

سویه جدید باکتری *Staphylococcus pasteuri* sp. Ta-31 به عنوان راکتور زیستی برای تولید نانوذرات مس

حدیث کردزنگنه^۱، فرشته جوکار کاشی^{۲*}

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران
۲- استادیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

* صندوق پستی ۸۷۳۱۷۵۳۱۵۳، کاشان، ایران

jookar@kashanu.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۳۰

دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۶

چکیده

هدف از این مطالعه جدا سازی و شناسایی باکتری‌ها از خاک های آلوده به مس و انتخاب باکتری توانا در تولید نانوذرات مس بود. در پژوهش حاضر نانوذرات مس از سویه باکتریایی Ta-31 به صورت خارج سلولی سنتز شد. اثر عوامل مختلف شامل غلظت پیش ماده (سولفات مس)، حجم مایع رویی کشت، القاکننده آنزیم و الکترون دهنده در تولید نانوذرات مس بهینه سازی شد. خواص نانوذرات سنتز شده با استفاده از آنالیزهای طیف سنجی جذبی فرابنفش-مرئی (UV-Vis)، طیف سنجی فرو سرخ تبدیل فوریه (FTIR)، الگوی پراش اشعه ایکس (XRD)، طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS) و تصویربرداری الکترونی روبشی (SEM) بررسی شدند. همچنین منحنی رشد سویه Ta-31 در حضور و عدم حضور القاکننده آنزیم (غلظت ۰/۱ میلی مولار از سولفات مس) رسم شد. سویه منتخب برای سنتز نانوذرات مس شناسایی و ویژگی‌های فنوتیپی آنها بررسی شد و با توجه به تبارزایی، ترادف ژن 16S rDNA تعیین و درخت تبارزایی سویه منتخب رسم شد. نتایج نشان داد شرایط بهینه برای سنتز نانوذرات مس، حضور ۱ درصد گلوکز به عنوان عامل الکترون دهنده، غلظت ۲ میلی مولار سولفات مس به عنوان پیش ماده، مقدار ۲۰ میلی لیتر محلول رویی کشت بودند. در این شرایط بیشترین میزان نانوذرات مس تولید شد. طبق نتایج منحنی رشد، سویه Ta-31 پس از ۱۵ ساعت به انتهای فاز فعال تکثیر و شروع فاز سکون رسید. نانو ساختارهای مس تولید شده کروی و نامنظم بودند و توزیع اندازه آنها بیشتر در محدوده ۳۰-۴۰ نانومتر بود. نتایج نشان داد که سویه Ta-31 به گونه باکتریایی *Staphylococcus pasteuri* sp. با درصد شباهت ۹۹/۸۸ درصد تعلق دارد.

کلید واژگان: *Staphylococcus pasteuri*، راکتور زیستی، نانوذرات مس، سنتز سبز

۱- مقدمه

نانوذرات با استفاده از روش های مختلف مکانیکی، فیزیکی، شیمیایی و زیستی قابل سنتز هستند [۱]. امروزه تولید زیستی نانوذرات به دلیل غیر سمی بودن برای محیط زیست مورد توجه و اهمیت فراوانی قرار گرفته است. استفاده از روش های زیستی برای سنتز نانوذرات از لحاظ اقتصادی ارزان تر، از لحاظ انرژی به صرفه تر و همچنین باعث تولید نانوذرات فلزی غیر سمی می شوند. از دیگر فواید سنتز زیستی نانوذرات عدم استفاده از فشار بالا، انرژی، دما و مواد شیمیایی سمی است. از طرف دیگر نانوذرات زیستی را می توان به طور گسترده ای نه تنها در صنعت و کشاورزی استفاده کرد، بلکه در پزشکی به عنوان عوامل ضدباکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضدانگلی نیز استفاده کرد [۲]. باکتری ها فراوان ترین میکروارگانیسم ها بر روی زمین با تنوع گسترده در اندازه، شکل و روش های مختلف کسب انرژی هستند که در انواع زیستگاه ها زندگی می کنند. باکتری ها به طور وسیع برای سنتز نانوذرات فلزی بررسی شده اند و یکی از دلایل ترجیح استفاده از باکتری ها برای ساخت نانوذرات فلزی، سهولت نسبی کار با آنها است [۳]. مقاومت باکتری ها در برابر فلزات سنگین، با استفاده از پدیده انتشار از داخل به خارج سلول انجام می شود. این انتشار و سم زدایی با استفاده از پروتئین های غشایی انجام می شود. در نتیجه سیستم های میکروبی می توانند با احیا و رسوب دادن، یون های معدنی محلول سمی را به یون های غیر سمی و غیر محلول تبدیل کنند [۴]. با توجه به محل تجمع فرم احیا شده یون فلزی، ساخت نانوذرات به دو صورت درون سلولی (با استفاده از توده زیستی) و خارج سلولی (با استفاده از محلول رویی کشت) خواهد بود [۵].

در روش تولید داخل سلولی یون ها به سلول های میکروبی منتقل شده و در حضور آنزیم ها نانوذرات تشکیل می شوند. در مقایسه با اندازه نانوذرات تشکیل یافته خارج سلولی، نانوذرات تشکیل شده در داخل میکروارگانیسم کوچکتر هستند. نانوذراتی که به صورت داخل سلولی ساخته شده اند، برای استخراج به مراحل اضافی مانند تیمار با امواج فراصوت^۳ یا واکنش با شوینده های مناسب نیاز دارند، در نتیجه این روش از نظر میزان مصرف انرژی مقرون به صرفه نخواهد بود [۶] و سنتز خارج سلولی نانوذرات در مقایسه با سنتز داخل سلولی کاربرد بیشتری دارد [۷]. نانوذرات مس در برنامه های کاتالیزوری به طور مؤثر استفاده می شوند. در میان نانوذرات فلزات مختلف، مس و آلیاژ های مس از اهمیت زیادی برخوردار بوده اند که در کاربردهای کاتالیزگری، الکترونیک استفاده شده است. نانوذرات مس توجه زیادی به عنوان یک جایگزین مناسب برای کاتالیزگرهای گران بهای دیگری مانند نانوذرات طلا، نقره و پلاتین به ارمغان آورده است و می توانند یک راه حل اقتصادی تر باشند. با توجه به هزینه های نسبتاً کم آن، در دست بودن آسان و دارا بودن خواص مشابه به نانوذرات فلزی دیگر بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند. نانوذرات مس در اندازه های نانومتری می توانند به مواد دارویی در ابعاد نانومتری متصل شوند. سپس سلول های سرطانی آنها را به طور اختصاصی جذب می کنند. با این روش سلول های سالم در معرض مواد دارویی قرار نمی گیرند و عوارض جانبی دارو کمتر خواهد شد [۸-۱۲]. هدف از این پژوهش جداسازی سویه باکتریایی مقاوم به مس از خاک های آلوده به مس برای سنتز زیستی نانوذرات مس و بهینه سازی شرایط مختلف برای تولید نانوذرات مس می باشد.

4 Detergent

1 Intracellular

2 Extracellular

3 Ultrasound

سویه جدید باکتری ... ----- کرد زنگنه و همکاران

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲ جداسازی باکتری‌ها

از روش‌های کشت مستقیم و رقت سازی برای به دست آوردن باکتری‌های جدید استفاده شد. از محیط‌کشت نوترینت آگار در مرحله اولیه جداسازی باکتری‌ها استفاده شد. یک گرم از خاک مناطق آلوده به فلز مس به لوله حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد. سپس از مخلوط مذکور، یک میلی‌لیتر به لوله‌های بعدی حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی منتقل شد و این کار تا تهیه رقت مناسب برای هر نمونه خاک انجام شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از رقت‌های مناسب به محیط‌کشت نوترینت آگار اضافه شده و با میله شیشه‌ای استریل به صورت چمنی روی پلیت کشت داده شد و در گرمخانه با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. بعد از کشت نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت، باکتری‌های رشد یافته با مشخصات متفاوت ریخت‌شناختی، روی محیط نوترینت آگار به صورت متوالی کشت داده شدند. جداسازی باکتری‌ها بر اساس تفاوت‌های ریخت‌شناسی انجام شد. در ادامه برای تأیید خالص بودن کلنی‌ها، رنگ‌آمیزی گرم انجام شد.

۲-۲ انتخاب باکتری‌های توانا در تولید نانوذرات مس

برای جداسازی باکتری‌های مقاوم به مس، باکتری‌های خالص شده در محیط‌های نوترینت آگار حاوی غلظت‌های ۱ تا ۴ میلی‌مولار از مس سولفات کشت داده شد و برای ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. سپس از بین باکتری‌هایی که در این غلظت‌ها رشد داشتند، یک سویه باکتری Ta-31 به‌طور تصادفی برای تولید زیستی نانوذرات مس انتخاب شد.

۲-۳ تولید خارج سلولی نانوذرات مس

برای تولید خارج سلولی نانوذرات مس، محلول رویی کشت از سویه باکتریایی انتخابی به این ترتیب تهیه شد. کلونی‌های رشد کرده در محیط‌کشت نوترینت آگار به

ارلن مایر حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت TSB با pH=7 منتقل و به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. در نهایت، محلول رویی کشت با استفاده از سانتریفیوژ (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه) به‌دست آمد [۱۳].

در این آزمایش گلوکز ۱ درصد به ۲۰ میلی‌لیتر از محلول رویی کشت اضافه شد. سپس مس سولفات با غلظت ۱ میلی‌مولار به محلول مذکور اضافه شد. پس از تغییر رنگ محلول، به دلیل تشکیل نانوذرات مس در فواصل زمانی مختلف در یک روز ویژگی‌های نوری نانوذرات مس با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی ثبت شد.

۲-۴ جداسازی و خالص‌سازی نانوذرات تولید شده

برای جداسازی نانوذرات، محلول با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و برای خالص‌سازی نانوذرات، رسوب باقی مانده دو مرتبه با آب مقطر و یک مرتبه با اتانول شستشو و در دمای آن خشک شد [۱۴].

۲-۵ اثبات تولید نانوذرات مس به روش زیستی

تولید نانوذرات با روش ذکر شده در این پژوهش، یک رویکرد زیستی است. برای اثبات این منظور محلول رویی کشت باکتری‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد تا سلول‌ها، آنزیم‌ها و سایر مولکول‌های زیستی تخریب شوند. سپس تولید نانوذرات مطابق با روش ذکر شده، انجام شد و نتایج آن بررسی شد.

۲-۵ بهینه‌سازی شرایط مختلف برای تولید نانوذرات

آزمایش‌های گوناگونی برای به‌دست آوردن شرایط بهینه در تولید زیستی نانوذرات مس، برای سویه باکتریایی Ta-31 انجام شد.

۲-۶ تولید نانوذرات با محلول رویی کشت با حضور و

عدم حضور نور

(OD) بلافاصله پس از اضافه کردن یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری آغاز شد و میزان جذب تا ۲۴ ساعت پس از زمان صفر ثبت شد که این مدت زمان به میزان جذب یا رشد باکتری بستگی داشت. همه مراحل طیف سنجی در جذب نوری ۶۰۰ نانومتر صورت گرفته است. تمامی مراحل آزمایش در کنار شعله روشن انجام شد [۱۵].

۲-۹ اندازه‌گیری زمان دو برابر شدن باکتری بر اساس

CFU

در این آزمایش، برای اندازه‌گیری زمان دو برابر شدن سویه باکتریایی Ta-31، هنگامی که ارلن‌های حاوی محیط‌کشت برای اندازه‌گیری OD از گرمخانه دوار خارج شدند، سوسپانسیون باکتری با سرم فیزیولوژی استریل تا تهیه رقت مناسب انجام شد. ۱۰ میکرولیتر از هر کدام از رقت‌های انتخاب شده و در پلیت حاوی نوترینت آگار به صورت چمنی کشت داده شد و داخل گرمخانه با دمای ۳۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. پس از گذشت ۳ ساعت، برای بار دوم این مراحل تکرار شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت پلیت‌ها از گرمخانه خارج و تعداد کلنی‌ها (CFU) شمارش شد. آزمایش سه بار تکرار شد. برای به دست آوردن تعداد کلنی‌ها در هر میلی لیتر، میانگین تعداد کلنی‌های هر پلیت در عکس ضریب رقت ضرب شد [۱۶].

$$k = \frac{\log N_t - \log N_0}{t \log 2} \quad \text{معادله ۱-۱}$$

$$gt = \frac{1}{k} \quad \text{معادله ۲-۱}$$

N_0 : تعداد باکتری در لحظه $t=0$

N_t : تعداد باکتری پس از گذشت زمان t

gt : زمان دوبرابر شدن باکتری

۲-۱۰ روش‌های شناسایی نانوذرات مس

در این مطالعه نانوذرات مس به صورت خارج سلولی از سویه Ta-31 تولید شدند. برای شناسایی و یافتن

این آزمایش در دو ارلن جداگانه انجام شد و محلول‌های حاوی نانوذرات تولید شده در دو شرایط متفاوت در معرض نور و تاریکی به طور همزمان گذاشته شد.

۷-۲ تعیین زمان بهینه برای برداشت کشت باکتریایی

در این پژوهش برای به دست آوردن بهترین زمان برای برداشت محلول رویی کشت، منحنی رشد سویه Ta-31 در حضور و عدم حضور مس سولفات رسم شد. همچنین در این دو شرایط متفاوت، زمان دو برابر شدن (gt) سویه مورد نظر با اندازه‌گیری واحدهای تشکیل دهنده کلونی (CFU) به دست آمد. این آزمایش‌ها به علت وجود خطاهای احتمالی سه مرتبه تکرار شد.

۲-۸ رسم منحنی رشد در حضور و عدم حضور مس

سولفات

منحنی رشد سویه باکتریایی Ta-31 در حضور و عدم حضور مس سولفات به روش طیف سنجی رسم شد. کشت خالص شده باکتری Ta-31 با استفاده از محیط‌کشت نوترینت آگار به دست آمد. سپس یک لوپ از آن به ارلن مایر حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط‌کشت TSB منتقل شد و در گرمخانه تکان دهنده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با دور حدود ۱۳۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا به کدورت نیم مک‌فارلند برسد. سپس یک میلی لیتر از آن به ارلن حاوی ۱۲۰ میلی لیتر محیط‌کشت TSB تلقیح و در گرمخانه تکان دهنده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۳۰ دور در دقیقه قرار گرفت. برای بررسی اثر القاکننده در تولید نانوذرات مس، یک میلی لیتر از سوسپانسیون به ارلن حاوی ۱۲۰ میلی لیتر TSB با غلظت ۰/۱ میلی مولار مس سولفات تلقیح شد. برای آماده سازی محیط‌کشت حاوی القاکننده، محلول با غلظت یک میلی مولار از مس سولفات تهیه و با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر استریل شدند. بررسی میزان دانسیته نوری^۵

^۵ Generation time

^۶ Colony Forming Unit

سویه جدید باکتری ... ----- کرد زنگنه و همکاران

شدت پیک به دست آمد. سپس با استفاده از رابطه شرر^۸ اندازه بلورها محاسبه شد.

$$D = (0.9 \lambda) / (\beta \cos \theta) \quad \text{معادله ۱-۳}$$

کمیت‌های مورد استفاده در این رابطه عبارت اند از: D اندازه بلور، β عرض پیک در نصف شدت بیشینه، θ زاویه براگ مربوط به پیک و λ طول موج مربوط به پیک هستند.

۲-۱۱ بررسی اثر فاکتورهای مختلف در تولید نانوذرات

آزمایش‌های بهینه‌سازی مربوط به تولید نانوذرات مس از سویه باکتریایی Ta-31 انجام شد.

ویژگی‌های نانوساختارهای تهیه شده، از روش‌های مختلفی شامل طیف سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR)، تصویربرداری الکترونی روبشی (SEM)، طیف سنجی پراش انرژی پرتوایکس (EDS) و الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) نیز استفاده شد. در الگوی پراش اشعه ایکس پس از تابش پرتو، الگوی حاصل از جذب اشعه توسط اتم‌ها به دست می‌آید. با محاسبه عرض پیک در نصف شدت بیشینه اندازه بلورها محاسبه شد. ابتدا شدیدترین پیک را در زاویه 2θ و پهنای پیک را در نصف

جدول ۱ نام، مقدار و نوع ترکیب‌های تشکیل دهنده محیط‌کشت‌های طراحی شده

| نام محیط | مقدار و نوع ترکیب‌های تشکیل دهنده در یک لیتر |
|----------|--|
| A | محیط‌کشت TSB، مس سولفات (۰/۱ میلی‌مولار)، ۰/۱ گرم گلوکز (۰/۱ میلی‌مولار) |
| B | محیط‌کشت TSB، مس سولفات (۰/۱ میلی‌مولار) |
| C | محیط‌کشت TSB، ۰/۱ گرم گلوکز (۰/۱ میلی‌مولار) |
| D | محیط‌کشت TSB |

جدول ۲ آزمایش‌های طراحی شده برای بهینه‌سازی تولید نانوذرات مس

| آزمایش | محیط‌کشت | الفاکننده | الکترون دهنده | پیش ماده (میلی‌مولار) | محلول رویی کشت (میلی‌لیتر) |
|--------|----------|-----------|---------------|-----------------------|----------------------------|
| ۱ | C | - | + | ۱ | ۱۰ |
| ۲ | B | + | - | ۱ | ۱۰ |
| ۳ | A | + | + | ۱ | ۱۰ |
| ۴ | D | - | - | ۱ | ۱۰ |
| ۵ | D | - | - | ۲ | ۲۰ |
| ۶ | A | + | + | ۲ | ۲۰ |
| ۷ | B | + | - | ۲ | ۲۰ |
| ۸ | C | - | + | ۲ | ۲۰ |
| ۹ | C | - | + | ۱ | ۲۰ |
| ۱۰ | D | - | - | ۱ | ۲۰ |
| ۱۱ | A | + | + | ۱ | ۲۰ |
| ۱۲ | B | + | - | ۱ | ۲۰ |
| ۱۳ | A | + | + | ۲ | ۱۰ |
| ۱۴ | D | - | - | ۲ | ۱۰ |

8 Debye Scherrer

| | | | | | |
|----|---|---|---|---|----|
| ۱۰ | ۲ | + | - | C | ۱۵ |
| ۱۰ | ۲ | - | + | B | ۱۶ |

روش کلمودین، برای تأیید استخراج DNA، انجام شد [۱۷]. ژن 16S rDNA با طول حدود ۱۵۰۰ نوکلئوتید، با استفاده از آغازگرهای 27F و 1492R تکثیر شد. مواد مورد نیاز برای تهیه مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای حجم واکنش ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر 5X، $MgCl_2$ با غلظت ۲/۵ تا ۰/۵ میلی مول، dNTP با غلظت ۰/۴ میلی مول از هر کدام، آنزیم *Taq DNA* پلی مراز به میزان 1 U و آغازگرهای رفت و برگشت ذکر شده از هر کدام به میزان ۰/۵ تا ۰/۴ میلی مول و DNA الگو به میزان مناسب استفاده شد. در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شاهد منفی برای اطمینان از عدم آلودگی مواد مورد استفاده با افزودن آب به جای DNA الگو در واکنش به کار رفت. اولین واسرشتگی DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. این واکنش شامل ۳۰ چرخه تکرار شونده بود هر چرخه شامل واسرشت با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای اتصال بین ۵۰ تا ۵۵ سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد و سپس به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد سنتز نهایی انجام شد. خالص سازی و تعیین توالی محصول PCR توسط شرکت سوئیدی میکروسنس ۱۰ و از طریق شرکت توپازژن انجام شد. ترادف‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Chromas Pro مرتب شد [۱۸]. به این ترتیب نزدیک‌ترین سویه‌ها با ترادف 16S rDNA مشابه با سویه منتخب PCR شده در پایگاه اینترنتی Ezbiocloud تعیین شد [۱۹]. درخت تبارزایی بعد از یافتن ترادف 16S rDNA سویه نزدیک در پایگاه اینترنتی Ezbiocloud [۱۹]، هم راستا کردن و محاسبه فاصله‌های تکاملی با نرم‌افزار Chromas Pro و الگوریتم Neighbour-Joining رسم شد

در این آزمایش چهار عامل القاکننده، الکترون‌دهنده، غلظت پیش ماده، مقدار محلول رویی کشت بررسی شد. اثر الکترون‌دهنده (گلوکز با غلظت ۵۶ میلی‌مولار)، اثر القاکننده (مس سولفات با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار) هرکدام در دو سطح (حضور یا عدم حضور) و غلظت پیش‌ماده (۱، ۲ میلی‌مولار)، مقدار محلول رویی کشت باکتریایی (۱۰، ۲۰ میلی‌لیتر) هرکدام در دو سطح بررسی شدند. در این پژوهش طراحی آزمایش‌ها انجام شد. برای شروع آزمایش چهار محیط کشت A، B، C و D طبق جدول ۱ آماده شد. سپس، به هر یک از محیط‌کشت‌ها، سویه باکتریایی Ta-31 تلقیح شد. ۱۶ آزمایش طراحی شده برای تولید نانوذرات مس با استفاده از محلول رویی کشت باکتری Ta-31 انجام شد (جدول ۲).

۲-۱۲ بررسی اثر زمان

در این آزمایش تأثیر زمان بر فرایند تولید نانوذرات مس بررسی شد. تشکیل نانوذرات مس هر روز تا روز هفتم از طریق تغییر رنگ محلول و طیف‌سنجی فرابنفش - مرئی ثبت شد.

۲-۱۳ تعیین ماندگاری نانوذرات مس تولید شده

محلول حاوی نانوذرات ساخته شده در دمای آزمایشگاه نگه داشته شد. و در فواصل زمانی منظم، حضور نانوذرات با مشاهده تغییر رنگ و طیف‌سنجی فرابنفش - مرئی بررسی شد. زمان ماندگاری نانوذرات با دستگاه طیف‌سنجی فرابنفش - مرئی ثبت شد.

۲-۱۴ تعیین ترادف 16S rDNA و تحلیل تبارزایی

پس از انتقال توده زیستی سویه Ta-31 به ویال مناسب استخراج DNA، استخراج دستی به روش مارمور طبق مراحل زیر انجام شد. الکتروفورز ژل آگارز بر اساس

سویه جدید باکتری ... کرد زنگنه و همکاران

غلظت ۴ میلی مولار را داشتند و دارای مقاومت خوبی بودند، سویه Ta-31 که قادر به تولید نانوذرات مس بود، به طور تصادفی انتخاب شد.

۲-۳ اثبات تولید زیستی نانوذرات به وسیله باکتری ها

نانوذرات مس به صورت خارج سلولی با استفاده از محلول رویی کشت فعال و غیر فعال به طور همزمان ساخته شد. در این صورت اثبات تولید نانوذرات به عنوان یک رویکرد زیستی انجام شد. پس از گذشت زمان در مخلوط واکنش حاوی محلول رویی کشت، تغییر رنگ سبز آبی ساخت نانوذرات مس را ثابت کرد. همچنین تولید نانوذرات مس با استفاده از طیف سنجی فرابنفش-مرئی تایید شد. اما محیط واکنش حاوی محلول رویی کشت غیرفعال حتی با گذشت یک هفته هیچ تغییر رنگی مشاهده نشد که نشان دهنده عدم تولید نانوذرات است. این نتیجه با استفاده از طیف سنجی فرابنفش-مرئی تایید شد. بنابراین فرضیه احیای یون های مس به نانوذرات با استفاده از آنزیم ها و پروتئین های باکتریایی ثابت می شود. شکل ۱ تولید نانوذرات مس را در طول زمان با استفاده از محلول رویی کشت سویه Ta-31 به صورت فعال و غیرفعال نشان می دهند.

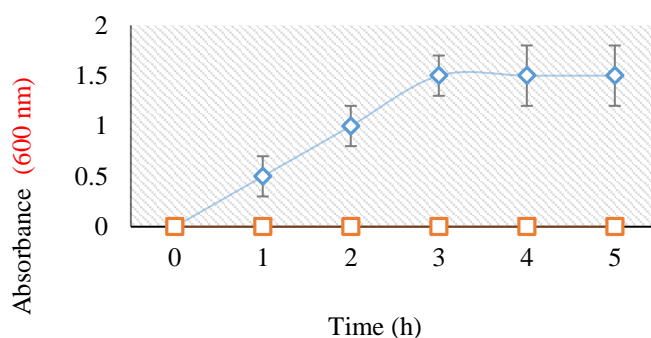
[۱۹]. با استفاده از نرم افزار MEGA (ویرایش ششم) درخت تبارزایی با الگوریتمهای Maximum likelihood و Maximum parsimony رسم شد [۲۰]. بررسی اعتبار شاخه های درخت با استفاده از الگوریتم Bootstrap analysis و با ۱۰۰۰ بار نمونه گیری انجام شد [۲۱].

۱۵-۲ آزمون های بیوشیمیایی برای شناسایی سویه Ta-31

برای شناسایی اولیه سویه Ta-31، رنگ آمیزی گرم و آزمایش های اکسیداز، کاتالاز، KOH ۳ درصد، تحرک، تولید اندول، بررسی تولید دی هیدروژن سولفید (H_2S) و بررسی تولید اوره آز انجام شد.

۳- نتایج

۳-۱ غربالگری باکتری های توانا در تولید نانوذرات مس در این آزمایش مقاومت باکتری های خالص شده از نمونه های آلوده به یون های مس سنجیده شد. سپس، شناسایی باکتری های مقاوم در غلظت های بالای مس، برای دستیابی به سویه های برتر جهت تولید زیستی نانوذرات مس انجام شد. برای این کار، محیط های کشت حاوی غلظت های ۱ تا ۴ میلی مولار ارزیابی شد. تعداد زیادی از باکتری ها توانایی رشد بر روی محیط های ذکر شده را داشتند. از بین باکتری هایی که توانایی رشد در



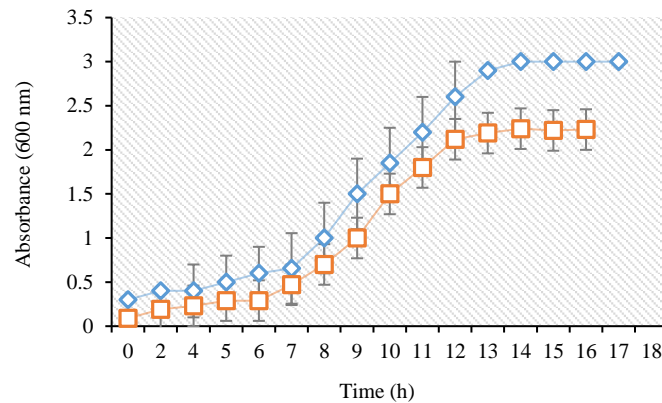
شکل ۱ تولید نانوذرات مس با استفاده از محلول رویی کشت Ta-31 فعال (◇) و غیرفعال (□)

۳-۳ تعیین زمان بهینه برای برداشت کشت باکتریایی

مراحل رشد سویه باکتری Ta-31 را می توان به صورت یک منحنی نمایش داد که منحنی رشد باکتری نامیده

می شود. الگوی رشد آنها شامل چهار فاز تأخیری^{۱۱}، فعال تکثیر^{۱۲}، سکون^{۱۳} و مرگ^{۱۴} می شود. در اواخر فاز تکثیر و اوایل فاز سکون منحنی رشد، تعداد باکتری‌ها به حداکثر می رسد. در نتیجه، آنزیم‌ها و مولکول‌های زیستی مؤثر در تولید نانوذرات به مقدار زیادی افزایش می یابند. در این پژوهش، منحنی رشد باکتری‌ها با روش طیف سنجی رسم شد (شکل ۲). سپس میزان رشد سویه باکتری و زمان رسیدن آنها به مراحل ذکر شده، مشخص شد. یکی از عامل‌های مورد بررسی در فرایند تولید نانوذرات، اثر القاکننده آنزیم است. برای بررسی و تخمین بهترین زمان، برای برداشت محلول رویی کشت، منحنی رشد سویه Ta-31 در حضور القاکننده آنزیم (غلظت ۰/۱ میلی مولار از

مس سولفات) نیز رسم شد. به دلیل وجود خطاهای احتمالی این آزمایش سه مرتبه تکرار شد. منحنی رشد سویه Ta-31 در عدم حضور و حضور مس سولفات نشان داده شده است. مشخص شد سویه باکتری Ta-31 در عدم حضور القاکننده رشد بیشتری داشت. لازم به ذکر است که با توجه به منحنی رشد سویه باکتری Ta-31 پس از ۱۵ ساعت به انتهای فاز فعال تکثیر و شروع فاز سکون رسید. بنابراین، بهترین زمان برای برداشت محلول رویی کشت، برای تولید نانوذرات مس کمتر از ۱۵ ساعت بعد از تلقیح است. بنابراین با توجه به این آزمایش مشخص شد که سویه Ta-31 از باکتری‌های تند رشد بوده، زیرا حداکثر ۱۵ ساعت به مرحله سکون رسیده‌اند.



شکل ۲ منحنی رشد سویه Ta-31 در عدم حضور (◇) و حضور مس سولفات (□)

جدول ۳ تعیین تعداد واحد کلونی و زمان دو برابر شدن سویه Ta-31

| سویه Ta-31 | | |
|-------------|--|------------------------------------|
| زمان (ساعت) | CFU در میلی لیتر در عدم حضور مس سولفات | CFU در میلی لیتر در حضور مس سولفات |
| ۱ | 5×10^4 | 1×10^4 |
| ۴ | 4×10^7 | 1×10^7 |

¹³ Stationary phase

¹⁴ Death phase

¹¹ Lag phase

¹² Log phase

| | | |
|------|------|---------------------------|
| ۵/۵۵ | ۳/۲۹ | زمان دو برابر شدن (دقیقه) |
|------|------|---------------------------|

مدت زمان بسیار کوتاه همراه با احیای یون‌های مس به نانوذرات مس مشاهده می‌شود. در این بخش سنتز نانوذرات مس با طیف سنجی UV-Vis سنجیده شد. در مرحله اول نشان دهنده وجود یک پیک جذبی مشخص در طول موج ۶۵۰ نانومتر با میزان جذب ۰/۲۲ بود که وجود نانوذرات مس را اثبات می‌کند. با توجه به نمودار این ادعا قابل مشاهده است. لازم به ذکر است که مقدار بیشتر نانوذرات مس در محلول واکنش و پیک جذبی بهتر در شرایط بهینه به دست آمد. در ادامه پیک جذبی پس از بهینه سازی در طول موج ۶۰۰ نانومتر و میزان جذب ۰/۴۴ مشاهده می‌شود (شکل ۳).

۳-۶ نتایج آزمون طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR)

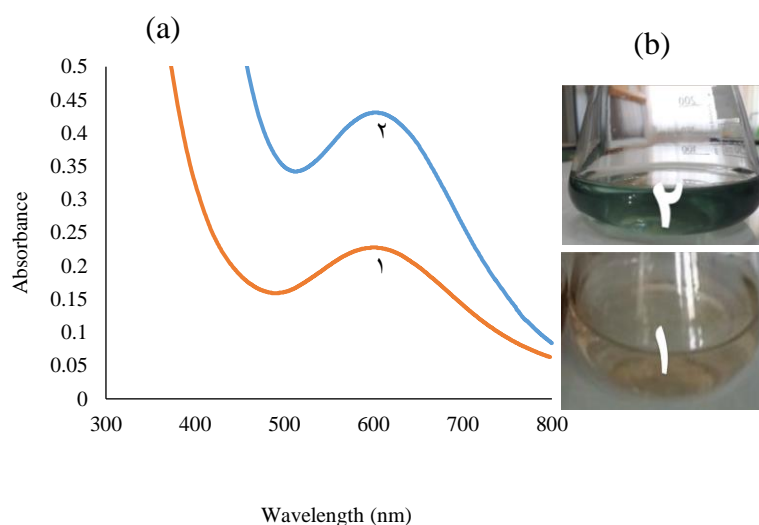
طیف FTIR از نانو ساختارهای مس در شکل ۴ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل حاصل از FTIR در محدوده $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ، همه گروه‌های عاملی و پروتئین‌های پایدارکننده را نشان می‌دهد.

۳-۴ بررسی زمان دو برابر شدن باکتری بر اساس CFU

پس از ترسیم منحنی رشد، اندازه‌گیری زمان دو برابر شدن سویه باکتری بر اساس واحد تشکیل کلونی (CFU/ml) بررسی شد. همانطور که در جدول ۳ قابل مشاهده است، در این آزمایش زمان دو برابر شدن سویه Ta-31 در حضور و عدم حضور مس سولفات به ترتیب ۵/۵۵ و ۳/۲۹ دقیقه گزارش شده است. این مقادیر نشان می‌دهد که در عدم حضور القاکننده (مس سولفات) سرعت تقسیم سلولی بیشتر و در نتیجه میزان باکتری‌ها بیشتر است. در این بخش مشخص شد که نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از منحنی رشد مطابقت دارد.

۳-۵ مشاهده تغییر رنگ و بررسی نانوذرات مس با دستگاه طیف سنجی فرابنفش-مرئی

سویه Ta-31 تنها قادر به تولید نانوذرات مس به صورت خارج سلولی است. اولین مرحله در تشخیص تولید نانوذرات مس، تغییر رنگ محلول از قهوه‌ای کم رنگ به سبزی بود [۲۲]. با توجه به شکل ۳ این مرحله با گذشت



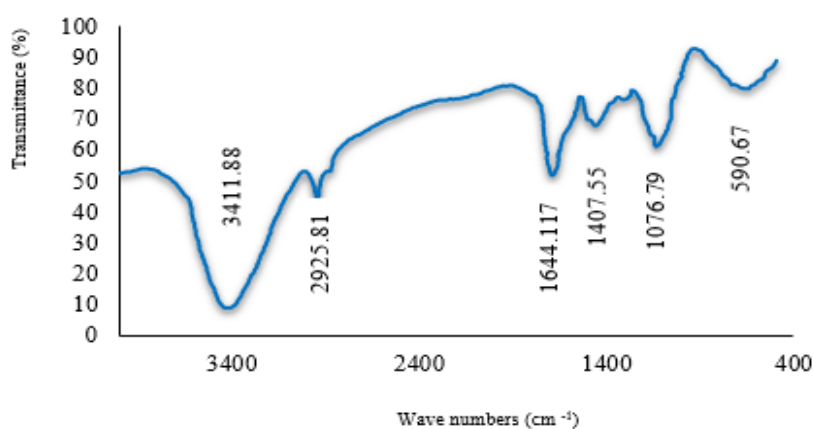
شکل ۳ طیف‌های جذبی سنتز نانوذرات مس به ترتیب با گذشت ۱۰ و ۲۰ دقیقه از شروع واکنش (a) و مشاهده تغییر رنگ محلول واکنش (b)

گروه‌های زیستی قابل مشاهده در FTIR انجام شد (شکل ۴).

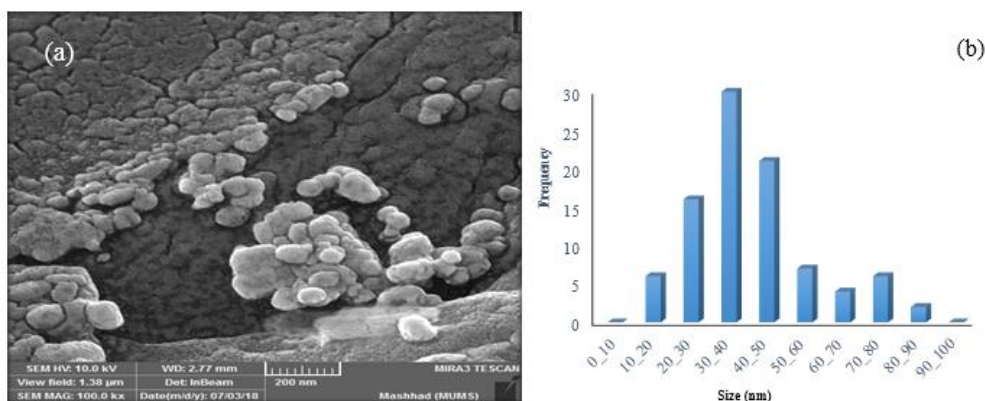
۷-۳ نتایج حاصل از مطالعه با تصویربرداری الکترونی روبشی

شکل ۵ تصویر حاصل از تصویربرداری الکترونی روبشی (SEM) نانو ساختارهای مس را در شکل کروی و نامنظم نشان می‌دهد. لازم به ذکر است که آنالیز تصاویر SEM توسط نرم‌افزار digimizer به دست آمد. همانطور که از شکل ۵ مشخص است توزیع اندازه نانوذرات مس بیشتر در محدوده ۳۰-۴۰ نانومتر تخمین زده شد.

لایه پروتئینی همراه با مولکول‌های زیستی دیگر مانند کربوهیدرات‌ها نانوذرات مس تولید شده را احاطه می‌کند. این پدیده موجب پایداری نانوذرات مس در مدت زمان طولانی شده و همچنین باعث زیست سازگاری آنها می‌شود. در این طیف نوار جذبی موجود در ناحیه ۵۹۰/۶۷ و ۱۰۷۶/۷۹ مربوط به پیوندهای یونی است. نوار جذبی مشاهده شده در ناحیه ۱۶۴۴/۱۷ مربوط به کشش پیوند (C-C) و پیک در ناحیه ۲۹۲۵/۸۱ مربوط به ارتعاشات کششی آلکان هاست. نوار جذبی مشاهده شده در ۳۴۱۱/۸۸ مربوط به پیوند آمین نوع I است. در مطالعه حاضر کاهش مس سولفات به نانوذرات مس با توجه به



شکل ۴ طیف FTIR نانو ساختارهای مس



شکل ۵ تصویر SEM از نانوساختارهای مس در مقیاس ۲۰۰ نانومتر (a)، توزیع فراوانی اندازه نانوذرات مس (b)

برای مشاهده بهترین نتایج از آزمایش‌های انجام شده در تحلیل اثر فاکتورهای مختلف بر فرایند تولید نانوذرات مس از سویه Ta-31، حضور ۱ درصد گلوکز به عنوان عامل الکترون دهنده به محلول رویی کشت به صورت ثابت در همه آزمایش‌ها، غلظت ۲ میلی‌مولار مس سولفات به عنوان پیش ماده، مقدار ۲۰ میلی‌لیتر محلول رویی کشت و اثر الکترون‌دهندگی گلوکز و القاکننده سولفات مس بی‌تأثیر هستند. سپس در این شرایط بیشترین میزان نانوذرات مس تولید می‌شود. نتایج اثر فاکتورهای مؤثر در سنتز نانوذرات مس در جدول ۴ ذکر شده است.

۳-۱۰ ماندگاری نانوذرات مس

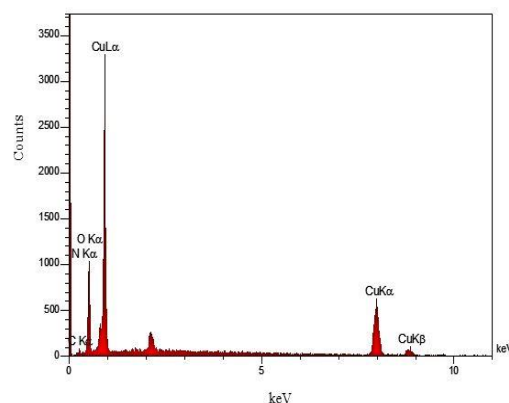
در ابتدا نانوذرات مس پس از گذشت ۲۰ دقیقه سنتز شدند. سپس ارلن حاوی محلول نانوذرات مس سنتز شده در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. در فواصل زمانی منظم، حضور نانوذرات مس با مشاهده تغییر رنگ محلول و طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی (UV-Vis) بررسی شد. در این پژوهش سنتز نانوذرات به مدت ۷ روز سنجیده شد و حضور نانوذرات در این مدت قابل اثبات بود. با توجه به شکل ۷ قابل مشاهده است که مقدار جذب به دلیل کاهش یون‌های مس به نانوذرات مس افزایش یافته است و باعث افزایش مقدار نانوذرات مس خواهد شد.

۳-۱۱ شناسایی سویه باکتریایی Ta-31

۳-۸ نتایج به دست آمده از طیف سنجی پراش انرژی

پرتو ایکس

شکل ۶ نتایج حاصل از تحلیل EDS نانوساختارهای مس را نشان می‌دهد و حضور نانوذرات مس (۹۰ درصد) را به عنوان عنصر اصلی در KeV تایید می‌کند. همچنین، حضور عناصر دیگری از جمله کربن، اکسیژن و نیتروژن در شکل زیر مشهود است. حضور این عناصر حاکی از وجود عناصر زیستی بر روی نانوذرات مس سنتز شده است. این عناصر قادر به پوشاندگی نانوذرات مس فلزی هستند.



شکل ۶ نتایج حاصل از EDS نانوذرات مس

۳-۹ بررسی اثر فاکتورهای مؤثر در تولید نانوذرات

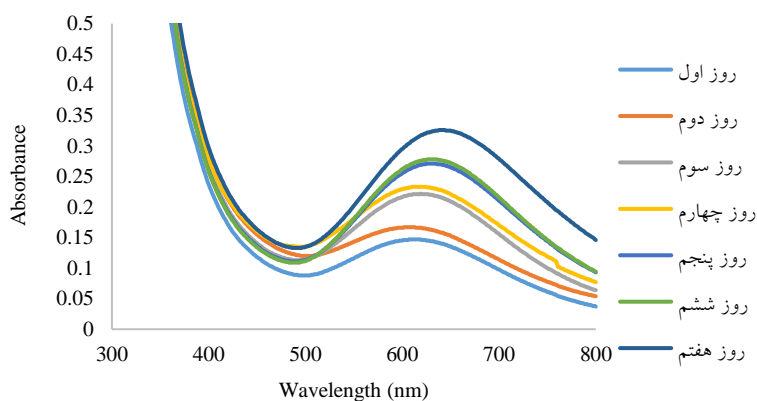
مس

نتایج بررسی شناسایی اولیه نشان داد سویه Ta-31 کوکسی گرم مثبت با کلونی‌های کرم رنگ است. با مقایسه توالی ژن 16S rDNA به دست آمده از سویه منتخب با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی Ezbiocloud، نزدیک‌ترین میکروارگانیسم شناخته شده به سویه مشخص شد. مترادف یابی ژن 16S rDNA با خواندن توالی در جهت رفت ۱۵ انجام شد. براساس این نتایج سویه Ta-31 به تیره *Staphylococcaceae* و جنس *Staphylococcus* تعلق دارد.

سویه Ta-31 به سویه *Staphylococcus pasteurii* ATCC51129(T) میزان ۹۹/۸ درصد شباهت داشت (شکل ۸). پس از شناسایی مولکولی، آزمون‌های بیوشیمیایی مربوط به سویه Ta-31 طبق جدول ۵ انجام شد. نتایج نشان داد سویه Ta-31 متحرک، کاتالاز، اکسیداز و اندول مثبت بود و قادر به تولید آنزیم اوره‌آز بوده و گاز H_2S تولید نمی‌کند.

جدول ۴ نتایج اثر فاکتورهای مؤثر در سنتز نانوذرات مس

| نانوذرات | الفاکننده | محلول رویی کشت | غلظت پیش ماده (میلی مولار) | الکترون دهنده |
|----------|-----------|----------------|----------------------------|---------------|
| مس | - | ۲۰ میلی لیتر | ۲ میلی مولار | - |



شکل ۷ سنجش ماندگاری نانوذرات مس به مدت ۷ روز

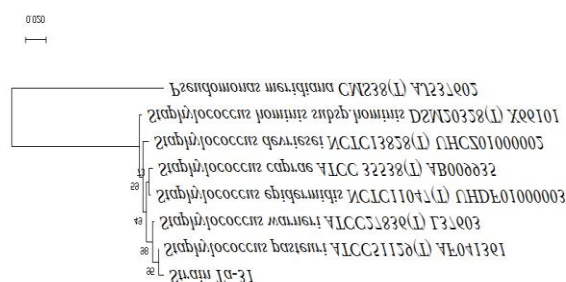
نتایج بررسی شناسایی اولیه نشان داد سویه Ta-31 کوکسی گرم مثبت با کلونی‌های کرم رنگ است. با مقایسه توالی ژن 16S rDNA به دست آمده از سویه منتخب با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی Ezbiocloud، نزدیک‌ترین میکروارگانیسم شناخته شده به سویه مشخص شد. مترادف یابی ژن 16S rDNA با خواندن توالی در جهت رفت ۱۶ انجام شد. براساس این نتایج سویه Ta-31 به تیره

۳-۱۱ شناسایی سویه باکتریایی Ta-31

موجود در پایگاه اطلاعاتی Ezbiocloud، نزدیک‌ترین میکروارگانیسم شناخته شده به سویه مشخص شد. مترادف یابی ژن 16S rDNA با خواندن توالی در جهت رفت ۱۶ انجام شد. براساس این نتایج سویه Ta-31 به تیره

سویه جدید باکتری ... ----- کرد زنگنه و همکاران

Staphylococcaceae و جنس *Staphylococcus* تعلق دارد. سویه Ta-31 به سویه *Staphylococcus pasteurii* ATCC51129(T) میزان ۹۹/۸ درصد شباهت داشت (شکل ۸). پس از شناسایی مولکولی، آزمون‌های بیوشیمیایی مربوط به سویه Ta-31 طبق جدول ۵ انجام شد. نتایج نشان داد سویه Ta-31 متحرک، کاتالاز، اکسیداز و اندول مثبت بود و قادر به تولید آنزیم اوره‌آز بوده و گاز H_2S تولید نمی‌کند.



شکل ۸ دندروگرام 16S rDNA باکتری ترادف‌یابی شده برای

سویه Ta-31

اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری Bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است. از سویه *Pseudomonas meridiana* به‌عنوان گروه بیرونی استفاده شد.

جدول ۵ آزمون‌های بیوشیمیایی سویه‌های منتخب

| سویه Ta-31 | آزمون‌های بیوشیمیایی |
|------------|----------------------|
| + | اکسیداز |
| + | کاتالاز |
| - | KOH |
| + | تحرك و توليد اندول |
| - | توليد گاز H_2S |
| + | اوره‌آز |

۴- بحث

پژوهش بر روی میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان منبع ایده‌آل در سنتز نانوذرات به سرعت در حال گسترش است که از زیستگاه‌های مختلف جدا و با نمک‌های فلزی به سمت

تولید نانوذرات ناشناخته به چالش کشیده شده‌اند. میکروارگانیسم‌ها مواد غیر معدنی را یا به‌صورت داخل سلولی و یا خارج سلولی در ابعاد نانومواد تولید می‌کنند. در سال‌های اخیر توجه زیادی به میکروارگانیسم‌ها متمرکز شده است. این امر به علت این واقعیت است که سنتز نانوذرات توسط میکروارگانیسم‌ها راحت‌تر از سایر روش‌ها است. همچنین، سویه‌های مختلف باکتریایی نیز مطالعه‌ای برای سنتز نانوذرات مانند نقره، آهن، طلا، مس و غیره هستند [۲]. خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، منبع بالقوه‌ای برای جداسازی سویه‌های مقاوم به فلزات می‌باشند. درک اساس ژنتیکی مقاومت به فلزات سنگین در باکتری‌ها می‌تواند به استفاده از این سازوکارهای طبیعی جهت بهبود محیط زیست همه موجودات زنده نیز منجر شود [۲۳]. با توجه به نتایج حاصل از مطالعه سنتز نانوذرات، روش‌های فیزیکی و شیمیایی رایج بسیار گران و خطرناک به نظر می‌رسد. نانوذرات مس تولید شده به روش زیستی بازده بالا، حلالیت خوب و ثبات بالایی دارد و در مقایسه با دیگر روش‌های سنتز ساده، سریع، غیر سمی و قابل اعتماد است و روش سبز می‌تواند اندازه و شکل نانوذرات را در شرایط بهینه مشخص کند. علاوه بر این، نانوذرات سنتز شده در زمینه‌های مختلف کاربردهای سازگار با محیط زیست دارند. در این پژوهش، تولید زیستی نانوذرات مس با استفاده از سویه Ta-31 به‌صورت خارج سلولی انجام شد. با توجه به مطالعات انجام شده، این روش از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه‌تر است. در این پژوهش ماندگاری نانوذرات مس سنتز شده به مدت هفت روز با استفاده از دستگاه طیف سنجی فرابنفش-مرئی در فواصل زمانی مشخص ثبت شد. با توجه به نتایج ماندگاری نانوذرات مس بدون حضور عامل پایدارکننده‌ای قابل اثبات بود و این خاصیت نانوذرات به‌عنوان یک مزیت نسبت به نانوذرات سنتز شده به روش شیمیایی بیان شده است. محققین در سال‌های اخیر نانوذرات مس را به

است، که از این لحاظ هم مشابه گونه باکتریایی فوق است [۲۸].

تشکر و سپاسگزاری: بدین وسیله از گروه زیست شناسی سلولی و ملکولی دانشگاه کاشان برای فراهم کردن مواد، وسایل و امکانات لازم جهت انجام این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را داریم.

۵- منابع

- [1] Deljou A, Goudarzi S.(2016).Green extracellular synthesis of the silver nanoparticles using thermophilic *Bacillus* sp. AZ1 and its antimicrobial activity against several human pathogenetic bacteria. *Iranian journal of biotechnology*,14(2),25.
- [2] Baker S, Harini B, Rakshith D, Satish S.(2013).Marine microbes: invisible nanofactories. *Journal of Pharmacy Research*,6(3),383-388.
- [3] Hasan S.(2015).A review on nanoparticles: their synthesis and types. *Research Journal of Recent Sciences*. ISSN,22772502.
- [4] Irvani S, Korbekandi H, Mirmohammadi SV, Zolfaghari B.(2014).Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in pharmaceutical sciences*,9(6),385.
- [5] Saravanan M, Barik SK, MubarakAli D, Prakash P, Pugazhendhi A.(2018).Synthesis of silver nanoparticles from *Bacillus brevis* (NCIM 2533) and their antibacterial activity against pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis*,116221-6.
- [6] Ahmad A, Senapati S, Khan MI, Kumar R, et al.(2003).Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* species. *Nanotechnology*,14(7),824.
- [7] Ghareib M, Tahon MA, Saif MM, Abdallah WE-S.(2016).Rapid extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by *Cunninghamella phaeospora* culture supernatant. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*,15(4),915.
- [8] Kimber RL, Lewis EA, Parmeggiani F, Smith K, et al.(2018).Biosynthesis and characterization of copper nanoparticles using *Shewanella oneidensis*: application for click chemistry. *Small*,14(10),1703145.
- [9] Nazar N, Bibi I, Kamal S, Iqbal M, et al.(2018).Cu nanoparticles synthesis using biological molecule of *P. granatum* seeds extract as reducing and capping agent: Growth mechanism and

روش های مختلف سنتز کردند که برخی از آنها ذکر می شود. جاویر ۱۷ و همکاران نانوذرات مس را به روش کاهش شیمیایی سنتز کردند. در پژوهش آنها از سیکلودکسترین به عنوان عامل تثبیت کننده استفاده شد [۲۴]. اما در این پژوهش سنتز زیستی نانوذرات مس بدون حضور عامل پایدار کننده ای با استفاده از محلول رویی کشت حاصل از سویه Ta-31 انجام شده است. در پژوهشی دیگر توسط کارولینگ^{۱۸} در سال ۲۰۱۵ نانوذرات مس با استفاده از عصاره گیاه *Phyllanthus* سنتز شد و با استفاده از نتایج FTIR همانند نتایج پژوهش حاضر گروه های عاملی مهم در کاهش زیستی مس سولفات شناسایی شدند [۲۵]. در سال ۲۰۲۱ دشتی زاده و همکاران نانوذرات مس را با استفاده از عصاره گیاه *Prunus mahaleb* L. ساختند که اندازه نانوذرات مس ساخته شده بین ۲۰ تا ۳۰ نانومتر بود [۲۶]. رخشان و همکاران در سال ۲۰۲۱ نانوذرات مس را با استفاده از دو سویه باکتری PN14F و B3 مقاوم به مس ساختند که به ترتیب به سویه های *Bacillus haynesii* (99.87%) و *Bacillus halotolerans* (100%) شبیه بودند. این نانوذرات شکل کروی با اندازه بین ۱۵-۱ نانومتر داشتند [۲۷]. نتایج بررسی های فیلورنی نشان داد که سویه Ta-31 به گونه باکتریایی *Staphylococcus pasteurii* sp. شباهت ۹۹/۸۸ درصد دارد. چسینیو^{۱۹} و همکاران در سال ۱۹۹۳ این گونه را از بین سویه های جدا شده از نمونه های انسانی، حیوانی و غذایی شناسایی کردند. جنس *Staphylococcus* دارای ۲۹ گونه است. سویه Ta-31 از لحاظ آزمون های بیوشیمیایی اکسیداز، کاتالاز، تحرک و تولید اندول و اوره آز نتایجی مشابه با گونه باکتریایی مذکور دارند. همچنین، این سویه قادر به تولید پیگمان زرد بوده که به دلیل تولید رنگدانه های کارتنوئیدی به نام استافیلوزانتین

19 Chesneau

¹⁶ Javier Sua´ rez-Cerda

¹⁸ Caroling

- united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*,67(5),1613.
- [20] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.(2011).MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*,28(10),2731-9.
- [21] Felsenstein J.(1985).Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*,39(4),783-91.
- [22] Sharon EA, Velayutham K, Ramanibai R.(2018).Biosynthesis of Copper Nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* against Dengue Vector *Aedes aegypti*. *Int J Life Sci Scienti Res eISSN,2455(1716)*,1716.
- [23] Achudume A, Oladipo B.(2009).Effects of dust storm on health in the Nigerian environment. *Biology and Medicine*,1(4),21-7.
- [24] Suárez-Cerda J, Espinoza-Gómez H, Alonso-Núñez G, Rivero IA, Gochi-Ponce Y, Flores-López LZ.(2017).A green synthesis of copper nanoparticles using native cyclodextrins as stabilizing agents. *Journal of Saudi Chemical Society*,21(3),341-8.
- [25] Caroling G, Vinodhini E, Ranjitham AM, Shanthi P.(2015).Biosynthesis of copper nanoparticles using aqueous *Phyllanthus embilica* (Gooseberry) extract-characterisation and study of antimicrobial effects. *Int J Nano Chem*,1(2),53-63.
- [26] Dashtizadeh Z, Kashi FJ, Ashrafi M.(2021).Phytosynthesis of copper nanoparticles using *Prunus mahaleb* L. and its biological activity. *Materials Today Communications*,27102456.
- [27] Rakhshan N, Mansournia M, Kashi FJ.(2021).A Novel Bacterial Route to Synthesize Cu Nanoparticles and Their Antibacterial Activity. *Journal of Cluster Science*1-14.
- [28] Chesneau O, Morvan A, Grimont F, Labischinski H, El Solh N.(1993). *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*,43,2: 237-44.
- photo-catalytic activity. *International journal of biological macromolecules*,1061203-10.
- [10] Suneetha WJ, Maheswari KU.(2018).Green Synthesis of Copper Nanoparticles Using *Momordica charantia* Fruit Extracts and Evaluation of Their Anti-Microbial Efficacy.
- [11] Tiwari M, Jain P, Hariharapura RC, Narayanan K, et al.(2016).Biosynthesis of copper nanoparticles using copper-resistant *Bacillus cereus*, a soil isolate. *Process Biochemistry*,51(10),1348-56.
- [12] Lee H-J, Lee G, Jang NR, Yun JH, Song JY, Kim BS.(2011).Biological synthesis of copper nanoparticles using plant extract. *Nanotechnology*,1(1),371-4.
- [13] Srikar SK, Giri DD, Pal DB, Mishra PK, Upadhyay SN.(2016).Green synthesis of silver nanoparticles: a review. *Green and Sustainable Chemistry*,6(01),34.
- [14] Aljabali A, Akkam Y, Al Zoubi M, Al-Batayneh K, et al.(2018).Synthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *Ziziphus zizyphus* and their antimicrobial activity. *Nanomaterials*,8(3),174.
- [15] Korbekandi H, Ashari Z, Iravani S, Abbasi S.(2013).Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using *Fusarium oxysporum*. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*,12(3),289.
- [16] Khalil MM, Ismail EH, El-Baghdady KZ, Mohamed D.(2014).Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*,7(6),1131-9.
- [17] Marmur J.(1961).A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of molecular biology*,3(2),208-IN1.
- [18] Kommedal Ø, Karlsen B, Sæbø Ø.(2008).Analysis of mixed sequencing chromatograms and its application in direct 16S rRNA gene sequencing of polymicrobial samples. *Journal of clinical microbiology*,46(11),3766-71.
- [19] Yoon S-H, Ha S-M, Kwon S, Lim J, et al.(2017).Introducing EzBioCloud: a taxonomically

Novel strain *Staphylococcus pasteuri* sp. Ta-31 as a bioreactor for copper nanoparticles production

Hadis Kordzangeneh¹, Fereshteh Jookar Kashi^{2*}

¹MSc, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, university of Kashan, Kashan, Iran

²Associate Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, Iran

jookar@kashanu.ac.ir

Receipt: 2022/06/06

Accepted: 2022/09/21

Abstract

This study aimed to isolate and identify bacteria from soils contaminated with copper and have access to a capable bacterial strain for producing copper nanoparticles (CuNPs). The present study showed the extracellular production of copper nanoparticles using strain Ta-31. The effect of various factors such as substrate, supernatant volume, enzyme inducer, and electron donor was investigated on the production process. The properties of synthesized nanoparticles were identified by using UV-Vis, FTIR, XRD, SEM, and EDS analysis. Moreover, the growth curve of strain Ta-31 was plotted in the presence and absence of an enzyme inducer (concentration of 0.1 mM copper sulfate). After the phylogenetic analysis, 16S rDNA gene sequences were determined, and their phylogenetic tree of the selected strain was plotted. The results showed that the best conditions for producing CuNPs, glucose 1% as an electron donor, 2 mM copper sulfate, and 20 ml supernatant had the best production. Strain Ta-31 arrived at the end of the log phase and the beginning of the stationary phase after 15 h. CuNPs were spherical and irregular, and the size of CuNPs was more in the range of 30-40 nm. According to the results, strain Ta-31 belonged to *Staphylococcus pasteuri* sp. with 99.88% similarity.

Keywords: *Staphylococcus pasteuri*, Bioreactor, Copper nanoparticles, Green synthesis

