سنتز سریع و برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم توسط *Pseudomonas* Cd11 *pseudoalcaligenes* و بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن

مراحم آشنگرف* و ارسلا ن خالدی

سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۰

چکیده

نانوذرات سولفید کادمیوم به دلیل ویژگیهای خاص فوتوالکتریکی کاربردهای فراوانی در ساخت سلولهای خورشیدی حساس به رنگ، دیودهای انتشارگر نوری و ساخت نانوبیوسنسورها دارد. در این پژوهش، سنتز سبز و برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم توسط سویه های باکتری آبزی مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات سنتز شده از طریق طیفهای جذبی و نشری فلورسانس، طیف سنج پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)، تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی (SEM) و همچنین طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون‌قرمز (FTIR) مورد بررسی قرار گرفت. ۳۲ سویه باکتریایی آبزی مقاوم به کادمیوم براساس تکنیک غنی سازی جداسازی شد که در این میان *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain Cd11 قادر به سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم بود. سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم تولید شده توسط سویه باکتری مذکور تحت شرایط بهینه واکنش مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده، سوپرناتانت کشت سویه مذکور بعد از مواجهه با محلول سولفات کادمیوم (غلظت ۳ میلی‌مولار از یون کادمیوم)، قادر به سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم کروی در محدوه پراکنش ذرات بین ۱۲ تا ۱۹ نانومتر با میانگین اندازه ۱۵/۵ نانومتر در pH برابر ۸ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد پس از ۱۰ ساعت گرماگذاری بود. نتایج اثرات ضدمیکروبی به روش انتشار از چاهک بر سطح آگار نشان داد که نانوذرات زیستی تولیدشده علیه همه میکروبهای تست‌شده اثر مهارکنندگی رشد را دارد. نانوذرات سولفید کادمیوم سنتز شده در مطالعه اخیر دارای دامنه پراکنش اندازه ذرات مناسب و همگن بوده که همین امر کارآیی نانوذرات زیستی سنتز شده را مناسب می کند.

واژه های کلیدی: نانوسولفید کادمیوم، سنتز برون سلولی، الگوی مقاومت، خاصیت ضد میکروبی، *P. pseudoalcaligenes* Cd11

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۳۶۶۴۶۰۰-۰۸۷، پست الکترونیکی: m.ashengroph@uok.ac.ir

مقدمه

نانوذرات سولفید کادمیوم دارای خواص فیزیکی، شیمیایی و ساختاری منحصر به فرد نسبت به حالت بالک هستند. نقطه ذوب، طیف جذب نوری، ساختار بلوری و دیگر خواص نانو ذرات سولفید کادمیوم، همگی تحت تأثیر اندازه نانوذرات است. با توجه به پایداری بالا، خواص شیمیایی، فیزیکی و ساختاری منحصربه فرد، در دسترس بودن و سهولت آماده سازی، نانو ذرات سولفید کادمیوم را می‌توان در زمینه‌های مختلف زندگی به‌کار برد. با در نظر گرفتن اثرات سطح و اثرات اندازه کوانتومی نانو ذرات سولفید کادمیوم می‌توانند خواص جدید نوری، الکترونیکی، مغناطیسی، شیمیایی و ساختاری را نمایش دهند که ممکن است در بسیاری از زمینه‌های فناوری کاربرد داشته باشند. بنابراین نانوذرات سولفید کادمیوم در مجموعه یک سیستم جذاب برای بررسی سنتیک شیمیایی نانوکریستالها و نحوه ساخت مراحل نانو مواد و همچنین کاربردهای مختلف آن است (۳۱). از کاربردهای نانوذرات

سولفید کادمیوم می‌توان به ساخت نانو بیوسنسورهای الکتروشیمیایی (۱۷)، سیستمهای تحویل دارو (قابلیت حمل دزهای مؤثری از دارو به سلولهای بافت هدف) (۲۹) و همچنین تجزیه آب و تولید هیدروژن (۳۵) به منظور ایجاد توسعه منابع انرژی پاک و جایگزین جدید مانند تولید فوتوکاتالیتکی هیدروژن از منابع طبیعی نظیر آب و انرژی خورشید انجام شده است، اشاره نمود. انواع مختلف روشهای فیزیکی و شیمیایی از جمله استفاده از لیگاندهای سمی جهت ایجاد حلالیت در حلالهای آلی (۱۸)، روش سنتز از فاز بخار (۲۴)، روش پرتو لیزر-پالسی (۳۱) و روش سنتز احتراقی (۳) برای سنتز کوانتوم دات سولفید کادمیوم وجود دارد. استفاده از روشهای سنتزی فیزیکی به دلیل هزینه بالای تجهیزات و راندمان پایین و همچنین روشهای سنتز شیمیایی به دلیل نیاز به مواد شیمیایی قوی و عوامل حفاظتی (سدیم بوروهیدرات، سدیم سیترات و الکل) که اکثراً سمی و قابل اشتعال بوده و به علت مسائل زیست محیطی با محدودیت و چالشهای جدی روبرو شده است (۳ و ۲۷). این در حالی است که فرآیند سنتز زیستی با استفاده از سلولهای میکروبی نسبت به روشهای فیزیکی و شیمیایی یک تکنیک کم هزینه، غیر سمی و با وجود راندمان نسبتاً پایین صنعتی، یک رویکرد سازگار با محیط زیست می‌باشد (۱۰). بنابراین باتوجه به نکات فوق، هر چند با روشهای شیمیایی وفیزیکی می‌توان مقدار زیادی نانوذره با اشکال متفاوت در زمان نسبتاً کوتاهی تولید کنند اما این روشها قدیمی، پیچیده و پرهزینه هستند و باعث تولید ضایعات سمی می‌شوند که نه تنها به محیط زیست بلکه به سلامت انسان نیز آسیب می‌رسانند. در روش زیستی با استفاده از سلولهای میکروبی به‌عنوان کاتالیزگر استفاده از مواد شیمیایی گران قیمت حذف می‌شود. همچنین انرژی مصرفی در این روش بسیار کمتر از روشهای شیمیایی است و باتوجه به سازگار بودن با محیط زیست یک تکنیک برتر است (۱۶). علیرغم سمیت کادمیوم برای بسیاری از میکروارگانیسم‌ها تعدادی از آنها نه تنها در برابر آن مقاوم هستند بلکه قادر به احیای آن به صورت نانو ذرات سولفید کادمیوم و اکسید کادمیوم می-باشند (۲۲). دامرون (Dameron) و همکاران اولین کسانی بودند که در سال ۱۹۸۹ با استفاده از سویه های مخمری *Candida glabrata* و *Schizosaccharomyces pombe* کشت داده شده در حضور نمکهای کادمیوم موفق به سنتز درون سلولی نانوذرات نیمه هادی سولفید کادمیوم شدند، آنها گزارش دادند که تشکیل نانوذرات سولفید کادمیوم بستگی به مرحله‌ای از رشد باکتری دارد که طی آن یونهای کادمیوم اضافه می‌شود و هنگامی که یون کادمیوم در مرحله رشد لگاریتمی اضافه گردد حداکثر تولید نانوذره به دست خواهد آمد (۹). سنتز درون سلولی و برون سلولی زیستی نانوذرات سولفید کادمیوم در طیف وسیعی از سویه‌های مختلف میکروبی متعلق به جنسهای باکتریایی و قارچی شامل *Clostridium* (۸)، *Klebsiella* (۱۱)، *Schizosaccharomyces* (۱۵)، *Fusarium* (۲)، *Escherichia coli* (۳۲)، *Rhodopseudomonas* (۴)، *Coriolus* (۲۸)، *Sachharomyces* (۲۳)، *Phormidium* (۱۹)، *Serratia* (۲۳)، *Pseudomonas* (۲۶) گزارش شده است. در این پژوهش، قابلیت ذاتی سویه‌های بومی باکتریایی آبزی به‌عنوان زیست کاتالیزگر در احیای زیستی سولفات کادمیوم به نانوذرات سولفید کادمیوم و همچنین بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوذرات سبز سنتز شده مورد بررسی قرار گرفته و برای نخستین بار سنتز سریع و خارج سلولی نانوکوانتوم دات سولفید کادمیوم در سویه بومی متعلق به *P. pseudoalcaligenes* Cd11 گزارش شده است.

مواد و روشها

نمونه برداری، غنی سازی و جداسازی سویه های باکتری: برای غنی سازی باکتریهای آبزی بومی مقاوم به یون کادمیوم، نمونه گیری از عمق ۱۵ تا ۳۰ سانتیمتری از آبهای مناطق مختلف ایران شامل سواحل بوشهر، سواحل

جزایر قشم، کیش و لاوان و همچنین از آب چشمه های مختلف استان کردستان و کرمانشاه انجام شد. نمونه های آب در ظروف دردار استریل جمع آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا هنگام استفاده نگهداری شدند. ۲۰ میلی لیتر از نمونه های آب جمع آوری شده به لوله‌های فالکون ۴۵ میلی لیتری استریل منتقل شد و در دور g × ۴۵۰۰ به مدت۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی را دور ریخته و مقدار یک میلی لیتر از مایع تحتانی به محیطها ی کشت غنی شده و انتخابی تریپتیک سوی آگار منتقل شد. به محیطهای کشت مذکور، یون کادمیوم در غلظت نهایی ۰/۵میلی مولار، پس از استریل شدن توسط فیلترهای سرسرنگی ۰/۲۵میکرونی، افزوده شد. پلیتها به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند . کلنیهای باکتریایی با استفاده از ویژگیهای ظاهری مشخص شدند. به منظور خالص سازی سویه‌های باکتری غنی شده، هر کلنی باکتری به محیطهای کشت تریپتیک سوی آگار حاوی ۰/۵ میلی مولار کادمیوم منتقل و به روش خطی کشت داده شد. تجدید کشت تا حصول اطمینان از خالص بودن جدایه‌های باکتری انجام شد.

تعیین الگوی مقاومت سویه‌های باکتری جدا شده نسبت به یون سمی کادمیوم: از روش میکروپلیت با استفاده از چاهکهای الیزای ۹۶ تایی برای سنجش میزان تحمل پذیری به یون سمی کادمیوم استفاده شد (۶). برای این منظور ابتدا محلولهای استوک کادمیوم در آب مقطر استریل تهیه شد. پس از آن با استفاده از پالایه‌های غشایی میلی پور ۰/۲ میکرونی استریل شد. میزان تراکم استفاده شده برای یون کادمیوم بر حسب میلی مولار عبارت بود از ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵، ۸، ۸/۵، ۹، ۹/۵، ۱۰، ۱۰/۵، ۱۱، ۱۱/۵ و ۱۲. پس از تهیه محلولهای استوک کادمیوم و تهیه رقتهایی از تراکمهای ذکر شده در محیط تریپتیک سوی براث، به میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده باکتریها (با تراکم ۰/۵ مک فارلند: 1.5×10^8 CFU/ml) به چاهکهای الیزای حاوی ۱۴۰ میکرولیتر تریپتیک سوی براث شامل غلظتهای مشخصی از یون کادمیوم، اضافه گردید. پلیتهای مذکور در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. پس از طی مدت زمان گرماگذاری، میزان کدورت باکتریایی توسط دستگاه الیزا ریدر در مقایسه با شاهدهای تهیه شده در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد.

بررسی توانایی سنتز خارج سلولی کوانتوم دات سولفید کادمیوم توسط سویه‌های باکتری مقاوم به کادمیوم: یک لوپ از باکتریهای رشد یافته تازه (۲۴ ساعته) بر روی محیط تریپتیک سوی آگار را به محیط تریپتیک سوی براث (۵۰ میلی لیتر محیط کشت تریپتیک سوی براث در یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری) تلقیح کرده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید. از این محیط به منظور تلقیح در محیطهای کشت استفاده گردید. ۵ درصد از سوسپانسیون های باکتری تهیه شده را در ارلنهای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع تریپتیک سوی براث در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بر روی شیکر مدور (۱۵۰ دور در دقیقه)، به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. برای جدا کردن توده زیستی باکتری از محیط کشت تریپتیک سوی براث، از سانتریفیوژ یخچالی با دور g ×۵۰۰۰ در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. پس از سه بار شستشو با آب دمین استریل، ۱۰ گرم از توده زیستی مذکور در ارلنهای ۲۵۰ میلی لیتری که حاوی ۵۰ میلی لیتر آب دمین استریل بود، ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتوردار در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۱۵۰ قرار داده شد. پس از طی دوره گرماگذاری، میسیلیوم‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ جدا شده و از سوپرناتانت‌های عاری از میسیلیوم باکتری جمع آوری شده به‌عنوان زیست کاتالیزگر

برای احیای زیستی سولفات کادمیوم به کوانتوم دات سولفید کادمیوم استفاده شد. برای این منظور به فلاسکهای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر از سوپرناتانت برداشت شده باکتری، محلول سولفات کادمیوم (با غلظت نهایی ۱ میلی مولار یون کادمیوم) اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۱۵۰ rpm گرماگذاری شد. به طور همزمان از محلول سولفات کادمیوم (بدون تلقیح سوپرناتانت کشت باکتری) و سوپرناتانت کشت (بدون حضور یون کادمیوم) به‌عنوان محیطهای کنترل منفی استفاده شد (۱). طیف جذبی نانوذرات سولفید کادمیوم تشکیل شده در محلول واکنش زیست تبدیلی، مورد آنالیز UV-visible spectrophotometer (مدل210 Specord ساخت کشور آلمان) قرار گرفت

شناسایی فنوتیپی و مولکولی سویه باکتری Cd11: شناسایی فنوتیپی و بیوشیمیایی سویه مذکور براساس شکل ظاهری، واکنش گرم، تستهای اکسیداز و کاتالاز، احیای نیترات، تست مصرف سیترات، هیدرولیز اوره، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز کازئین، هیدرولیز توین، هیدرولیز تیروزین، رشد در دماهای مختلف، تولید اسید از منابع کربوهیدراتی از جمله گلوکز، فروکتوز، آرابینوز، مانیتول، سوکروز، مالتوز، زایلوز و همچنین تولید اسید از منابع الکلی از جمله گلیسرول و اتانول طبق کتاب مرجع برگی (۱۲) انجام شد. استخراج DNAی ژنومی سویه مذکور با استفاده از روش جوشاندن صورت گرفت. در این روش سوسپانسیونی از کلنی خالص باکتری در یک میلی لیتر آب دوبار تقطیر استریل تهیه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار داده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه برروی یخ قرار داده می شود و پس از آن در دور g× ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. به دنبال سانتریفیوژ کردن، ۲ میکرولیتر از مایع رویی حاوی DNA به عنوان DNAی الگو برای واکنشPCR استفاده شد (۲۱). سپس ژن 16S rDNA با جفت آغازگرهای عمومی fd1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) و rp2 (ACGGCTACCTTGTTACGACTT) تکثیر شد (۳۴). شرایط اعمال شده در این واکنش مشتمل بود بر: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه سپس ۳۰ سیکل به صورت واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، چسبیدن پرایمر به DNA ژنومی در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد. بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه. نتایج مربوط به تعیین توالیهای رفت و برگشت پس از ویرایش توسط نرم افزارهای BioEdit و FinchTV به‌صورت یک توالی کامل تهیه شد. سپس توالیهای به دست آمده توسط نرم افزار BLAST موجود در بانک ژنی NCBI با باکتریهای موجود مقایسه شد. در ادامه به منظور تأیید نتایج حاصل از بلاست، درخت فیلوژنتیکی برای سویه Cd11 با استفاده از نرم افزار MEGA. 6 و بر پایه روش neighbor-joining و با بوت استرپ ۱۰۰ تکرار ترسیم شد. همچنین فاصله ژنتیکی بر پایه روش Kimura-2-parametr محاسبه شد (۳۳).

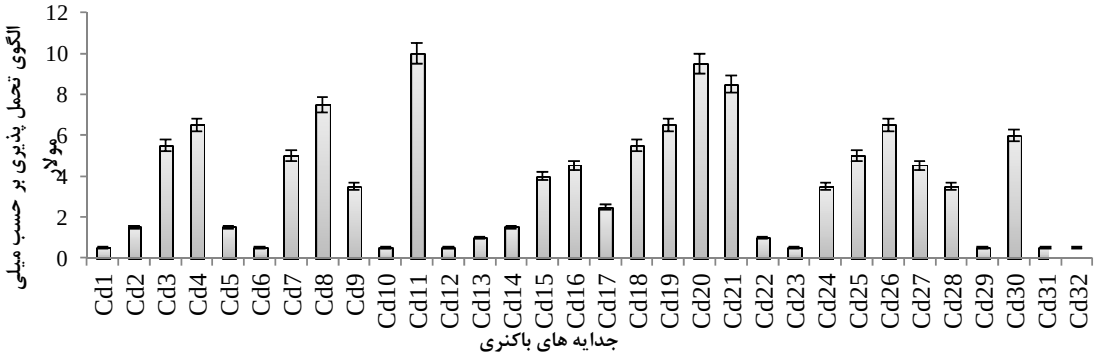
سنتز برون سلولی کوانتوم دات سولفید کادمیوم توسط سویه منتخب Cd11، بهینه سازی فرآیند و بررسی اثرات ضد باکتریایی: یک لوپ کامل از سویه باکتری Cd11، برداشت شده از یک کشت ۲۴ ساعته بر روی محیط تریپتیک سوی براث، به یک محلول نمکی استریل حاوی ۰/۸۵ درصد نمک سدیم کلراید منتقل شده و به مدت نیم ساعت بر روی یک شیکر دورانی با سرعت rpm ۲۰۰ همزده شد. حدود ۵ میلی لیتر از غلظت باکتری مورد نظر (1×10^{8} CFU/ml) به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع تریپتیک سوی براث درون فلاسکهای ۲۵۰ میلی لیتری و تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد و بر روی شیکر دورانی با سرعت rpm ۱۵۰به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. برای جدا کردن توده زیستی باکتری از محیط کشت

مایع تریپتیک سوی براث، از سانتریفیوژ یخچالی با دور g ×۵۰۰۰ در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. پس از سه بار شستشو با سرم فیزیولوژیک استریل، ۲۵ گرم از توده زیستی مذکور در ارلنهای ۲۵۰ میلی لیتری که حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آب دمین استریل بود، ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتوردار در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۱۵۰rpm قرار داده شد. پس از طی دوره گرماگذاری، توده باکتری با استفاده از سانتریفیوژ جدا شد. پس از جمع آوری، از سوپرناتانت عاری از توده زیستی باکتری، به-عنوان زیست کاتالیزگر، برای سنتز کوانتوم دات سولفید کادمیوم استفاده شد. برای این منظور به فلاسکهای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر از سوپرناتانت برداشت شده باکتری، محلول سولفات کادمیوم (با غلظت نهایی ۱ میلی مولار یون کادمیوم) اضافه شده و به مدت ۸ ساعت تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۱۵۰rpm گرماگذاری شد. به طور همزمان از محلول سولفات کادمیوم (بدون تلقیح سوپرناتانت باکتری Cd11) بعنوان محیط کنترل استفاده گردید. در ادامه و با هدف بهینه سازی فرآیند، بررسی اثر غلظتهای اولیه یون کادمیوم (۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی مولار)، اثرات دما (۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی گراد)، اثرات pH (۵، ۶، ۷، ۸ و ۹) و اثر دروه انکوباسیون (۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۲۴ و ۷۲ ساعت) بر روی سنتز نانوسولفید کادمیوم در محیط زیست تبدیلی تحت شرایط واکنش مذکور بررسی شد. همه آزمایشات در سه تکرار انجام شد. نانوذرات سولفید کادمیوم تشکیل شده در محیط زیستی حاصل از واکنش سوپرناتانت عاری از کشت باکتری Cd11 به‌عنوان زیست کاتالیزگر در معرض سولفات کادمیوم، با استفاده از تستهای دستگاه اسپکتروفتومتری UV-Vis، دستگاه فلورسانس (مدل Cary-Eclipse ساخت کشور آمریکا)، طیف سنج پراش انرژی پرتو ایکس، دستگاه FTIR **(مدل** Bruker, VECTOR 22 ساخت کشور آلمان)، هیستوگرام و منحنی نرمال مربوط به دامنه پراکنش اندازه نانوذرات سولفید روی و همچنین تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی(مدل Mira 3-LMu ساخت کشور چک) مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین طیف جذبی اسپکتروفتومتری و طیف نشر فلورسانس محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، نمونه‌ها با سرعت g ×۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، سانتریفیوژ شد. سپس آنالیزهای FTIR، EDX و SEM با هدف بررسی وضعیت نانو کریستالهای تشکیل شده و همچنین بررسی شکل و اندازه آنها انجام پذیرفت. برای این منظور ابتدا سوپرناتانت عاری از توده زیستی باکتری از فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد و سپس با هدف رسوب نانوذرات سولفید کادمیوم، اتانول مطلق به نسبت ۳ به ۱ به نمونه ها افزوده شد و پس از چند بار سانتریفیوژ (g × ۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه)، رسوب حاصل با آب دمین استریل شستشو داده شد. در نهایت نمونه ها در دستگاه فریزدرایر (مدل Alpha 1-2Dplus ساخت کشور آلمان) به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. فعالیت ضد میکروبی کوانتوم دات سولفید کادمیوم سنتز شده توسط سوپرناتانت کشت سویه باکتری Cd11 در برابر گونه‌های مختلف باکتریایی با پتانسیل تشکیل بیوفیلم بر سطوح زنده و غیر زنده از طریق اندازه‌گیری هاله عدم رشد و به روش انتشار چاهک بر سطح آگار سنجش شد. در این روش پس از آماده سازی سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل نیم مک فارلند (1×10^8 CFU/ml)، با استفاده از سوآپ استریل بر سطح محیط کشت نوترینت آگار، کشت چمنی از باکتریهای مورد مطالعه انجام شد. بعد به کمک چوب پنبه سوراخ کن چاهکهایی به قطر ۵ میلی متر ایجاد شد و کف چاهکها با استفاده از ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت حاوی نانوذرات سنتز شده پوشانده شد. سپس پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای مناسب گرماگذاری شدند. در نهایت با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد، میزان حساسیت باکتریها مورد سنجش قرار گرفت. باکتریهای مورد مطالعه شامل *E. coli* IBRC-M11018، *Bacillus*

Staphylococcus aureus ،*subtilis* IBRC-M10742 IBRC-M10690 ،*Pseudomonas aeruginosa* IBRC-M10828، *Lactobacillus plantarum* IBRC-M10817 و *Pseudomonas fluorescens* IBRC-M10752 بودند. این میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه به‌صورت آمپول لیوفلیزه از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران، خریداری شد.

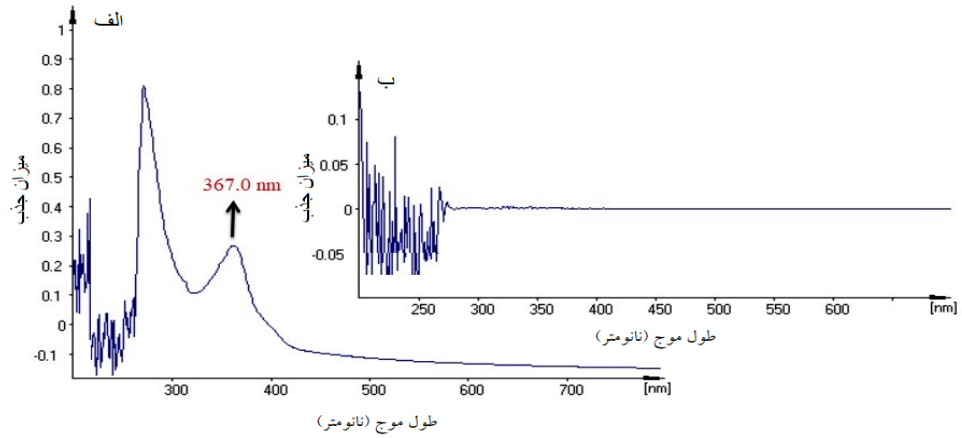
نتایج

جداسازی سویه‌های باکتری آب‌زی دارای تحمل پذیری بالا به یون سمی کادمیوم: در مجموع ۳۲ سویه باکتریایی (که حداقل مورفولوژی متفاوتی داشتند) در محیط غنی کننده تریپتیک سوی براث/آگار حاوی ۰/۵ میلی مولار یون کادمیوم، از ۲۵ نمونه آب جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران جداسازی شد. تحمل پذیری ذاتی این سویه ها نسبت به یون سمی کادمیوم به وسیله روش میکروپلیت الیزا تعیین گردید. براساس نتایج به دست آمده، ۳۲ سویه باکتری جداسازی شده تحمل پذیری بین ۰/۵ تا ۱۰ میلی مولار را نسبت به یون سمی کادمیوم از خود نشان دادند (شکل ۱). در این میان ۱۱ سویه باکتری (نامگذاری شده تحت عنوان Cd3, Cd4, Cd7, Cd8, Cd11, Cd18, Cd19, Cd20, Cd21, Cd26, Cd30) که تحمل پذیری بالاتر از ۵ میلی مولار را از خود نشان دادند انتخاب و جهت بررسی قابلیت احیای یون سولفات کادمیوم به نانو سولفید کادمیوم (به صورت خارج سلولی) در محیط تریپتیک سوی براث مورد بررسی قرار گرفتند.



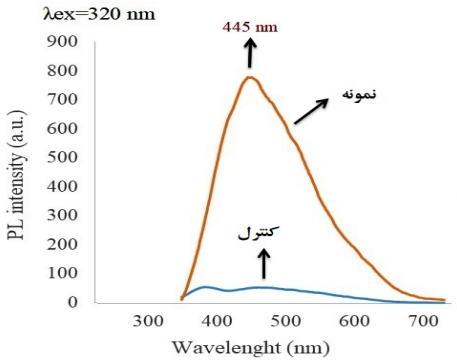
شکل ۱- الگوی تحمل پذیری سویه‌های باکتری آبزی به یون سمی کادمیوم در محیط کشت تریپتیک سوی براث

از میان ۱۱ سویه باکتری با قابلیت تحمل پذیری بالا نسبت به یون سمی کادمیوم، تنها سوپرناتانت کشت سویه Cd11، جدا شده از آب جمع آوری شده از سواحل قشم، قادر به احیای خارج سلولی یونهای کادمیوم به نانو سولفید کادمیوم در غلظت ۱ میلی مولار از یون سمی کادمیوم بود که با استفاده از آنالیزهای طیف سنجی جذبی و نشری UV-vis اسپکتروفتومتری و فلورسانس مشخص شد. آنالیز نمونه‌ها با اسپکتروفتومتری UV-vis، یک پیک جذبی مشخص را در طول موج نانومتر ۳۶۷ نانومتر (پیک اختصاصی برای نانوذرات سولفید کادمیوم) را نشان داد که بیانگر وجود کوانتوم دات سولفید کادمیوم در مخلوط واکنش زیست تبدیلی است (شکل ۲ قسمت الف). براساس منابع معتبر بیشینه پیک جذبی نانوذرات سولفید کادمیوم در طول موجهای ۳۶۰ تا ۴۲۵ نانومتر می باشد (۴). در محلول کنترل (عاری از سوپرناتانت کشت باکتری)، در طول موجهای بین ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر هیچ پیک جذبی مشاهده نشد (شکل ۲ قسمت ب).



شکل ۲- طیفهای اسپکتروفتومتری محلولهای سولفات کادمیوم (غلظت یون کادمیوم ۱ میلی مولار، pH برابر ۷)، عاری از سوپرناتانت (قسمت ب) و به دنبال اضافه کردن سوپرناتانت کشت سویه Cd11 (قسمت الف)، پس از ۸ ساعت واکنش زیست تبدیلی در ۲۵ درجه سانتی گراد روی شیکر مدور (۱۵۰ دور در دقیقه).

در ادامه و با هدف اطمینان از تشکیل نانوسولفید کادمیوم در واکنش زیست تبدیلی توسط سوپرناتانت کشت سویه باکتری Cd11، آنالیز نمونه ها به کمک طیف سنجی فلورسانس انجام شد. آنالیز نمونه‌ها با طیف سنجی فلورسانس، یک پیک نشری مشخص را در طول موج نانومتر ۴۴۵ نانومتر را نشان داد که بیانگر وجود نانو سولفید کادمیوم در مخلوط واکنش زیست تبدیلی است (شکل ۳). براساس منابع معتبر بیشینه پیک نشری نانوذرات سولفید کادمیوم در طول موجهای ۴۴۰ تا ۴۷۰ نانومتر می باشد (۳۰). در محلول کنترل (عاری از سوپرناتانت کشت باکتری)، در طول موجهای بین ۲۵۰ تا ۵۵۰ نانومتر هیچ پیک نشری مشاهده نشد.



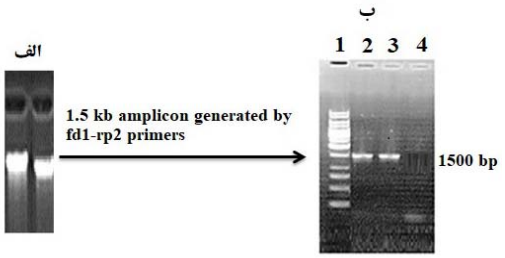
شکل ۳- طیفهای نشری فلورسانس محلولهای سولفات کادمیوم (غلظت یون کادمیوم ۱ میلی مولار، pH برابر ۷)، عاری از سوپرناتانت (کنترل) و به دنبال اضافه کردن سوپرناتانت کشت سویه Cd11 (نمونه)، پس از ۸ ساعت واکنش زیست تبدیلی در ۲۵ درجه سانتی گراد روی شیکر مدور (۱۵۰ دور در دقیقه).

شناسایی فنوتیپی و مولکولی سویه منتخب Cd11: سویه باکتری Cd11 که براساس آنالیزهای ظاهری و مشاهدات دستگاهی با استفاده از آنالیزهای اسپکتروفتومتری و فلورسانس قابلیت احیای زیستی سولفات کادمیوم به کوانتوم دات سولفید کادمیوم را دارا بود، انتخاب و براساس ویژگیهای ریخت شناسی و بیوشیمیایی تشخیصی متداول باکتریها مورد شناسایی قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- ویژگیهای فنوتیپی و بیوشیمیایی سویه منتخب Cd11

ویژگی	سویه CD11	ویژگی	سویهCD11
شکل ظاهری	میله ای شکل	تولید اسید از گلوکز	منفی
واکنش گرم	منفی	تولید اسید از فروکتوز	منفی
تست اکسیداز	مثبت	تولید اسید از آرابینوز	منفی
تست کاتالاز	مثبت	تولید اسید از مانیتول	منفی
احیای نیترات	مثبت	تولید اسید از سوکروز	منفی
مصرف سیترات	مثبت	تولید اسید از اتانول	مثبت
هیدرولیز اوره	منفی	تولید اسید از گلیسرول	مثبت
هیدرولیز ژلاتین	منفی	تولید اسید از مالتوز	منفی
هیدرولیز کازئین	منفی	تولید اسید از زایلوز	منفی
هیدرولیز توبین ۸۰	منفی	رشد در ۳۷ درجه سانتی گراد	مثبت
هیدرولیز تیروزین	مثبت	رشد در ۴۲ درجه سانتی گراد	مثبت

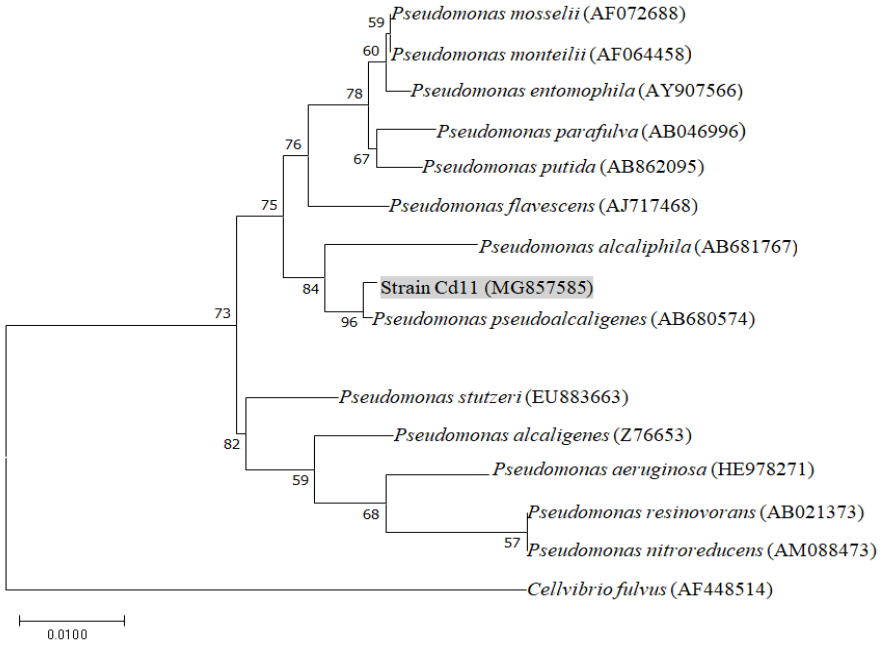
براساس خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی و بر طبق کتابهای مرجع، سویه Cd11 به طور موقت به عنوان *Pseudomonas pseudoalcaligenes* تشخیص داده شد. جهت شناسایی دقیق سویه Cd11، ابتدا DNA ژنومی استخراج (شکل ۴ قسمت الف) و سپس ژن کد کننده نواحی 16S rDNAاز طریق پرایمرهای یونیورسال fd1 و rp2 مورد واکنش PCR قرار گرفت (شکل ۴ قسمت ب). همان گونه که در شکل قابل مشاهده می باشد محصول PCR مناسب در ناحیه ۱۵۰۰ pb نمایان شده که بیانگر خلوص DNA مورد استفاده جهت تعیین توالی می باشد.



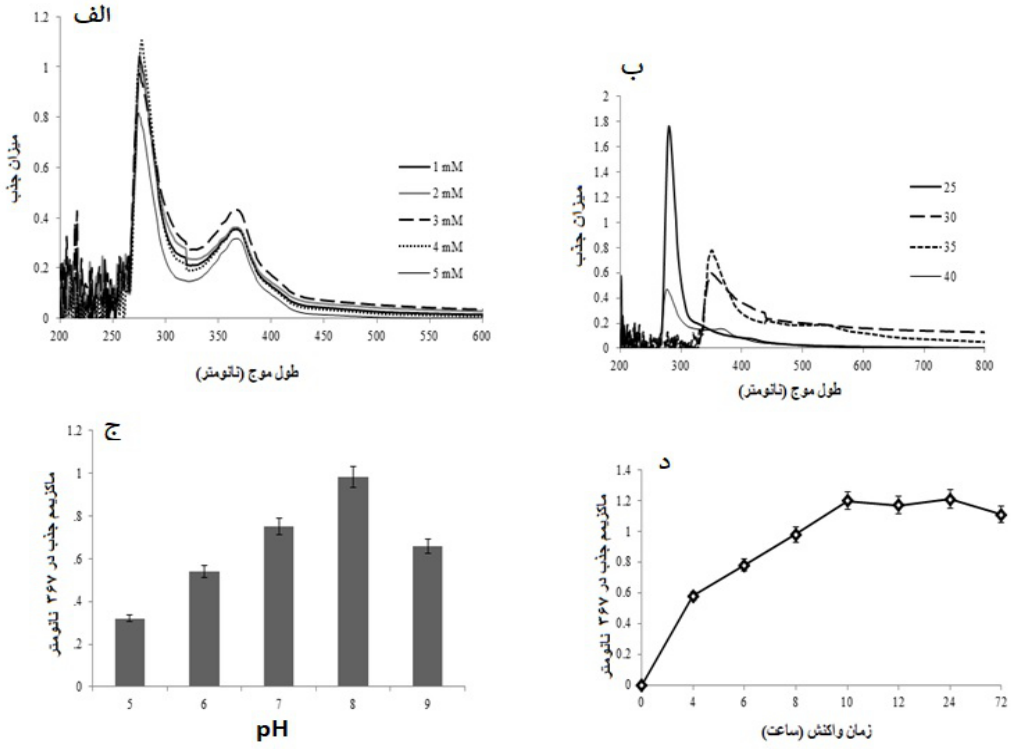
شکل ۴- (الف) تصویر DNA ژنومی استخراج شده (ب) ژل الکتروفورز محصول PCR سویه منخب Cd11: ستون ۱ مارکر یک کیلوبازی فرمنتاز، ستونهای ۲ و ۳: سویه باکتری Cd11 و ستون ۴: کنترل منفی (فاقد DNAی الگو)

پس از مشخص شدن توالی ژن 16S rDNA سویه مذکور و بلاست نمودن آن در سایت اینترنتی NCBI، باکتری مورد نظر شناسایی شد. براساس نتایج حاصل از بلاست این سویه دارای مشابهت بیش از ۹۸ درصدی با سویه‌های متعلق به گونه باگتری *P. pseudoalcaligenes* می باشد. بعد از تعیین توالی ژن ۱۶S rDNA، این ژن در بانک اطلاعات ژنی با شماره دسترسی MG857585 ثبت شد. تجزیه و تحلیلهای فیلوژنیکی نیز تأیید کرد که سویه مورد نظر به جنس *Pseudomonas* تعلق دارد و علاوه بر این احتمالاً می تواند به عنوان سویه جدید متعلق به گونه باکتری *P. pseudoalcaligenes* طبقه بندی شود. در درخت فیلوژنی (شکل ۵) که بر اساس آنالیزهای توالی ژن ۱۶S rDNA به روش neighbor-joining به دست آمده است، موقعیت سویه Cd11 در میان گونه های متعلق به جنس *Pseudomonas* نشان داده شده است.

اثر فاکتورهای مختلف بر روی تولید نانوسولفید کادمیوم در واکنش کاتالیست شده توسط سوپرناتانت کشت باکتری*P. pseudoalcaligenes* Cd11: همان گونه که در شکل (۶ قسمتهای الف تا د) نشان داده شده است، بیشترین تولید نانوسولفید کادمیوم در غلظت بهینه ۳ میلی مولار از یون کادمیوم، دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، pH برابر ۸ و پس از ۱۰ ساعت گرماگذاری مشاهده شده است.



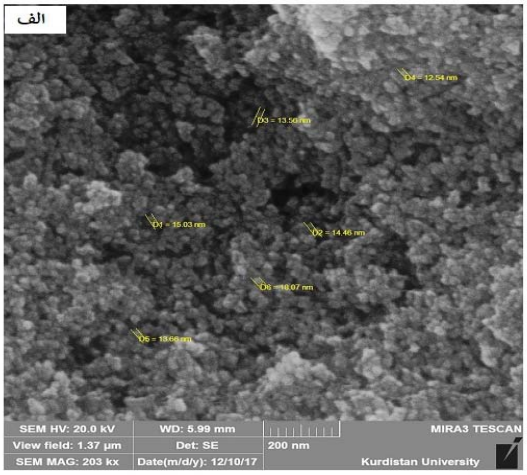
شکل ۵- درخت فیلوژنی سویه Cd11 و دیگر اعضای جنس *Pseudomonas* بر اساس ژن تکثیریافته ۱۶S rDNA. شماره دسترسی سویه های ثبت شده در پرانتز آورده شده است.

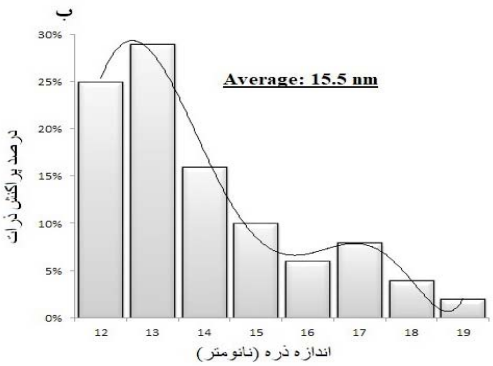


شکل ۶- اثر پارامترهای مختلف بر روی سنتز خارج سلولی نانو سولفید کادمیوم در مخلوط واکنش زیست تبدیلی حاوی سوپرناتانت کشت باکتری *P. pseudoalcaligenes* Cd11. الف- تأثیر غلظتهای مختلف یون کادمیوم بعد از ۸ ساعت گرماگذاری، تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد، pH برابر ۷ و دور شیکر ۱۵۰ rpm ب- اثر دماهای مختلف بر روی سنتز نانوذرات بعد از ۸ ساعت گرماگذاری در غلظت بهینه ۳ میلی‌مولار یون

کادمیوم، دور شیکر ۱۵۰ rpm و تحت شرایط pH برابر ۷ ج- تأثیر pH مختلف بر روی سنتز نانوذرات سولفید کادمیوم در غلظت بهینه ۳ میلی مولار یون کادمیوم تحت شرایط دمای بهینه ۳۵ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۱۵۰ rpm و د- اثر دوره گرماگذاری بر روی سنتز خارج سلولی نانو سولفید کادمیوم تحت شرایط بهینه شده توسط روش تک عاملی

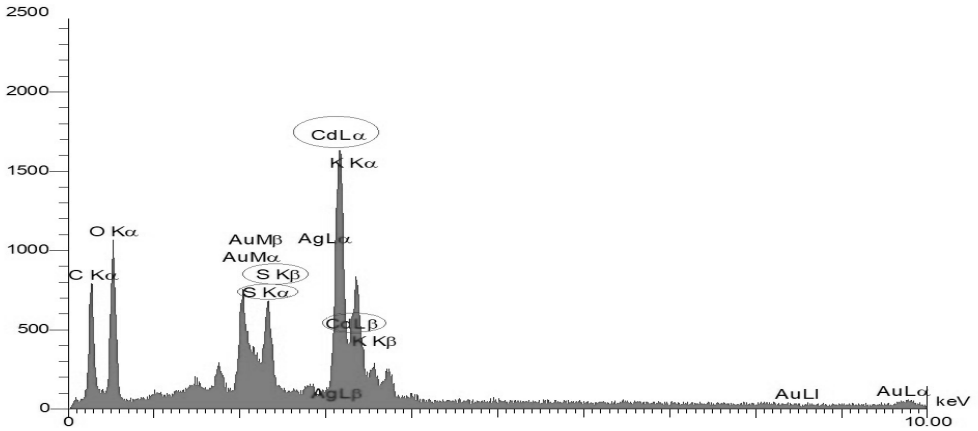
بررسیهای میکروسکوپی و طیف سنجی نانوذرات تولید شده توسط *P. pseudoalcaligenes* Cd11 به دنبال تشخیص اولیه سنتز نانوسولفید کادمیوم توسط باکتری *P. pseudoalcaligenes* Cd11، جهت بررسی ساختار، موفولوژی و پایداری نانوذرات تشکیل شده در محلول واکنش زیست تبدیلی از آزمونهای متفاوت از جمله هیستوگرام توزیع اندازه ذرات و تصویربرداری SEM، طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس و طیف‌سنجی مادون قرمز فوریه استفاده شد. برای این منظور، در ابتدا، مطالعات میکروسکوپ الکترونی روبشی و آنالیز توزیع ذرات با هدف بررسی شکل و پراکنش اندازه نانوسولفید کادمیوم سنتز شده به صورت برون سلولی توسط سوپرنانانت کشت باکتری *P. pseudoalcaligenes* Cd11 تعیین گردید. در شکل (۷) تصاویر تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی SEM و دامنه پراکنش اندازه نانوذرات مذکور نشان داده شده است. همان گونه که در شکل (۷) نشان داده شده است، تصاویر حاصل، سنتز نانوسولفید کادمیوم با پراکنش باریک اندازه ذرات (۱۹-۱۲ نانومتر) و متوسط اندازه ذرات ۱۵/۵ نانومتر را نشان داد.





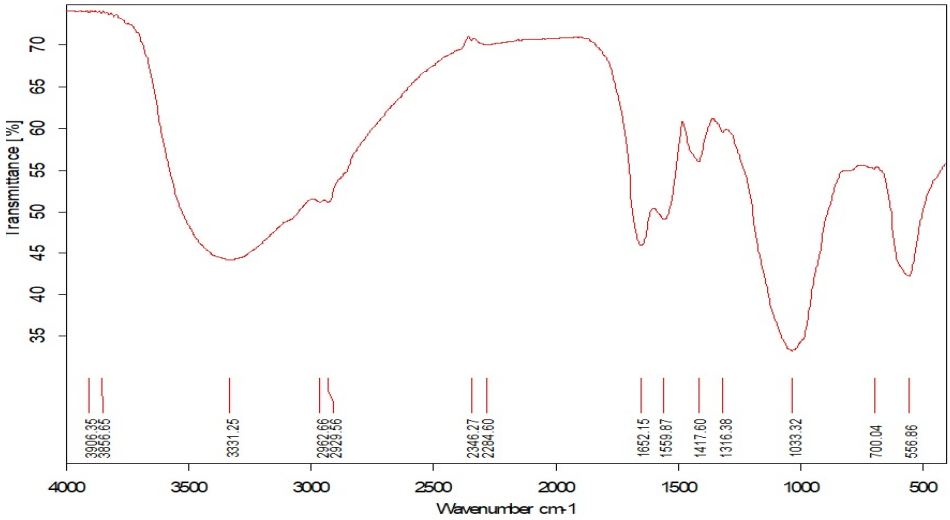
شکل ۷- (الف) تصویر SEM حاصل از نانوسولفید کادمیوم سنتز شده توسط سوپرناتانت کشتی *P. pseudoalcaligenes* Cd11 و (ب) هیستوگرام مربوط به دامنه پراکنش اندازه نانوسولفید کادمیوم سنتز شده.

در ادامه و با هدف تجزیه و تحلیل ساختاری و مشخص نمودن ترکیب عنصری نمونه نانوذره زیستی سنتز شده، از طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس استفاده شد. در شکل (۸) هریک از پیکهای نشان داده شده مختص یک اتم و نشانگر یک عنصر می باشند. آنالیز EDX وجود عناصر Cd و S را در ترکیب نانوذرات تشکیل شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی را تأیید می کند.



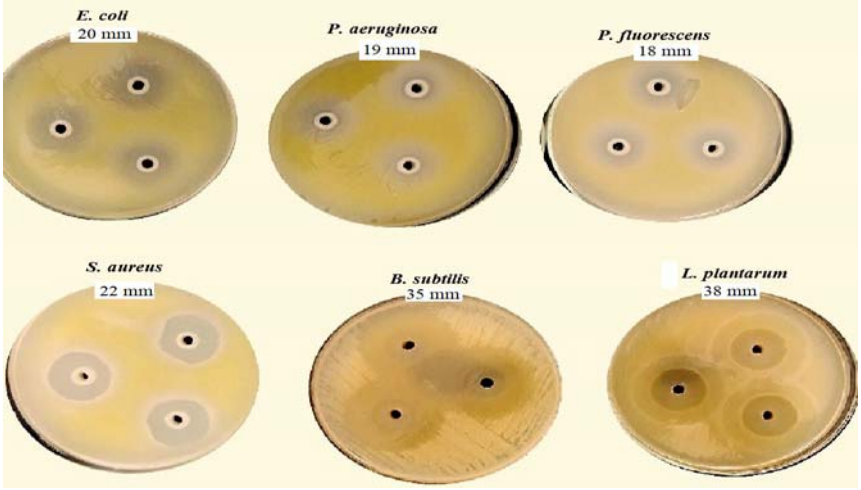
شکل ۸- طیف EDX از نانوذرات سولفید کادمیوم سنتز شده توسط سوپرناتانت کشتی *P. pseudoalcaligenes* Cd11

در نهایت و با هدف بررسی وجود احتمالی عوامل پوشاننده (Capping Agents) زیستی در نانوذرات سنتز شده، آنالیز FTIR انجام شد (شکل ۹). با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز FTIR می توان گفت که پیک پهن ظاهر شده در محدوده عدد موجی ۳۰۰۰ تا ۳۵۰۰ مربوط به گروه OH موجود در حلال آب و یا گروه کربوکسیلیک اسید می‌باشد. از طرفی چون پیک مربوطه پهن می‌باشد می‌توان گفت که گروه OH پیوند هیدروژنی برقرار نموده است. این پیوند می‌تواند مربوط به خود حلال آب یا مربوط به پیوند OH با ترکیبات آمینی موجود در ساختار پروتئین پوشش دهنده باکتری باشد. دو پیک ظاهر شده در محدوده ۲۹۲۹ تا ۲۹۶۲ مربوط به گروه C-H کششی موجود در ترکیبات آلی می‌باشد. پیک ظاهر شده در عدد موجی ۱۶۵۲ مربوط به C=O کششی در ترکیبات آلی است. پیک ظاهر شده در عدد موجی ۱۰۳۳ مربوط به پیوند C-N موجود در پروتئینها می‌باشد و در نهایت پیک ظاهر شده در عدد موجی ۵۵۶/۸۶ مربوط به تشکیل پیوند فلزی می‌باشد که این می‌تواند نشان بدهد پیوند Cd-S در این محدوده تشکیل گردیده و نشان از سنتز نانوذرات زیستی سولفید کادمیوم توسط باکتری است (شکل ۹).



شکل ۹- طیف FTIR از نانوذرات سولفید کادمیوم سنتز شده توسط سوپرناتانت کشتی *P. pseudoalcaligenes* Cd11

نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سولفید کادمیوم تشکیل شده توسط سوپرناتانت کشت باکتری *P. pseudoalcaligenes* Cd11 به روش انتشار از چاهک بر آگار: نتایج بررسی فعالیت ضد میکروبی نشان‌دهنده اثر مهاری نانوذرات سولفید کادمیوم تولید شده می‌باشد. طی این روش، بیشترین اثر مهاری نانوذره برعلیه باکتری *L. plantarum* با مهار ۳۸ میلی‌متر از خود نشان داد و کمترین میزان مهارکنندگی را با مهار ۱۸ میلی‌متری برعلیه باکتری *P. fluorescens* نشان داد. اثر مهاری بر سایر باکتریهای مورد مطالعه نیز با میانگین مهاری ۱۹ تا ۳۵ میلی‌متری نشان داده شد (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- اثر مهاری نانوذرات سولفید کادمیوم تشکیل شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی برعلیه برخی گونه های باکتری.

بحث

با توجه به مشکلات عمده‌ای که در روشهای فیزیکی و شیمیایی برای سنتز نانوذرات فلزی وجود دارد، استفاده از میکرواورگانیسم های محتلف به‌عنوان نانوکارخانه های بالقوه سبز برای سنتز نانوذرات فلزی همسو و سازگار با محیط زیست، پایدار و همچنین مقرون به صرفه بودن از نظر اقتصادی پیشنهاد شده است. نانوذرات فلزی شامل نانوذرات عنصری، نانواکسیدهای فلزی و سولفیدهای فلزی (به ویژه کوانتوم دات سولفید کادمیوم) دارای خواص الکتریکی منحصر به فردی هستند که با توجه به این خواص در بسیاری از زمینه‌های تحقیقاتی کاربرد دارند. در حال حاضر این نانو ذرات به عنوان بهترین حامل برای تحویل دارو و بیوسنسور ظاهر شده‌اند. کار کردن روی سطح این نانو ذرات به راحتی انجام می‌پذیرد و می‌توان لیگاندهای مختلف مانند قندها، پپتیدها، پروتئین و DNA به آنها متصل شوند. از کار بردهای این نانو ذرات می‌توان به: تحویل فعال دارو، آزمایشهای تشخیص زیستی و تصویر برداری اشاره کرد (۱۷ و ۲۹). در این پژوهش، جداسازی و تعیین هویت سویه‌های باکتری آبزی با توانمندی سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم مورد مطالعه قرار گرفت. میکروارگانیسم‌های دریازی شامل باکتری، مخمر، قارچ، سیانوباکتر و اکتینوباکتر می‌باشد که در اقیانوسها زندگی می‌کنند و ۹۸ درصد از زیست توده اقیانوسها را تشکیل می‌دهند. این میکروارگانیسم‌ها در دریا که محیطی پر تنش است در طیف وسیعی از شرایط اسیدی، قلیایی، حرارت بالا، مواد مغذی کم، محتوای فلزی بالا و شوری بیش از حد حضور دارند. شرایط در دریاها پویاست و میکرارگانیسم‌هایی که در آن حضور دارند دارای مکانیسمهای منحصر به فرد برای انطباق سریع با این تغییرات هستند (۵). عواملی مانند انتشار فاضلابهای صنعتی، حمل ونقلهای دریایی، آتشفشانها، فرسایش سنگها

و نشت نفت باعث افزایش اثرات مواد تشکیل دهنده آلی و غیره آلی در محیط دریا می‌شوند. میکرارگانیسم‌هایی که در چنین محیطهای خشنی زندگی می‌کنند اغلب انواع مولکولهای زیستی را برای مقابله با آلودگیهای مختلف از جمله گونه‌های فلزی سنتز می‌کنند. اکثر میکروارگانیسم‌ها که در حضور فلزات زندگی می‌کنند از طریق مکانیسمهایی مانند جذب زیستی، رسوب زیستی و ترشح خارج سلولی خود را با شرایط سازگار کرده‌اند. نتیجه این فرآیندها ممکن است منجر به سنتز نانوذرات به شکل داخل سلولی یا خارج سلولی شود. در حال حاضر روشهای میکروبی برای سنتز نانومواد با ترکیبات مختلف بسیار محدود بوده و بیشتر مربوط به سنتز نانو ذرات فلزی و تا حدودی سولفیدهای فلزی و تعداد بسیار کم از اکسید فلزها می-باشد. مطالعه میکروبهای دریازی برای بیوسنتز نانو ذرات و کشف مسیرهای بیوشیمیایی که منجر به کاهش یونهای فلزی می گردد بسیار حائز اهمیت است (۱۳). براساس یافته‌های به‌دست آمده در این پژوهش، سوپرناتانت *P. pseudoalcaligenes* سویه Cd11 قادر به سنتز زیستی نانوذرات سولفید کادمیوم به‌صورت برون سلولی بود. مزیت تولید برون سلولی نانوذره سولفید کادمیوم توسط سویه باکتری جدا شده در تحقیق حاضر در این است که تولید درون سلولی نانوذره مذکور پرهزینه بوده و نیاز به مراحل اضافی جهت استخراج نانوذرات از درون سلول دارد؛ بنابراین به‌وسیله باکتری مذکور می‌توان به تولید برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم، بدون نیاز به مراحل پیچیده استخراج دست یافت. سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم تولید شده توسط باکتری *P. pseudoalcaligenes* Cd11 تحت شرایط بهینه واکنش زیست تبدیلی مورد بررسی قرار گرفت که بر اساس نتایج به‌دست آمده، سوپرناتانت سویه مذکور بعد از مواجهه با محلول سولفات کادمیوم (غلظت بهینه ۳ میلی‌مولار از یون کادمیوم)، قادر به سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم کروی در محدوه پراکنش ذرات بین ۱۲ تا ۱۹ نانومتر با میانگین اندازه ۱۵/۵ نانومتر در pH بهینه برابر ۸ و دمای بهینه ۳۵ درجه سانتی‌گراد پس از ۱۰ ساعت گرماگذاری در دور شیکر g ۱۵۰ بوده است. در این پژوهش همچنین فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سولفید کادمیوم تشکیل‌شده توسط سوپرناتانت کشت باکتری *P. pseudoalcaligenes* سویه Cd11، علیه برخی باکتریهای گرم مثبت، گرم منفی بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوذرات زیستی تولیدشده علیه همه میکروبهای تست‌شده اثر مهارکنندگی رشد را دارد. با این حال، حساسیت باکتریهای گرم مثبت تست شده در مقایسه با باکتریهای گرم منفی تست شده بیشتر بود. سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم در طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها گزارش شده است. احمد (Ahmad) و همکاران (۲) با استفاده از سوپرناتانت کشت قارچ *Fusarium oxysporum*، سنتز نانوذرات سولفید کادمیوم از محلول نمکی سولفات کادمیوم را در محدوده بین ۵ تا ۲۰ نانومتر را گزارش دادند. سانگی (Sanghi) و همکاران (۲۸) با استفاده از سوپرناتانت قارچ *Coriolus versicolor* سنتز خارج سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم از محلولهای نمکی نیترات کادمیوم و سولفید سدیم (به‌عنوان پیش ساز) را در محدوده ذرات بین ۸ تا ۱۵ نانومتر را گزارش کردند. بای (Bai) و همکاران (۴) با استفاده از سوپرناتانت کشت باکتری *Rhodopseudomonas palustris*، سنتز نانوذرات سولفید کادمیوم از محلول نمکی سولفات کادمیوم را در محدوده بین ۶ تا ۱۱ نانومتر را گزارش دادند. پرساد (Prasad) و همکاران (۲۵) با استفاده از مخمر *Sachharomyces cerevisiae* موفق به دست یابی به نانوذرات خارج سلولی سولفید کادمیوم با پراکنش ذرات بین ۲/۵ تا ۵/۵ نانومتر از محلولهای پیش ساز کلرید کادمیوم و سولفید هیدروژن شدند. شانسوری (Shanshoury) و همکاران (۳۰) با استفاده از سویه باکتری استاندارد *Bacillus subtilis* ATCC6633 موفق به سنتر خارج سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم از پیش سازهای

کلرید کادمیوم و سولفید سدیم با محدوده پراکنش ۲/۵ تا ۵/۵ نانومتر شدند. در مطالعه مشابه صورت گرفته، حسینی (Hosseini) و همکاران (۱۴) با استفاده از سویه باکتری استاندارد*Bacillus licheniformis* MTCC 9555 موفق به سنتز برون سلولی نانوسولفید کادمیوم از پیش سازهای کلرید کادمیوم و سولفید سدیم با محدوده پراکنش ۴/۶ تا ۵/۶ نانومتر شدند. مالارکودی (Malarkodi) و همکاران (۲۰) با استفاده از سویه باکتری *Klebsiella pneumonia* MAA موفق به دست یابی به نانوذرات خارج سلولی سولفید کادمیوم با پراکنش ذرات بین۱۰ تا ۲۵ نانومتر از محلولهای سولفات کادمیوم شدند. براساس نتایج حاصل از این پژوهش و در مقایسه با پژوهشهای مشابه صورت گرفته می توان گفت که نانوذرات سولفید کادمیوم سنتز شده از پیش ساز نمکی ارزان قیمت سولفات کادمیوم در مطالعه اخیر دارای دامنه پراکنش اندازه ذرات مناسب و همگن بوده که همین امر کارآیی نانوذرات زیستی سنتز شده را برای فعالیتهای آزمایشگاهی و پژوهشی مناسب می کند.

نتیجه گیری

جداسازی و شناسایی سویه‌های جدید میکروبی با امکان تولید برون سلولی کوانتوم دات سولفید کادمیوم می تواند منجر به توسعه کاتالیزگرهای میکروبی کارآمد در صنایع فناوری نانو گردد. این پژوهش بر جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتری آبزی با قابلیت تحمل پذیری بالا به یون سمی کادمیوم و امکان بهره برداری از ترشحات باکتری به-عنوان کاتالیزگر برای سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم متمرکز شده است. در این مطالعه برای نخستین بار سنتز برون سلولی کوانتوم دات سولفید کادمیوم در دامنه پراکنش محدود و همگن در سویه باکتری آبزی *P. pseudoalcaligenese* Cd11 گزارش شده است. بنابراین نتایج این پژوهش می تواند در راستای معرفی سویه‌های میکروبی جدید به مراکز علمی پژوهشی، مراکز دانشگاهی و نانوزیست فناوری به منظور انجام تحقیقات بیشتر با هدف بهره برداری تجاری از نانوذرات سنتز شده، مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

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

منابع

۱- آشنگرف م. ۱۳۹۳. معرفی سویه جدید مخمری *Candida* sp. strain MY2با توان بالقوۀ سنتز سریع و برون سلولی نانوکریستالهای اکسید روی. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (زیست شناسی ایران)، جلد ۲۷، شماره ۲، صفحات ۱۵۵-۱۶۶.

2- Ahmad, A. Mukherjee, P. Mandal, D. Senapati, S. Khan, M.I. Kumar, R. and Sastry, M. (2002) Enzyme mediated extracellular synthesis of CdS nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*. J Am Chem Soc 124:12108–12109.

3- Ajayan, P.M. Schadler, L.S. and Braun, P.V. (2003) Nanocomposite Science and Technology (Wiley VCH, Weinheim).

4- Bai, H. Zhang, Z. Guo, Y. and Yang, G. (2009) Biosynthesis of cadmium sulfide nanoparticles by photosynthetic bacteria *Rhodopseudomonas palustris*. Colloids Surf B 70: 142-146.

5- Baker, S. Harini, B.P. Rakshith, D. and Satish, S. (2013) Marine microbes: invisible nanofactories. J Pharm Res 6: 383–388.

6- Balouiri, M. Sadiki, M. and Ibnsouda, S.K. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. J Pharm Anal 6 (2): 71-79.

7- Bhatia, S. (2016) Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. In: Natural polymer drug delivery systems. Springer, pp 33–93.

8- Cunningham, D.P. and Lundie, L. (1993) Precipitation of cadmium by *Clostridium*

thermoaceticum. Appl Environ Microbiol 59: 7-14.

9. Dameron, C. Reese, R. Mehra, R. Kortan, A. Carroll, P. Steigerwald, M. Brus, L. and Winge, D. (1989) Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites. Nature 338: 596–597.

10- Hulkoti, N.I. and Taranath, T. (2014) Biosynthesis of nanoparticles using microbes—a review. Colloids Surf B: Biointerfaces 121: 474-483.

11- Holmes, J.D. Richardson, D.J. Saed, S.R. Evans-Gowing, D.A. and Russell, J.R. (1993) Cadmium-specific formation of metal sulfide 'Q-particles' by *Klebsiella pneumoniae*, Microbiology 14: 2521-2530.

12- Holt, J.G. Krieg, N.R. Sneath, P.H.A. Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins.

13- Haferburg, G. and Kothe, E. (2007) Microbes and metals: interactions in the environment. J Basic Microbiol 47(6):453-67.

14- Hosseini, M.R. and Sarvi, M.N. (2015) Recent achievements in the microbial synthesis of semiconductor metal sulfide nanoparticles. Mater Sci Semicond Process 40: 293-301.

15- Kowshik, M. Deshmukh, N. Vogel, W. Urban, J. Kulkarni, S.K. and Paknikar, K.M. (2002) Microbial synthesis of semiconductor CdS nanoparticles, their characterization, and their use in the fabrication of an ideal diode. Biotechnol Bioeng 78:583–588.

16- Li, X. Xu, H. Chen, Z.S. and Chen, G. (2011) Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. J Nanomater 2011: 270974.

17- Mehdinia, A. Kazemi, S.H. Bathaie, S.Z. Alizadeh, A. Shamsipur, M. and Mousavi, M.F. (2009) Electrochemical DNA nano-biosensor for the study of spermidine–DNA interaction. J Pharm Biomed Anal 49: 587-593.

18- Mo, X. Wang, C. Hao, L. You, M. Zhu, Y. Chen, Z. and Hu, Y. (2001) Convenient microemulsion route to star-shaped cadmium sulphide pattern at room temperature. Mater Res Bull 36(11): 1925–1930.

19- Mubarak, A.D, Gopinath, V. Rameshbabu, N. and Thajuddin, N. (2012) Synthesis and characterization of CdS nanoparticles using C-phycoerythrin from the marine cyanobacteria. Mater Lett 74: 8-11.

20- Malarkodi, C. Rajeshkumar, K. Paulkumar, M. Vanaja, G. and Annadurai. G (2014) Biosynthesis and antimicrobial activity of semiconductor nanoparticles against oral pathogens, Bioinorg Chemistry Appl (2014): 1-10.

21- Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C and Helmuth, R. (2003) Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. Appl Environ Microbiol 69, 290-296.

22- Narayanan, K.B. Sakthivel, N. (2010) Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. Adv Colloid Interface Sci 156: 1–13.

23- Pawar, V. Shinde, A. Kumar, A.R. Zinjarde, S. and Gosavi, S. (2012) Tropical marine microbe mediated synthesis of cadmium nanostructures Sci AdvMater 4: 135-142.

24- Pena, J. Martinez, A. Conde, F. Gonzalez-Callet, J.M. and Vallet-Regi, M. (1997) In situ growth of SrTiO3 thin films prepared by AACVD from strontium and titanium oxide bisdipivaloylmethanates, Solid State Ionics 101–103 (1997) 183.

25- Prasad, K. Jha, A.K. (2010) Biosynthesis of CdS nanoparticles: an improved green and rapid procedure. J Colloid Interface Sci 342: 68-72.

26- Raj, V. Dalei, K. Chakraborty, J. and Das, S. (2016) Extracellular polymeric substances of a marine bacterium mediated synthesis of CdS nanoparticles for removal of cadmium from aqueous solution. J Colloid Interface Sci 462: 166-175.

27- Rai, M. Gade, A. Yadav, A. (2011) Biogenic nanoparticles: an introduction to what they are, how they are synthesized and their applications, Metal nanoparticles in microbiology, Springer, pp. 1-10.

28- Sanghi R, Verma, P. (2009) A facile green extracellular biosynthesis of CdS nanoparticles by immobilized fungus. Chem Eng J 155: 886-891.

29- Slowing, I.I. Vivero-Escoto, J.L. Wu, C.W. and Lin, V.S.Y. (2008) Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. Adv drug deliv rev 60: 1278-1288.

30- Shanshoury, A.E.R.R. Elsilk. S.E. Ebeid M.E. (2012) Rapid biosynthesis of cadmium sulfide (CdS) nanoparticles using culture supernatants of *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Lactobacillus acidophilus* DSMZ 20079T. Afr J Biotechnol 11: 7957-7965.

31- Steen, W.M. and Mazumder, J. (2010) Laser Material Processing (4th edition). Great Britain. Springer-Verlag. ISBN 978-1-84996-062-5.

32- Sweeney, R.Y.C. Mao, X. Gao, J.L. and Burt, A.M. (2004) Belcher, G. Georgiou, B.L. Iverson, Bacterial biosynthesis of cadmium sulfide nanocrystals. Chem Biol 11: 1553-1559.

33- Tamura, K. Stecher, G. Peterson, D. Filipski, A. Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 30: 2725–2729

34- Weisburg, W.G. Barns, S.M. Pelletier, D.A. and Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol. 173: 697–703.

35- Xie Q., Wang Y., Pan B., Wang H., Su W., Wang X., A novel photocatalyst LaOF: Facile fabrication and photocatalytic hydrogen production, Catal. Commun 27 (2012) 21-25.

Rapid Extracellular Synthesis of Cadmium Sulfide Nanoparticles by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* Cd11 and Study of its Antibacterial Activity

Ashengroph M. and Khaledi A.

Biological Sciences Dept., Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. of Iran

Abstract

Cadmium sulfide nanoparticles (CdS NPs) have many commercial applications in making dye-sensitized solar cells, light emitting diodes (LED) and nanobiosensors due to their unique properties. In this work, screening of aquatic bacterial strains for their ability in the green extracellular synthesis of CdS NPs was studied. The prepared nanoparticles were examined using Optical emission and absorption spectroscopy analyses, Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS) Scanning electron micrograph analysis and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). 32 cadmium-resistant aquatic strains were isolated by using enrichment. Among isolated strains, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* is capable to synthesize CdS NPs. The extracellular nanoparticles produced by the strain Cd11 were investigated under optimal culture conditions. The results showed that culture supernatant of strain Cd11 treated with CdSO4 (3 mM) was able to catalyze the extracellular synthesis of CdS NPs in the range of 12-19 nm with an average size of 15.5 nm after 10 h of incubation at pH 8.0 and temperature 35 °C. To evaluate the antibacterial activity of nanoparticles, agar well diffusion method was tested. Based on obtained results, CdS nanoparticles had an inhibitory effect against all tested microorganisms. Additionally, particles size distribution of CdS nanoparticles synthesized by culture supernatant of strain Cd11 had a good monodispersity and homogeneity for the specific applications.

Key words: CdS nanoparticles, Extracellular synthesis, Resistance pattern, Antibacterial activity, *P. pseudoalcaligenes* strain Cd11