط فرآیندهای آنزیمی و گاهاً غیر آنزیمی رخ داده و به دلیل عدم تولید مواد سمی در محیط، به عنوان تکنولوژی سبز نیز خوانده می شود.

یکی از دلایل تولید نانوذرات فلزی توسط میکروارگانیسم ها، کاهش اثرات سمی یون های فلزی موجود در محیط رشد میکروب ها می باشد. این امر موجب شده که میکروارگانیسم ها بتوانند بر روی غلظت های بالایی از یون های فلزی رشد نموده و زنده بمانند. میکروارگانیسم ها این عمل را از طریق احیای بیولوژیکی یون های فلزی سمی (با استفاده از آنزیم های خاص مانند NADH ردوکتاز و یا نیترات ردوکتاز) به عناصر فلزی کمتر سمی، انجام می دهند (۵). علاوه بر این حضور برخی پلی ساکاریدها و مواد آلی تولیدی توسط میکروارگانیسم ها در درون سلول ها و نیز درون محیط کشت سبب تولید نانوذرات فلزی می گردد. این مواد آلی از طریق گروه های عملکردی خود مانند سیستئین، هیستیدین، آلدئید ها، کتون ها و ... موجب احیای یون های فلزی به نانوذرات فلز می شوند (۵).

فرآیند احیای فلزات توسط میکروارگانیسم ها به دو صورت درون و بیرون سلولی قابل انجام می باشد. جایگاه احیا یون ها و در نتیجه تولید نانوذرات بر اساس نوع میکروارگانیسم و نوع آنزیم یا آنزیم های درگیر در فرآیند احیا که در درون یا بیرون از سلول قرار داشته باشند، تعیین می گردد (۴). به طور معمول تولید نانوذرات خارج سلولی در مقایسه با تولید درون سلولی مناسب تر می باشد. زیرا در شکل درون سلولی نانو ذرات در داخل بیوماس تولید می گردند که این امر خود نیازمند مرحله ای دیگر جهت جداسازی نانوذرات از بیوماس می باشد. همچنین از آنجایی که تولید نانو ذرات در روش درون سلولی همیشه عملی نمی باشد، امروزه اکثر مطالعات بر روی روش های تولید بیرون سلولی متمرکز شده است (۵).

از میان انواع مختلف نانوذرات فلزی تولید شده توسط میکروب ها، تنها تعداد اندکی از آن ها در مصارف پزشکی قابل استفاده می باشند. زیرا نانوذرات تولیدی علاوه بر خواص منحصر به فرد خود باید با بدن انسان سازگار و سمیت کمی نیز برای آن داشته باشند. بر همین اساس امروزه نانوذرات طلا به عنوان یکی از مناسب ترین گزینه ها مطرح می باشد. طلا دارای خواص ضد باکتری، ضد قارچ و ضد ویروسی است. اخیراً از نانوذرات طلا به منظور شناسایی DNA در محیط و درون بدن و نیز در درمان برخی سرطان ها استفاده شده است (۶).

امروزه از جمله مسائل مهمی که در درمان عوامل باکتریایی بیماری زا مطرح می باشد، به وجود آمدن سویه های مقاوم به دارو در بیمارستان ها است. بر همین اساس قسمت عمده تلاش محققان در زمینه داروسازی، کشف راه های جدید برای مبارزه با این پاتوژن ها می باشد. در سال های اخیر تعداد آنتی بیوتیک های جدید که مورد شناسایی و بهره برداری قرار گرفته اند، بسیار کم بوده و تقریباً هیچ کدام از آن ها فعالیت مناسبی بر علیه باکتری های مقاوم به چند دارو نداشته است. مطالعات نشان داده است که نانوذرات طلا دارای فعالیت ضد باکتریایی می باشد (۷). این یافته دریچه جدیدی را به منظور درمان عفونت های مقاوم به دارو به روی بشر گشوده شده است. تاکنون مواردی از ایجاد مقاومت به اثرات کشندگی نانوذرات طلا برای پاتوژن های مهم گزارش نشده است. زیرا این نانو ذرات می توانند هم زمان در بخش های مختلف حیاتی سلول میکروبی مانند پروتئین سازی، تولید انرژی و ساختDNA تاثیر بگذارند (۷).

از این رو لزوم به دست آوردن سویه های جدید غیر بیماری زای باکتریایی با توانایی تولید نانوذرات سازگار با بدن و دارای خواص ضد باکتریایی، احساس می گردد. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی سویه های تولید کننده نانوذرات طلا از

خاک به صورت درون و برون سلولی و نیز بررسی خواص ضد باکتریایی نانوذرات طلای تولیدی علیه ۱۰ باکتری بیماری زا انجام شد.

مواد و روش ها

الف) جداسازی سویه ها از خاک و نگهداری آن ها: در این مطالعه از نواحی ریزوسفری خاک مناطق مختلف شهر مشهد، نمونه گیری به عمل آمد. تمامی نمونه ها با رعایت شرایط استریل به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده بوعلی مشهد منتقل گردیدند. به منظور جداسازی ذرات بزرگ، نمونه های خاک الک شدند. سپس یک گرم از هر نمونه خاک در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل شد. با استفاده از آب مقطر از سوسپانسیون یاد شده سری رقت $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۷}$ تهیه گردید. یک میلی لیتر از رقت های $۱۰^{-۷}$، $۱۰^{-۶}$، $۱۰^{-۵}$ و $۱۰^{-۴}$ به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت نوترینت براث در ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری اضافه شد. ارلن ها بر روی انکوباتور شیکر دار با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. به منظور به دست آوردن کلنی های خالص باکتریایی، سوسپانسیون سلولی به دست آمده بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد (۸).

ب) بررسی تولید نانوذرات طلا به روش خارج سلولی توسط باکتری ها: ابتدا نمونه های باکتریایی بر روی محیط نوترینت براث در شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. پس از رشد، بیوماس سلولی به وسیله سانتریفیوژ در دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه از محیط کشت جداسازی گردید. مایع روماند جهت تولید نانوذرات طلا به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، ۵۰ میلی لیتر از مایع رویی به دست آمده به ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری اضافه گردید. کلرواوریک اسید وزن و محلول ۱ مولار از آن تهیه شد. سپس ۵۰ µl از آن به ارلن حاوی روماند مورد آزمون وارد شد (غلظت نهایی یون فلزی ۱ میلی مولار بود). در نهایت نمونه ها در شیکر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. تجمع خارج سلولی ذرات فلز با تغییر رنگ محیط کشت بررسی گردید (۸ و ۹). در این مطالعه شاهدهای مورد استفاده محیط کشت استریل به همراه کلرواوریک اسید و نیز کلرواوریک اسید در آب مقطر بودند.

ج) بررسی تولید نانوذرات فلز به روش داخل سلولی توسط باکتری ها: در این مرحله کلنی های خالص باکتریایی با توانایی تولید نانوذرات طلا به صورت بیرون سلولی، جهت تولید نانوذرات طلا به صورت درون سلولی مورد بررسی قرار گرفتند. از آنجایی که کلرواوریک اسید باید در غلظتی که کشنده باکتری ها نباشد به محیط کشت اضافه شود، در ابتدا به بررسی MIC و SIC کلرواوریک اسید بر روی جدایه های باکتریایی پرداخته شد. برای این منظور از پلیت ۹۶ خانه استفاده شد. کلرواوریک اسید ۲ مولار تهیه گردید. به تمامی چاهک ها ۲۰۰ µl محیط کشت نوترینت براث افزوده شد. سپس به خانه اول از سمت چپ ۲۰۰ µl از کلرواوریک اسید ۲ مولار اضافه شد. پس از پیپت نمودن محلول درون چاهک، ۲۰۰ µl از این محلول به خانه شماره ۲ از همان ردیف (به صورت افقی) که دارای ۲۰۰ µl نوترینت براث از قبل بود، اضافه گردید. پس از پیپت نمودن این فرآیند تکرار و تهیه رقت تا چاهک شماره ۱۰ ادامه یافت. در نهایت از چاهک شماره ۱۰، جهت تیتراسیون مناسب ۲۰۰ µl دور ریخته شد. چاهک شماره ۱۲ کنترل مثبت (دارای باکتری و نوترینت براث و فاقد کلرواوریک اسید) و چاهک شماره ۱۱ کنترل منفی (فاقد باکتری تلقیح شده و حاوی ۲۱۰ µl محیط کشت استریل) بودند. به تمامی چاهک ها (به جز چاهک شماره ۱۱) از کشت ۲۴ ساعته باکتری در نوترینت براث با کدورت مشخص (۰/۵ مک فارلند) به میزان ۱۰ µl اضافه شد. این عمل برای هر جدایه از باکتری، هر کدام در یک ردیف مجزا در درون یک پلیت انجام شد.

پلیت درون شیکر انکوباتور ۳۷°C با دور ۸۰ rpm قرار گرفت. در مرحله بعد از تمامی چاهک ها برای هر باکتری روی محیط کشت نوترینت آگار برده شد تا ایجاد و یا عدم ایجاد کلنی مشخص شود. در این مطالعه کمترین رقتی که باعث از بین رفتن ۹۹٪ از باکتری ها شود به عنوان رقت MBC، رقت پس از

آن که رشد باکتری ها در روی نوترینت آگار را سبب شود به عنوان MIC و یک رقت کمتر به عنوان SIC در نظر گرفته شد. پس از به دست آوردن میزان کلرواوریک اسید در سطح غیر کشنده برای باکتری، جهت تولید نانوذرات به روش درون سلولی مانند مرحله قبل هر تک کلنی بر روی محیط کشت نوترینت براث برده شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر انکوباتور در دور ۱۵۰ rpm قرار گرفت. پس از تولید بیوماس میکروبی، بیوماس از بقیه محیط کشت توسط سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی و سپس توسط بافر فسفات در pH ۷ سه بار به طور کامل شستشو داده شد. تا تمامی محیط کشت از روی سطح باکتری ها پاکسازی شود، رشدی در طی انکوباسیون رخ ندهد و تولید به سمت درون سلولی پیش رود. باکتری ها در ویال های ۵۰ میلی لیتری ریخته شدند و به هر ویال ۲۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. در نهایت کدورت حاصل با استاندارد ۰/۵ مک فارلند مقایسه و برابر گردید. سپس بر حسب نوع باکتری و رقت SIC به دست آمده از مرحله قبل برای همان باکتری، به میزان مشخصی از کلرواوریک اسید به ویال ها اضافه سازی شد. سپس باکتری ها در شیکر انکوباتور با دور ۲۰۰ rpm به مدت ۱ تا ۵ روز قرار گرفتند. حضور تغییر رنگ در درون ویال ها نشان دهنده تولید نانوذرات طلا بود (۱۰).

د) استخراج نانوذرات طلا تولید شده به صورت درون سلولی: ابتدا نمونه های سلولی دارای تغییر رنگ، در درون لوله فالکون استریل ریخته شدند و با دور ۶۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. به منظور انجام شکست سلولی، مایع رویی دور ریخته شد و سلول ها دوباره در آب مقطر استریل غوطه ور شدند. در این مرحله سلول ها به صورت فیزیکی به وسیله شیشه لیز شدند. به این ترتیب که ذرات شیشه در درون هاون به خوبی ساییده و به وسیله الکل ۹۶ درصد آتش زده شدند. تا ذرات شیشه استریل گردند. باکتری ها در درون فالکون به همراه ذرات شیشه به مدت ۱۵ دقیقه به خوبی مخلوط (ورتکس) شدند. سپس نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفتند تا یخ زدن نیز به پاره شدن سلول ها کمک کند. در نهایت نمونه ها در دور ۶۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع روماند حاصل جهت بررسی تولید نانوذرات طلا مورد بررسی قرار گرفت.

ه) تست های تاییدی تولید نانوذرات طلا توسط باکتری ها:

۱- اسپکتروفوتومتر: همانگونه که اشاره گردید تایید اولیه تولید نانوذرات فلز طلا بر اساس تغییر رنگ محیط آزمون به دلیل تغییر ماهیت مواد به صورت نانوذره می باشد. پس از مشاهده تغییر رنگ حاصله نمونه ها توسط اسپکتروفوتومتر در دامنه طول موج ۳۵۰ تا ۷۰۰ نانومتر بررسی شدند. شاهدهای منفی آزمایش محیط کشت استریل به همراه یون فلزی افزوده شده به آن بود که در شرایط مشابه دمایی و به هم زنی با سایر نمونه ها قرار گرفت. بلانک مورد استفاده در اسپکتروفوتومتر، جهت نانوذرات برون سلولی، روماند باکتری کشت داده شده در محیط کشت نوترینت براث و جهت نانوذرات درون سلولی، سوسپانسیون باکتری در آب مقطر بود که نمک فلز به آن افزوده نشده بود. چنانچه تولید نانوذرات طلا به صورت درون و برون سلولی رخ داده باشد، اسپکتروفوتومتر جذبی حدود ۵۱۰ تا ۵۴۰۰ نانومتر را نشان خواهد داد (۸ و ۱۱).

۲- آنالیز توسط پراش اشعه اکس (X-ray Diffraction Analysis = XRD): به منظور تایید تولید نانوذرات طلا توسط جدایه های باکتریایی، پس از تایید توسط اسپکتروفوتومتر، در ابتدا نمونه روماند حاوی نانو ذره طلا و نیز نمونه های نانو ذرات استخراج شده از درون سلول و محلول در آب مقطر در دستگاه freeze-dryer قرار گرفته و لیوفلیزه گردیدند. سپس پودر حاصله برای هر نمونه به صورت جداگانه تحت مطالعه توسط دستگاه XRD در زاویه ۲θ از ۳۰° تا ۸۰° قرار گرفت (۱۲).

۳- آنالیز توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM): جهت بررسی به وسیله میکروسکوپ الکترونی، روماند (در حالت تولید خارج سلولی) و سلول های باکتریایی (در حالت تولید درون سلولی) مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه ها به مدت ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه در مجاورت گریدهای مسی حاوی پوشش

کربنی قرار داده شدند. پس از خشک شدن نمونه ها توسط لامپ اینفرا رد، نمونه ها توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره Ziess مدل Leo 910 مشاهده و از آن ها عکسبرداری شد (۱۳).

و) شناسایی جدایه های باکتریایی: در این مرحله به شناسایی جدایه هایی پرداخته شد که بالاترین میزان تولید نانوذرات طلا را به صورت درون و بیرون سلولی داشتند. این جدایه ها دارای بیشترین میزان جذب نوری در اسپکتروفوتومتر بودند.

۱- بررسی های فنوتایپینگ جدایه ها: جهت شناسایی جدایه ها، از خواص ماکروسکوپی و میکروسکوپی آن استفاده گردید. در بررسی های ماکروسکوپی کشت ۱۲ تا ۲۴ ساعته از باکتری ها در محیط کشت نوترینت آگار از نظر حالت و شکل کلنی، منظره سطح کلنی، رنگ و اندازه کلنی بررسی شدند. ارزیابی میکروسکوپی شامل رنگ آمیزی گرم و بررسی مورفولوژی سلول ها بود. در نهایت بر اساس کلیدهای شناسایی ارایه شده در کتاب برگی، تست های لازم تشخیصی برای جدایه ها گذاشته شدند (۱۴).

۲- بررسی های ژنوتایپینگ جدایه های باکتریایی: در ابتدا DNA جدایه ها با روش فنل- کلروفورم استخراج گردید (۱۵). غلظت DNA به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر بر حسب نانوگرم اندازه گیری گردید. این غلظت به وسیله آب مقطر استریل به ۳۵ نانوگرم رسانیده شد تا واکنش PCR به خوبی قابل انجام باشد. در این مطالعه به منظور تکثیر ژن ناحیه 16S rRNA باکتریایی از روش PCR و نیز پرایمرهای 63-F (۵´-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-۳´) و 1389-R (۵´-ACGGGCGGTGTGTACAAG-۳´) استفاده گردید (۱۶). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۱/۸ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۱ میکرولیتر از پرایمر R و ۲/۲ میکرولیتر از پرایمر F (غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۱/۴ میکرولیتر $MgCl_2$ (غلظت ۲۵ میلی مولار)، ۰/۴ میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر DNA الگو (غلظت ۳۵ نانوگرم) و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (غلظت ۵ واحد در ۱۰۰ میکرولیتر) انجام گردید (۱۶).

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (کوربت) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، اتصال در دمای ۵۹/۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز ۱ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعات DNA به کمک دستگاه Uvidoc مشاهده و عکس برداری شدند (۱۶).

محصول PCR به کمک کیت استخراج DNA از روی ژل (GF-1Vivantis) جداسازی و به منظور انجام تعیین توالی یک جهته قطعات به دست آمده به شرکت مربوطه ارسال گردید. در نهایت توالی های به دست آمده با استفاده از برنامه Blastn در سایت NCBI با توالی های 16S rRNA موجود مقایسه گردید.

ز) بررسی خواص ضد باکتریایی نانوذرات طلا تولید شده توسط جدایه های باکتریایی: برای این منظور از نانوذرات تولیدی توسط یک نمونه از باکتری ها استفاده شد. برای پاک شدن محیط کشت از نانوذرات، ابتدا روماند حاوی نانوذرات طلا در دور g ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس رسوب حاصل ۳ مرتبه توسط آب مقطر استریل شستشو داده و مجدداً طبق شرایط بالا سانتریفیوژ گردید (۱۷). در مرحله بعد رسوب حاصل در µl ۲۰۰ آب مقطر استریل حل شد. نانوذرات تولید شده به صورت درون سلولی نیز طبق شرایط بالا سانتریفیوژ و در µl ۲۰۰ آب مقطر استریل حل گردید. سپس جهت یکسان نمودن میزان نانوذرات در دو میکروتیوب حاوی نانوذرات درون و برون سلولی، جذب این دو محلول توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد. با افزودن آب مقطر جذب هر دو نوع نانوذرات در میکروتیوب های جداگانه یکسان سازی گردید.

در نهایت اثر ضد باکتریایی نانوذرات طلا تولیدی به روش درون سلولی و برون سلولی بر روی باکتری های بیماری زا

(جدول ۱) مطابق با روش وانگ (Wang) و همکاران در سال ۲۰۱۰ با ایجاد چاهک در پلیت بررسی شد (۱۸).

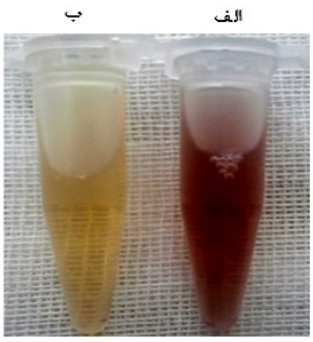
جدول ۱: باکتری های مورد استفاده در آزمون حساسیت ضد باکتریایی

باکتری های مورد بررسی	PTCCs
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۱۴۵۳
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۱۱۳
استرپتوکوکوس فاسیوم	۱۳۹۴
لیستریا مونوسیتوژنز	۱۲۹۸
شیگلا دیسانتریه	۱۱۸۸
اشریشیا کلی	۱۳۳۰
کلبسیلا نمونیا	۱۰۵۳
یرسینیا انتروکولیتیکا	۱۴۷۷
سودوموناس آئروجینوزا	۱۳۱۰
پروتئوس میرابیلیس OXK	۱۰۷۶

نتایج

الف) جداسازی جدایه ها از خاک: در این مطالعه ۸۰ سویه باکتریایی به صورت جداگانه از خاک شناسایی شدند. تمامی کلنی ها بر روی محیط نوترینت آگار کشت و سپس به منظور تولید نانوذرات فلزی مورد بررسی قرار گرفتند.

ب) بررسی تولید نانوذرات طلا به روش خارج سلولی توسط باکتری ها: در این مطالعه ۳۸ کلنی توانایی تولید نانوذرات طلا را به صورت خارج سلولی داشتند. به طوری که محیط کشت به رنگ صورتی تا بنفش تغییر رنگ داده بود (شکل ۱). اما در هیچ یک از ارلن های کنترل منفی تغییر رنگی مشاهده نگردید.



شکل ۱: تغییر رنگ محیط کشت از زرد به صورتی به دلیل تولید نانوذرات طلا به روش خارج سلولی. الف) محیط کشت پس از تولید نانوذرات طلا و ب) روماند پیش از افزودن کلرواوریک اسید.

ج) بررسی تولید نانوذرات طلا به روش داخل سلولی توسط باکتری ها: برای این منظور از پلیت ۹۶ خانه استفاده شد. تمامی چاهک های شماره ۹ از سری رقت کلرواوریک اسید به عنوان غلظت SIC شناسایی گردید (1×10^{-4} g). نتایج نشان داد که ۱۶ نوع از باکتری های فوق در غلظت SIC خود توانایی احیای نانوذرات طلا را در درون سلول خود داشته اند. این امر با تغییر رنگ واضح سلول های غوطه ور در آب مقطر و تغییر رنگ کلی سوسپانسیون به صورتی تا بنفش پس از حدود ۲ تا ۵ روز مشخص گردید (شکل ۲).

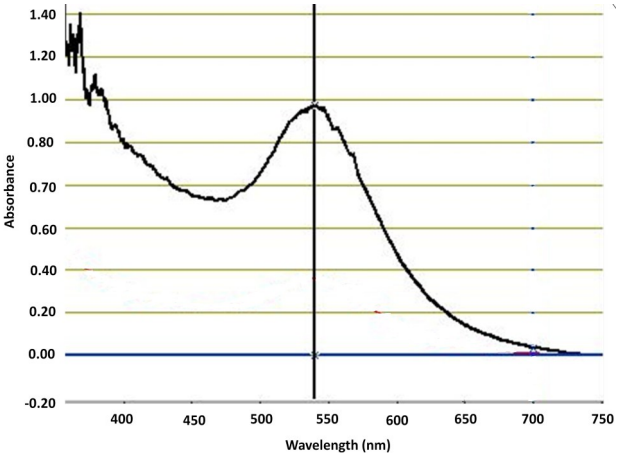
د) استخراج نانوذرات طلا تولید شده به صورت درون سلولی: نانوذرات تولید شده درون سلولی به وسیله ذرات شیشه و سرما از سلول ها خارج شدند. نتایج حاکی از آن بود که پس از شکست سلولی باکتری های معلق در آب مقطر و سانتریفیوژ با دور بالا، روماند باکتری ها حاوی رنگ صورتی، نارنجی تا بنفش بود. این حالت پیش از شکست سلولی قابل مشاهده نبود (شکل ۳).

شکل ۲: تولید نانوذرات طلا به روش درون سلولی.

شکل ۳: نمونه ای از نانوذرات طلا تولید شده به روش درون سلولی. الف) سلول های حاوی نانوذرات پس از رسوب دادن به وسیله سانتریفیوژ ب) نانوذرات استخراج شده به وسیله شکست سلول ها با شیشه و سرما که پس از سانتریفیوژ شدن با همان شرایط دارای تغییر رنگ واضح در مایع روماند می باشد.

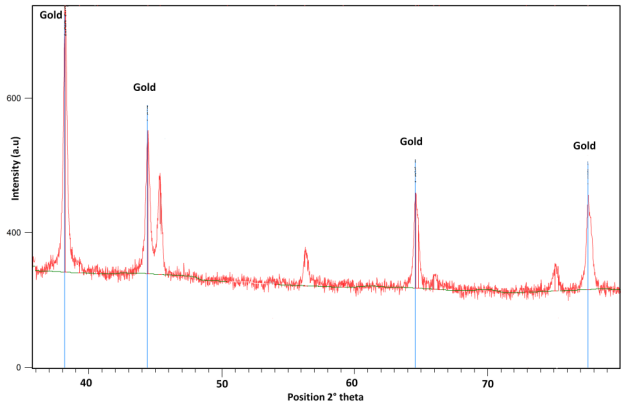
ه) تست های تاییدی تولید نانوذرات طلا توسط باکتری ها:

۱- اسپکتروفوتومتر: پس از مشاهده تغییر رنگ حاصله از احیای یون های فلزی به نانوذرات، نمونه ها توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ۳۵۰ تا ۷۰۰ نانومتر بررسی شدند. نتایج اسپکتروفوتومتر نشان داد که نانوذرات طلا به صورت برون سلولی دارای بیشینه جذب در حدود ۵۴۰ نانومتر بودند (شکل ۴).



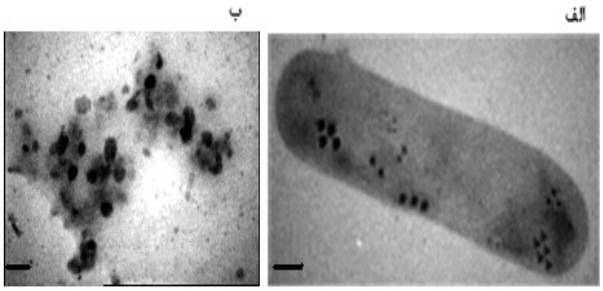
شکل ۴: نتایج اسپکتروفوتومتر به دست آمده برای نانوذرات طلا برون سلولی که دارای بیشینه جذب در حدود ۵۴۰ نانومتر است.

۲- آنالیز پراش اشعه اکس X-ray Diffraction Analysis (XRD). به وسیله این آزمون می توان حضور حالت عنصر از یک فلز را از سایر ظرفیت های آن تشخیص داد. همانطور که شکل ۵ نشان می دهد، پیک جذب برای طلا به صورت فلزی قابل مشاهده بود.



شکل ۵: نتایج XRD برای نانوذرات طلا

۳- آنالیز میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM): نتایج بررسی به وسیله میکروسکوپ الکترونی حضور نانوذرات طلا را در روماند کشت و در درون سلول های باکتریایی تایید نمود. سایز متوسط آن ها کمتر از ۱۰۰ نانومتر بود (شکل ۶). همچنین از سلول های باکتری نیز در روش تولید نانوذرات به صورت درون سلولی عکسبرداری و حضور نانوذراتی با سایز کوچکتر تایید گردید. تجمع نانو ذرات طلا در درون فضای سیتوپلاسمی به صورت کاملاً مشخص در شکل ۶ الف نشان داده شده است. همچنین در این شکل برخی از نانوذرات دارای اشکال مثلثی (سمت راست قسمت پایین سلول) نیز می باشند.



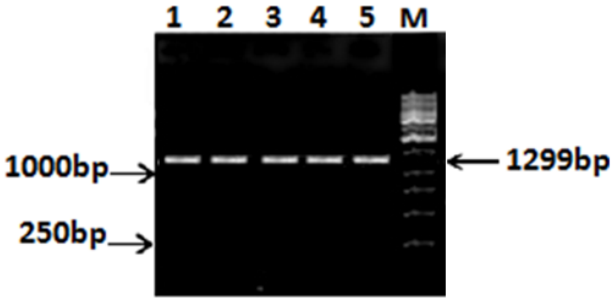
شکل ۶: شکل های میکروسکوپ الکترونی گذاره نانوذرات طلا تولیدی توسط یکی از جدایه های باکتریایی. الف) تولید نانوذرات درون سلولی ب) تولید نانوذرات خارج سلولی (اندازه بارها = ۱۰۰ nm)

و) شناسایی جدایه های باکتریایی:

۱- بررسی های فنوتایپینگ جدایه های باکتریایی: نتایج بررسی های فنوتایپی ۳ سویه که بهترین توانایی تولید نانوذرات طلا را به صورت درون و برون سلولی دارا بوده اند نشان داد که هر سه جدایه در جنس *باسیلوس* قرار داشتند.

۲- بررسی های ژنوتایپینگ جدایه های باکتریایی: پس از الکتروفورز محصولات PCR باندی به اندازه ۱۲۹۹ جفت باز مشاهده گردید (شکل ۷). پس از انجام تعیین توالی ۳ ژنوم باکتریایی مشخص گردید که باکتری شماره ۱ دارای ۹۹٪ همولوژی با ژنوم *باسیلوس موجاونسیس* سویه IFO15718 (*Bacillus mojavensis* strain IFO15718)، باکتری شماره ۲ دارای ۹۹٪ همولوژی با ژنوم *باسیلوس اسپیزیزنی* سویه NRRL B-23049 (*Bacillussubtilis subsp. spizizenii* strain NRRL

B-23049) و باکتری شماره ۳ دارای ۹۸٪ همولوژی با ژنوم *باسیلوس والیسمورتیس* سویه DSM11031 (*Bacillus vallismortis* strain DSM11031) بوده اند.



شکل ۷: باندهای به دست آمده از الکتروفورز محصولات PCR. M: مارکر ۱ کیلو جفت باز و باندهای ۱ تا ۵ مربوط به محصولات PCR می باشند.

ز) بررسی خواص ضد باکتریایی نانوذرات طلا تولید شده توسط جدایه های باکتریایی: نتایج بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات طلا تولیدی بر روی باکتری های مورد مطالعه نشان داد که نانوذرات تولیدی به روش خارج سلولی بهتر از نانوذرات تولیدی به روش درون سلولی توانایی مهار رشد باکتری های بیماری زا را دارند (جدول ۲). از طرفی کلرواوریک اسید به تنهایی اثر ضد باکتریایی کمتری نسبت به نانوذرات طلا داشته است.

بحث

در این مطالعه مشخص گردید که برترین سویه های تولید کننده نانوذرات طلا به جنس *باسیلوس* تعلق داشتند. همچنین نانوذرات تولیدی به روش خارج سلولی بهتر از نانوذرات تولیدی به روش درون سلولی توانایی مهار رشد باکتری های بیماری زا را داشتند.

امروزه یکی از مهم ترین نیازها در نانوتکنولوژی دسترسی به روشی بی ضرر جهت تولید نانوذرات فلزی مختلف می باشد. همانگونه که در مقدمه اشاره شد، نانوذرات فلزات مختلف توسط روش های شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیک قابل تولید می باشند. سنتز به روش بیولوژیک نسبت به دو روش فیزیکی و شیمیایی بهتر عمل می نماید. زیرا در مصرف انرژی و هزینه ها با صرفه تر عمل نموده و سرعت تولید بالاتری در مقایسه با روش های معمول دیگر دارد. علاوه بر این در روش های فیزیکی و شیمیایی چنانچه هدف تولید مقادیر زیادی از نانوذرات باشد معمولاً تولید انبوه سبب افزایش سایز ذرات شده که از میکرومتر تجاوز می نماید. در حالیکه روش بیولوژیکی می تواند به صورت موثری در تولید نانوذرات با سایز کوچک ولی در حجم بزرگ عمل نماید. تولید نانوذرات فلزی به وسیله سیستم های بیولوژیکی، به کمک بررسی میکروارگانیسم ها و تنظیم شرایط مناسب محیط کشت مانند دما، به هم زنی محیط و

جدول ۲: نتایج بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات طلا تولیدی توسط یکی از جدایه های مورد بررسی

باکتری های مورد بررسی	کلرواوریک اسید (mm)	نانوذرات طلا درون سلولی (mm)	نانوذرات طلا خارج سلولی (mm)
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۹	۲۰	۲۵
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۰	۱۵	۱۸
استرپتوکوکوس فاسیوم	۹	۱۵	۲۰
لیستریا مونوسیتوژنز	۹	۱۴	۲۰
شیگلا دیسانتریه	۱۰	۱۵	۲۰
اشریشیا کلی	۸	۱۹	۲۵
کلبسیلا نمونیا	۱۰	۱۴	۲۰
یرسینیا انتروکولیتیکا	۱۰	۱۳	۲۰
سودوموناس آئروجینوزا	۱۰	۱۴	۲۰
پروتئوس میرابیلیس OXK	۱۰	۱۴	۲۰

سایر شرایط فیزیکی قابل انجام می باشد (۱۹). در تولید به صورت بیولوژیک، میکروارگانیسم های متنوعی توانایی تولید نانوذرات فلزی را از طریق احیا یون های فلزی موجود در محیط دارند که شامل انواعی از باکتری ها، قارچ ها و ویروس ها می باشند. انواعی از آنزیم ها، مواد احیا کننده، پلی ساکاریدهای خارج سلولی و شاتل های الکترونی در فرآیند احیا موثر می باشند (۱۹).

چنانچه آنزیم های احیا کننده یون های فلزی در درون سلول قرار داشته باشند، احیا به صورت درون سلولی و چنانچه این آنزیم ها در خارج از سلول توسط میکروارگانیسم آزاد شود، سنتز برون سلولی خواهد بود (۱۹). در بسیاری از مواقع هر دو دسته آنزیم ها در فرآیند احیا یون های فلزی و غیر فعال نمودن اثرات سمی آن ها برای میکروارگانیسم ها دخیل می باشند. از میان میکروارگانیسم های درگیر در فرآیند بیوسنتز نانوذرات معمولاً قارچ ها دارای توانایی احیا قوی تری نسبت به باکتری ها می باشند. اما به دلیل تولید اگزوپلی ساکاریدهای خارج سلولی توسط قارچ ها، معمولاً نانوذرات تولیدی به آسانی قابل تخلیص نمی باشند (۱۹).

در مطالعه حاضر به بررسی تولید سبز نانوذرات طلا توسط باکتری های جداسازی شده از خاک پرداخته شد. یکی از اهداف مهم این پژوهش، دستیابی به باکتری هایی با بیشترین توانایی تولید نانوذرات طلا به صورت درون و برون سلولی بوده است. باکتری های به دست آمده شامل *باسیلوس موجاونسیس* سویه IFO15718، *باسیلوس اسپیزیزنی* سویه NRRL B-23049، *باسیلوس والیسمورتیس* سویه DSM11031 بوده اند. تاکنون گزارشی مبنی بر بیماری زا بودن این جدایه ها وجود نداشته و چنانچه ایجاد بیماری نمایند، عفونت های فرصت طلب ایجاد می کنند. بنابراین این باکتری ها برای افراد سالم جامعه خطرناک نبوده و می توان آن ها را بدون هیچ مشکلی در راکتورهای صنعتی کشت و جهت تولید نانوذرات طلا از آن ها استفاده نمود (۲۰).

امروزه استفاده از نانوذرات طلا به عنوان ماده ضد باکتری قدمی بسیار بزرگ در تولید دارو می باشد. بررسی ها نشان داده است که نانوذرات تولیدی نه تنها ارزان و مقرون به صرفه می باشند، بلکه تولید آن ها ساده و پایدار نیز می باشد.

در مطالعه انجام شده تعداد زیادی از باکتری ها به منظور تولید نانو ذرات طلا غربال گردیدند. از این میان توانایی تولید نانو ذرات طلا به صورت درون و برون سلولی توسط سه جدایه خاک در مدت ۲۴ ساعت مشخص گردید. تولید نانوذرات طلا در محیط با تغییر رنگ واضح محیط کشت به صورتی تا بنفش قابل ردیابی بود. این تغییر رنگ از تغییرات رزونانس سطحی نانوذرات ناشی می شود که به دلیل افزایش سطح ذرات نسبت به حجم آن ها می باشد. با استفاده از اسپکتروفوتومتر، حضور نانوذرات طلا به دلیل تغییر در جذب نوری محلول قابل پیگیری بود. به منظور تایید تولید نانوذرات طلا از میکروسکوپ الکترونی گذاره و پراش اشعه اکس استفاده گردید. نتایج نشان دادند، نانوذرات طلا توسط ۳۸ گونه مختلف باکتریایی جداسازی شده از خاک قابل تولید می باشند.

در بررسی توسط پراش اشعه اکس، حداقل حضور ۴ پیک از فلز طلا دیده شد که نشان دهنده حضور این فلز در محیط واکنش است. همانگونه که تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان دادند، اندازه متوسط نانوذرات برون سلولی نسبت به درون سلولی بیشتر بوده است (حدود ۳ برابر). احتمالاً این حالت به دلیل ابعاد باکتری می باشد که سایز نانوذرات طلا تولیدی به روش درون سلولی متاثر از اندازه سلولی، کوچکتر شده است. در این مطالعه حضور اشکال کروی تا چند ضلعی در تولید برون سلولی طلا و حضور اشکال کروی، چند ضلعی و مثلثی در تولید درون سلولی طلا مشاهده گردید. حضور اشکال مثلثی از نانوذرات طلا در درون سلول، حاکی از این واقعیت دارد که احتمالاً آنزیم های درگیر در فرآیند احیای نانوذرات به صورت درون سلولی با آنزیم های درگیر در آن به صورت برون سلولی متفاوت می باشند.

در بررسی فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات تولیدی، تاکنون گزارشی که به منظور تولید نانوذرات درون سلولی از غلظت های SIC یون فلزی استفاده کرده باشد، وجود نداشته است. در این تحقیق به صورت آزمایشی از رقت نهایی ۱ میلی مولار

کلرواوریک اسید جهت تولید نانوذرات طلا به صورت درون سلولی استفاده گردید. در این حالت پس از حدود ۵ روز تغییر رنگ اندکی در محیط واکنش دیده شد. در حالی که استفاده از غلظت های SIC در تولید درون سلولی نانوذرات نشان داد که تولید بالاتر از نانوذرات طلا با این روش قابل انجام است.

علاوه بر این برای جداسازی نانوذرات تولیدی از درون باکتری، در بیشتر مطالعات از دستگاه اولتراسونیک به منظور شکست فیزیکی سلول ها استفاده شده است. برای مثال کالیشوارالال (Kalishwaralal) و همکاران در سال ۲۰۱۰، به بررسی توانایی تولید نانوذرات نقره و طلا به صورت درون سلولی توسط باکتری *بروی باکتریوم کازئی* (*Brevibacterium casei*) پرداختند. آنها با موفقیت توانستند نانوذرات فلز را با روش اولتراسونیک از سلول باکتری خارج نمایند (۶). اما در مطالعه حاضر استخراج نانوذرات طلا تولید شده به صورت درون سلولی به صورت موفقیت آمیزی با استفاده از ذرات شیشه و سرما انجام شد.

ارزیابی خواص ضد باکتریایی نانوذرات طلا تولید شده به روش درون و برون سلولی برای یکی از سه سویه جداسازی شده از خاک نشان داد که نانوذرات طلا تولیدی به صورت برون سلولی خواص ضد باکتریایی قوی تری نسبت به نوع درون سلولی داشته است. دلیل این حالت مشخص نیست زیرا مطالعات نشان داده اند که با کوچک شدن اندازه نانوذرات به حدود ۱۰ نانومتر، خواص ضد باکتریایی آن ها افزایش می یابد (۴). در مورد عوامل مختلف تاثیر گذار بر خواص ضد میکروبی نانوذرات تولیدی به روش درون سلولی، این حالت محتمل است که میکروارگانیسم ها در درون سلول نانوذرات تولیدی را با پروتئین ها و یا مواد آلی دیگری همراه نموده و تشکیل اندوخته هایی را داده اند که سبب شده نانوذرات به صورت خنثی عمل نموده و سمیت کمتری برای میکروارگانیسم ها داشته باشند (۵).

علاوه بر این شکل نانوذرات نیز در خواص ضد باکتریایی آن ها موثر است. به طوری که نانوذرات مثلثی اثر ضد باکتریایی قوی تری دارند. این یافته با نتیجه به دست آمده در این مطالعه هم خوانی دارد. احتمال دارد نانوذرات تولید به روش برون سلولی نیز دارای اشکال تیز و برنده ای مانند شکل مثلثی بوده باشند. همانگونه که تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داده اند، نانوذرات طلا تولیدی به روش برون سلولی دارای انواعی از ابعاد می باشند که برخی از آن ها از ۱۰ نانومتر نیز کوچک ترند. بنابراین احتمالاً نانوذرات تولیدی به روش برون سلولی قوی تر از درون سلولی عمل نموده اند.

مطالعاتی در مورد بررسی اثرات ضد باکتریایی نانوذرات مختلف فلزی مانند طلا و نقره، وجود دارد. برای مثال فیاز (Fayaz) و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی بیوسنتز نانوذرات نقره پرداخته و اثر سینرژیستیک آن را با آنتی بیوتیک های رایج بررسی نمودند (۲۱). نتایج آنها افزایش اثر ضد باکتریایی آنتی بیوتیک ها را به وسیله نانوذرات نقره نشان داد. آن ها دریافتند که خواص ضد باکتریایی آنتی بیوتیک های رایج به همراه نانوذرات نقره بر روی باکتری های گرم منفی، به دلیل تفاوت در دیواره سلولی بیشتر از باکتری های گرم مثبت بوده است.

با این حال در مطالعه حاضر نشان داده شد که اثر خالص ضد باکتریایی نانوذرات طلا بر روی هر دو گروه باکتری ها وجود دارد و تقریباً بر روی هر دو دسته باکتری ها به یک میزان عمل می نماید. دلیل این حالت توانایی عمل نانوذرات طلا بر روی قسمت های مختلف حیاتی سلول مانند تولید انرژی، حرکت سلول های میکروبی و پروتئین سازی می باشد که در هر دو گروه باکتری ها اهداف مشترکی محسوب می شوند (۷).

اگرچه بر خلاف یافته های به دست آمده از این تحقیق یوون (Yoon) و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که *باسیلوس سوبتلیس* (*Bacillus subtilis*) (گرم مثبت) نسبت به *اشریشیا کلی* (*E. coli*) (گرم منفی) به نانوذرات نقره حساسیت بیشتری دارد (۲۲). نانادا (Nanda) و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که نانوذرات نقره بر روی باکتری های گرم مثبت عملکرد بهتری دارند (۴). دلیل این امر احتمالاً به ساختار و اندازه نانوذرات وابسته است.

برخی از مطالعات نیز حاکی از بی اثر بودن نانوذرات طلا بر روی باکتری *اشریشیا کلی* بوده اند (۲۳). روپارلیا (Ruparelia)

و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که این اثر وابسته به نوع سویه ارگانیسم هدف می باشد. به طوری که برخی از سویه های *اشریشیا کلی* نسبت به سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) به نانوذرات نقره مقاومت بیشتری داشته اند (۲۴). بنابراین تفاوت های فردی بین زیرگونه های مختلف از یک گونه باکتریایی منفرد می تواند در حساسیت یا مقاومت به نانوذرات فلزی تعیین کننده باشد.

نکته ای که وجود دارد این است که حساسیت باکتری ها نسبت به نانوذرات فلزات مختلف وابسته به گونه باکتری تولید کننده نانوذرات، سایز، شکل و غلظت نانوذرات و نوع نانوذرات تولیدی و نیز شرایط فیزیکوشیمایی محیط واکنش می باشد (۷). همچنین اکثر مطالعات بر روی نانوذرات نقره متمرکز شده اند، لذا بنا به دلایل یاد شده نتایج نامشابهی به دست می آید. در مطالعه حاضر نانوذرات طلا تولیدی بر ضد چند نوع از باکتری های بیماری زای گرم منفی و گرم مثبت مورد بررسی قرار گرفتند. قطر هاله عدم رشد برای باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (*Staphylococcus epidermidis*) ، حدود ۲۵ میلی متر بوده که نسبت به سایر باکتری های مورد آزمون حساسیت بیشتری داشته است. باکتری یاد شده فلور طبیعی پوست انسان بوده و به بسیاری از آنتی بیوتیک ها مقاوم می باشد. علاوه بر این، باکتری گرم مثبت دیگر یعنی *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز به نانوذرات طلا حساسیت داشته و قطر هاله عدم رشد آن در مورد نانوذرات تولیدی به روش برون سلولی حدود ۱۸ میلی متر بوده است. این باکتری نیز از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی مقاوم به دارو به شمار می رود. لذا همانگونه که گزارش شده است نانوذرات طلا تولیدی به صورت بیولوژیک دارای اثر ضد باکتریایی قوی می باشند. از باکتری های گرم منفی مهم می توان به *سودوموناس آئروجینوزا* (*P. aeroginosa*) و *شیگلا دیسانتریه* (*Shigella dysenteriae*) اشاره نمود. قطر هاله عدم رشد برای آن ها در مورد نانوذرات برون سلولی به حدود ۲۰ میلی متر می رسد. این دو باکتری نیز از پاتوژن های خطرناک انسانی به شمار می روند. به طوری که *سودوموناس آئروجینوزا* رتبه اول را در بین عوامل مسبب عفونت های بیمارستانی دارا می باشد.

نتیجه گیری

امروزه با توجه به ایجاد سویه های مقاوم به چند دارو ضرورت دستیابی به روش های مناسب و بی ضرری که بتواند با عفونت های حاصل از آن ها مقابله نماید احساس می گردد. نانوذرات تولید شده با روش بیولوژیکی دارای اثرات ضد باکتریایی مناسبی علیه سویه های ایجاد کننده عفونت های انسانی می باشند. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، در بررسی های بیشتری که در آینده به عمل خواهد آمد امید است بتوان به شرایط ایده آلی دست یافت که طی آن با تنظیم عوامل محیطی، نانوذراتی با شکل و اندازه دلخواه را از باکتری ها سنتز نمود. علاوه بر این بررسی خواص ضد باکتریایی نانوذرات فلزی تولید شده و بررسی اندازه و شکل آن ها توسط سایر باکتری های به دست آمده از این تحقیق، از دیگر مطالعات پیش رو می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nano-medicine. 2010; 6(2): 257-262.
2. Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. Microbial resistance to metal in the environment. Ecotoxicol Environ Saf. 2000; 45(3): 198-207.

3. Beveridge TJ, Hughes MN, Lee H, Leung KT, Poole RK, Savvaidis I, Silver S, Trevors JT. Metal–microbe interactions: contemporary approaches. Adv Microb Physiol. 1997; 38: 177-243.

4. Nanda A, Saravanan M, Hil MP. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. Nanomedicine. 2009; 5: 452-456.

5. Mollazadeh Moghaddam K. An introduction to microbial metal nanoparticle preparation method. J Young Invest. 2010; 19: 18-24.

6. Kalishwaralal K, Deepak V, Ram Kumar Pandian S, Kottaisamy M, BarathmaniKanth S, Kartikeyan B, Gurunathan S. Biosynthesis of gold & silver nanoparticles using *Brevibacterium casei*. Colloids Surf B Biointerfaces. 2010; 77(2): 257-262.

7. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnol Adv. 2009; 27: 76-83.

8. Gericke M, Pinches A. Biological synthesis of metal nanoparticles. Hydrometallurgy. 2006; 83: 132-140.

9. Longoria EC, Vilchis-Nestor AR, Avalos-Borja M. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Colloids Surf B Biointerfaces. 2010; 1: 32-38.

10. Kalimuthu K, Babu RS, Venkataraman D, Bilal M, Gurunathan S. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis.* Colloids Surf B Biointerfaces. 2008; 65: 150-153.

11. He S, Guo Z, Zhang Y, Zhang S, Wang J, Gu N. Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodopseudomonas capsulate.* Mater Lett. 2007; 61: 3984-3987.

12. Kim JS. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine. 2007; 3: 95-101.

13. Agnihotri M, Joshi S, Ravi Kumar A, Zinjarde S, Kulkarni S. Biosynthesis of gold nanoparticles by the tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. Mater Lett. 2009; 63 : 1231-1234.

14. Binupriya AR, Sathishkumar M, Vijayaraghavan K, Yun SI. Bioreduction of trivalent aurum to nano-crystalline gold particles by active and inactive cells and cell-free extract of *Aspergillus oryzae var. viridis*. J Hazard Mater. 2010; 177(1-3): 539-545.

15. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd. Springer. 2005.

16. Pourali P, Roayaei Ardakani M, Jolodar A, Razi Jalali MH. PCR screening of the *Wolbachia* in some arthropods and nematodes in Khuzestan province. Iran J Vet Res, Shiraz Uni. 2009; 10: 28-34.

17. Wilson B, Danilowicz BS, Meijer WG. The diversity of bacterial communities associated with Atlantic cod *Gadus morhua*. Microb Ecol. 2008; 55: 425-434.

18. Wang T, Yang L, Zhang B, Liu J. Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in H2O2 biosensor the red Se nanoparticles. Colloids Surf B

Biointerfaces. 2010; 80: 94-102.

19. Sadhasivam S, Shanmugam P, Yun K. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces hygroscopicus* and antimicrobial activity against medically important pathogenic microorganisms. Colloids Surf B Biointerfaces. 2010; 81: 358-362.

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

21. Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Techc M, Kalaichelvan PT, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine. 2010; 6: 103-109.

22. Yoon K, Byeon JH, Park J, Hwang J. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. Sci Total Environ. 2007; 373: 572-575.

23. Cho KJ, Park T, Osaka S. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochim Acta. 2005; 51: 956-960.

24. Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttagupta SP, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Free Radic Biol Med. 2011; 363: 481-489.

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 3, October 2013

Original Article

Biological production and assessment of the antibacterial activity of gold nanoaprticles

Parastoo Pourali[1], **Majid Baseri Salehi**[2], **Sima Afsharnezhad**[3], **Javad Behravan**[4]

[1] Assistant Professor, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Science, Kazeroun Branch, Islamic Azad University, Kazeroun, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Biochemistry, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
[4] Professor, Biotechnology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Abstract

Background and Objectives: In addition to safety, nanoparticles produced via biological methods show antimicrobial activity against human pathogens. This study was aimed to isolation and identification of intracellular and extracellular gold nanoparticle producing strains from soil and to investigate the antimicrobial effects of the produced nanoparticles on 10 common bacterial pathogens.

Materials and Methods: In this study, after isolation of bacteria from the soil and production of the gold nanaoparticles by their supernatants and their pure cells, the bio-production was confirmed through visible spectrophotometry, transmission electron microscopy (TEM) and X-ray diffraction analysis (XRD). The nanoparticle producing stains were identified based on gene amplification by PCR and gene sequencing. Finally, the antibacterial properties of the produced gold nanoaprticles against 10 pathogenic bacteria was assessed by well diffusion method.

Results: Results showed that 38 strains had ability to produce extracellular gold nanoparticles. Among them 16 strains had ability to produce intracellular gold nanoparticles as well. TEM images of the gold nanoparticles showed sizes less than 100 nm and the XRD patterns confirmed the crystalline structure of the gold nanoparticles. Three bacterial strains, *Bacillus mojavensis, Bacillus subtilis* and *Bacillus vallismortis,* showed higher productivity. Antibacterial tests showed that the extracellular gold nanoaprticles had better activity against pathogenic bacterial strains than the intracellular produced ones.

Conclusion: Production of gold nanoparticles was performed by biological method. This nanoparticles showed a same antibacterial activity against both tested gram positive and negative bacteria.

Keywords: Bioproduction, Gold nanoparticles, Antibacterial activity.

Correspondence to: Parastoo Pourali

Tel: +989155139380

E-mail: parastoo_pourali@yahoo.com

Journal of Microbial World 2013, 6(3): 198-211.