

بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از باکتری اشیریشیا کولای

* بهاره خداشناس: کارشناس ارشد مهندسی شیمی (بیوتکنولوژی)، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود، شاهرود، ایران (*نویسنده مسئول). bahar.khodashenas67@gmail.com

حمیدرضا قربانی: دکترای مهندسی شیمی، استادیار گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، تهران، ایران. hamidghorbani6@gmail.com
احسان بینانیان: دکترای مهندسی شیمی، استادیار گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر، قائمشهر، ایران. ehsan.binaeian@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۷

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: امروزه سنتز نانو ذرات نقره به دلیل کاربردهای فراوانی که در زمینه‌های مختلف دارند، بسیار متداول است. سنتز این نانو ذرات از طریق روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی انجام می‌شود که روش بیولوژیکی به دلیل سازگاری با محیط زیست و ارزان قیمت بودن نسبت به روش دیگر ارجحیت دارد. تحقیقات نشان داده است که آنزیم نیترات ردوکتاز آزاد شده به وسیله میکروارگانیسم‌ها، عامل اصلی سنتز نانو ذرات نقره است. در مقاله‌ی حاضر از این آنزیم به منظور سنتز نانو ذرات نقره استفاده شد.

روش کار: نانو ذرات نقره به روش بیوسنتز با استفاده از سوپرناتانت به دست آمده از باکتری اشیریشیا کولای سنتز شدند و در نهایت به منظور بررسی دقیق تر نانو ذرات نقره‌ی سنتز شده از دستگاه‌های اسپکتروفوتومتر، میکروسکوپ الکترونی عبوری و پراکندگی دینامیکی نور استفاده شد.

یافته‌ها: با استفاده از دستگاه UV-VIS طول موج در ماکزیم جذب برای دو محلول ۰/۰۱ مولار نیترات نقره که یکی حاوی ۵ و دیگری ۲۰ سی سی از سوپرناتانت باکتری حاوی آنزیم نیترات ردوکتاز می‌باشند به ترتیب ۴۱۵ و ۴۰۵ نانومتر تعیین شد. همچنین برای محلول ۰/۰۱ مولار نیترات نقره‌ی حاوی ۲۰ سی سی سوپرناتانت نقطه‌ی اوج در ۴۳۵ نانومتر مشاهده شد. دستگاه پراکندگی دینامیکی نور سایز نانو ذرات نقره‌ی تولیدی برای محلول‌های ۰/۰۱ مولار حاوی مقادیر ۵ و ۲۰ سی سی سوپرناتانت را به ترتیب ۷۴/۴۷ و ۴۵/۷۳ نانومتر تعیین کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج بررسی نشان داد که با افزایش میزان سوپرناتانت حاوی آنزیم نیترات ردوکتاز سایز نانو ذرات نقره‌ی تولیدی کاهش خواهد یافت. همچنین مشخص شد که افزایش غلظت نیترات نقره موجب افزایش سایز نانو ذرات نقره‌ی تولیدی می‌شود.

کلیدواژه‌ها: نانو ذرات نقره، بیوسنتز، باکتری *E. coli*

مقدمه

واکنش‌های شیمیایی (۴) و در زمینه‌های گوناگون دیگر به دلیل خواص کاتالیستی (۵)، الکترونیکی، آپتیکی (۶،۷) و ضد باکتری (۸) منحصربه‌فرد بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. امروزه دریافته‌اند که میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان یک کارخانه‌ی زنده (Biofactory)، برای سنتز نانو ذرات فلزی مانند سولفید کادمیوم، نقره و طلا قابل استفاده‌اند. بعلاوه محققین روش سنتز بیولوژیک را ترجیح می‌دهند زیرا کنترل توزیع سایز نانو ذرات سنتز شده با این روش بهتر از روش‌های دیگر است (۹،۱۰). تحقیقات گذشته نشان داده است که آنزیم نیترات ردوکتاز آزاد شده به وسیله میکروارگانیسم‌ها، عامل اصلی سنتز نانو ذرات نقره

از آنجا که نانو ذرات، پلی بین حالت حجیم مواد و حالت اتمی یا مولکولی هستند بسیار مورد توجه می‌باشند (۱). در دهه‌های اخیر استفاده از نانو ذرات فلزی به دلیل کاربردهای گسترده‌ای که در صنایع مختلف دارند بسیار رواج یافته است (۲). نانو ذرات دارای ویژگی‌های منحصربه‌فرد الکترونیکی، فیزیکی، شیمیایی، اپتیکی و ... می‌باشند (۳). نانو ذرات نقره به علت اثر ضد میکروبی و استفاده در علوم و صنایع مختلف از جمله در پزشکی به منظور مقابله با ویروس HIV، در صنایع غذایی به‌عنوان یک عامل ضد باکتری در بسته‌بندی مواد غذایی، کاتالیست در

رویی به طور کامل جدا شد. دو ظرف که هر یک شامل ۱۰۰ سی سی نیترات نقره‌ی ۰/۰۰۱ مولار و ۱ سی سی پلی وینیل پیرولیدون (PVP) با غلظت ۲۰ g/l به منظور پایداری و عدم تجمع نانو ذرات آماده شد. به منظور سنتز نانو ذرات نقره، سوپرناتانت حاصله (مایع رویی) که توسط سانتریفوژ آماده شد با مقادیر ۵ و ۲۰ سی سی به دو ظرف آماده اضافه شد. پس از چند دقیقه در مجاورت نور خورشید محلول بی‌رنگ نیترات نقره در هر دو ظرف به رنگ قهوه‌ای در آمد که این تغییر رنگ نشان‌دهنده‌ی احتمال تولید نانو ذرات نقره می‌باشد.

به منظور بررسی اثر غلظت نیترات نقره بر سنتز نانو ذرات نقره دو ظرف که یکی حاوی ۱۰۰ سی سی نیترات نقره‌ی ۰/۰۱ مولار همراه با ۱ سی سی پلی وینیل پیرولیدون (polyvinyl pyrrolidone (PVP) و دیگری حاوی ۱۰۰ سی سی نیترات نقره ۰/۰۰۱ مولار، همراه با ۱ سی سی پلی وینیل پیرولیدون آماده شد. به هر یک از ظروف مقادیر یکسان ۲۰ سی سی سوپرناتانت اضافه شد و پس از چند دقیقه تغییر رنگ مشاهده شد.

به منظور اثبات وجود نانو ذرات نقره، راندمان تولید و سایز نانو ذرات تولیدی در نمونه‌های به دست آمده، از دستگاه‌های اسپکتروسکوپ UV-VIS در محدوده‌ی طول‌موجی ۶۰۰-۳۵۰ نانومتر، آنالیز پراکندگی دینامیکی نور DLS و نیز میکروسکوپ الکترونی TEM استفاده گردید.

یافته‌ها

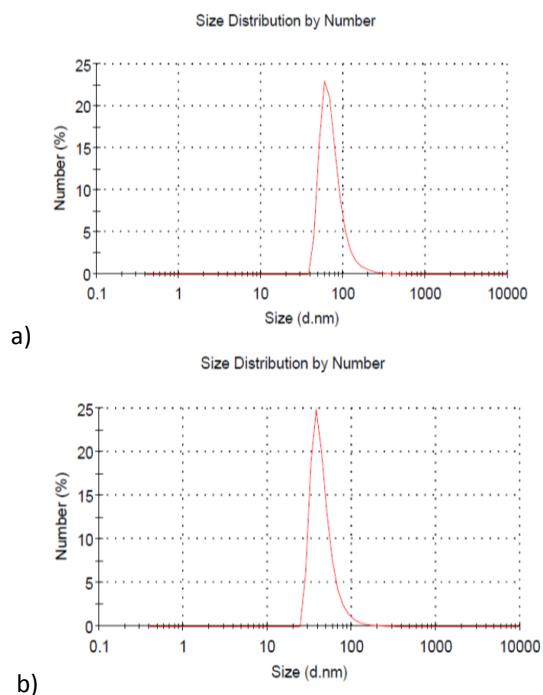
به منظور بررسی ویژگی‌های نانو ذرات نقره تولیدی در آزمایش‌های فوق، نمونه‌های به دست آمده از نظر میزان جذب (λ_{Max}) در محدوده‌ی طول‌موج‌های ۳۵۰-۴۰۰ nm با استفاده از اسپکتروسکوپ نوری (UV-VIS) بررسی شدند. بلانک مورد استفاده در این آزمایشات، آب مقطر محتوی ۱ سی سی پلی وینیل پیرولیدون می‌باشد. طول‌موج در ماکزیمم جذب برای ۱۰۰ سی سی محلول ۰/۰۰۱ مولار نیترات نقره همراه با ۵ و ۲۰ سی سی سوپرناتانت باکتری که هر یک حاوی

است. همچنین مطالعات نشان داده‌اند که NADH و آنزیم نیترات ردوکتاز وابسته به NADH فاکتورهای مهمی در بیوسنتز نانو ذرات فلزی هستند (۱۱). بیوسنتز نانو ذرات نقره با استفاده از باکتری اشیریشیا کولای پیش از این در مقالات بسیاری مورد بررسی قرار گرفته است (۱۲، ۱۳). تفاوت اصلی پژوهش حاضر با سایر مقالات مشابه در اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در محیط کشت‌هایی با ترکیبات مختلف که منجر به انتخاب بهترین محیط کشت از نظر میزان فعالیت آنزیم و در نتیجه دستیابی به راندمان تولید بالاتر شد، می‌باشد.

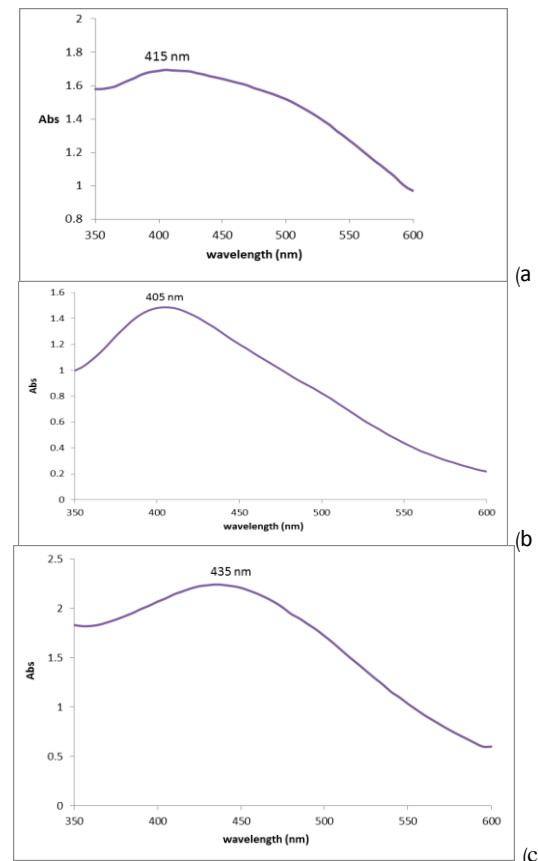
روش کار

نمک نیترات نقره ($AgNO_3$)، پلی وینیل پیرولیدون (PVP)، گلوکز، نیترات پتاسیم (KNO_3) از شرکت Merck آلمان خریداری شدند و محیط کشت تریپتی کازئین سوی برات (TSB) ساخت کشور اسپانیا است. همچنین باکتری اشیریشیا کولای از آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران خریداری شد.

با استفاده از روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز (۱۴، ۱۵) و نیز ترکیبات محیط کشت ذکر شده در (جدول ۲) پژوهش Vaidyanathan و همکارانش (۱۶)، محیط کشت بهینه، از نظر میزان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز، محیط کشتی با ترکیب TSB، ۰/۵ گرم گلوکز و ۱/۵ گرم نیترات پتاسیم (KNO_3) تعیین شد. در ابتدا ۱۰۰ سی سی محیط کشت با ترکیب TSB (۳۰ g/liter)، ۰/۵ گرم گلوکز و ۱/۵ گرم نیترات پتاسیم (KNO_3) آماده شد. سپس محیط کشت پس از آماده‌سازی به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو قرار گرفت و پس از خنک شدن، کولنی باکتری اشیریشیا کولای با کمک لوپ در آن قرار داده شد. فلاسک حاوی باکتری اشیریشیا کولای کشت داده پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای $37^\circ C$ از دستگاه خارج شده و به منظور جداسازی سوپرناتانت باکتری در سانتریفوژ با دور ۴۵۰۰ rpm و به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. پس از اتمام کار دستگاه، با استفاده از کاغذ صافی سوپرناتانت



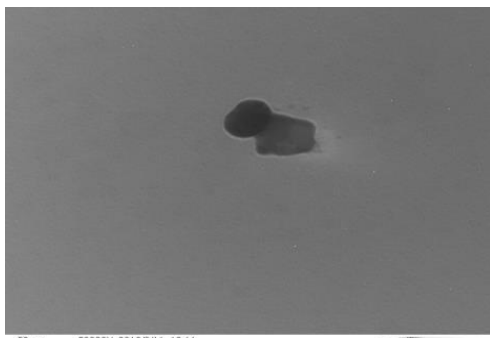
نمودار ۲- توزیع اندازه (سایز بر حسب تعداد) برای محلول‌های ۰/۰۰۱ مولار نیترات نقره همراه با ۱ سی سی PVP و ۵ . a و ۲۰ . b سی سی سوپرناتانت



نمودار ۱- UV-vis برای ۱۰۰ سی سی محلول ۰/۰۰۱ مولار نیترات نقره همراه با (a) ۵ و (b) ۲۰ سی سی سوپرناتانت

قابل مشاهده می‌باشند. نتایج TEM مطابق نمودار ۲ ارائه گردید. بر اساس این نمودارها سایز نانو ذرات نقره‌ی تولیدی برای مقادیر ۵ و ۲۰ سی سی سوپرناتانت به ترتیب ۷۴/۴۷ و ۴۵/۷۳ تعیین شد. نمودار DLS مربوط به غلظت ۰/۰۱ مولار نیترات نقره (که درج نشده است) بیانگر تولید ذراتی با سایز میکرومتر می‌باشد.

تصویر نانو ذرات نقره‌ی سنتز شده در مقیاس ۵۰ نانومتر که با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) ثبت شده در شکل ۱



شکل ۱- تصویر TEM نانوذرات نقره تولید شده توسط باکتری *E.coli*

۱ سی سی پلی وینیل پیرولیدون می‌باشند، به ترتیب ۴۱۵ و ۴۰۵ نانومتر گزارش شد. همچنین طول موج برای محلول ۰/۰۱ مولار نیترات نقره همراه با ۱ سی سی PVP و ۲۰ سی سی سوپرناتانت ۴۳۵ نانومتر تعیین شد.

به منظور اندازه‌گیری دقیق سایز و توزیع نانو ذرات نقره‌ی تولیدی، از آنالیز پراکندگی دینامیکی نور (DLS) استفاده شد. نمونه‌های تولید شده در آزمایشات فوق شامل دو ظرف محلول نیترات نقره‌ی ۰/۰۰۱ مولار همراه با ۱ سی سی PVP که یکی حاوی ۵ cc و دیگری ۲۰ cc سوپرناتانت می‌باشند، در دستگاه سونیکه قرار داده شدند تا سوسپانسیون یکنواخت شود. سپس یک قطره از سوسپانسیون حاوی نانو ذرات نقره به مدت ۵ دقیقه بر روی گریدهای ormvar coated قرار داده شد و اضافی آن با کاغذ صافی گرفته شد. نمونه‌ها پس از خشک شدن کامل با TEM

imaging. *Nanomed-Nanotechnol.* 2012;8(2):147-166.

3. Phillips J, Bowen W, Cagin E, Wang W. Electronic and optoelectronic devices based on semiconducting zinc oxide. In: Pallab B, Roberto F, Hiroshi.K, editors. *Comprehensive Semiconductor Science and Technology.* Elsevier Science. 2011; p.101-127.

4. Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv. Colloid Interfac.* 2009;45:83-96.

5. Jeon HJ, Yi SC, Oh SG. Preparation and antibacterial effects of Ag-SiO₂ thin films by sol-gel-method. *Biomaterials.* 2003;24(27): 4921-4928.

6. Lue JT. A review characterization and physical property studies of metallic nanoparticles. *Phys.Chem. Solids.* 2001;62:1599-1612.

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

8. Hill WR, Argyria-The Pharmacology of Silver Baltimore, Williams & Wilkins. 1939,p.132. Prabu P. G. Selvisabhanayakam V, Mathivanan V, Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles against Bacterial Pathogens from Gut of Silkworm, *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae), *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology;* 2013,3(3): 89-93.

9. Ahmad A, Senapati S, Islam Khan M, Kumar R, Sastry M. Extracellular biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by a novel extremophilic actinomycete. *Thermomonospora sp.* *Langmuir.* 2003, 19: 3550-3553.

10. Bansal V, Rautaray D, Bharde A, Ahire K, Sanyal A, Ahmad A, et al. Fungus-mediated biosynthesis of silica and titania particles. *J. Mater. Chem.* 2005;15: 2583-2589.

11. Torres-Cisneros M, Velasquez-Ordo nez C, Sanchez-Mondragon J, Campero A, Ibarra-Manzano OG, May-Arrijoja DA, et al. Synthesis and optical characterization of Ag nanoparticles. *Microelectronics Journal.* 2009;40: 618 -620.

12. Ghorbani HR. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Escherichia coli*, *ASIAN J CHEM.* 2013;25(3):1247-1249. <http://dx.doi.org/10.14233/ajchem.2013.12805>

13. Gurunathan S, Kalishwaralal K, Vaidyanathan R, Venkataraman D, Pandian SR, Muniyandi J, et al. Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*, *Colloids Surf B.* 2009;74(1): 328-35. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.07.048.

14. Redinbaugh MG, Campbell WH. 'Quaternary structure and composition of squash NADH: nitrate reductase'. *J BIOL CHEM.* 1985;260(6): 3380-5.

15. Smarrelli J, Campbell WH. Heavy metal inactivation and chelator stimulation of higher plant nitrate reductase', *Biochimica et Biophysica Acta.* 1983;742 (3): 435-445.

16. Vaidyanathan R, Gopalram S, Kalishwaralal K, Deepak V, Pandian SR, Gurunathan S. 'Enhanced silver

قابل مشاهده است.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه سنتز نانو ذرات نقره با استفاده از سوپرناتانت باکتری اشیریشیا کولای انجام شد و تأثیر مقادیر مختلف سوپرناتانت باکتری بر سایز نانو ذرات نقره‌ی تولیدی مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت اصلی پژوهش حاضر با پژوهش‌های پیشین، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز به منظور تعیین بهترین ترکیب محیط کشت و در نتیجه بهینه‌سازی فرایند تولید نانو ذرات نقره می‌باشد. با استفاده از نتایج به دست آمده از دستگاه‌های اسپکتروسکپ نوری و دینامیک پراکندگی نور (DLS) مشخص شد که با افزایش میزان سوپرناتانت باکتری سایز نانو ذرات نقره‌ی تولیدی کاهش می‌یابد به گونه‌ای که کمترین طول‌موج در ماکزیمم جذب مربوط به میزان ۲۰ سی‌سی سوپرناتانت می‌باشد. همچنین در نمودارهای دینامیک پراکندگی نور (DLS) نیز کمترین سایز نانو ذرات تولیدی مربوط به میزان ۲۰ سی‌سی سوپرناتانت می‌باشد. همچنین با بررسی غلظت نیترات نقره مشخص شد که افزایش غلظت این ماده موجب افزایش سایز نانو ذرات تولیدی خواهد شد.

عدم بررسی غلظت‌های پایین‌تر محلول نیترات نقره (برای مثال ۰/۰۰۵ مولار)، تغییرات دما و نیز pH بر سایز نانو ذرات نقره‌ی تولیدی از محدودیت‌های این پژوهش به شمار می‌روند. همچنین در مطالعات بعدی می‌توان با جداسازی آنزیم نیترات ردوکتاز از باکتری، به‌طور مستقیم به سنتز نانو ذرات نقره پرداخت و دیگر نیازی به انجام فرایندهای ثانویه به منظور جداسازی نانو ذرات نقره‌ی تولیدی نخواهد بود.

منابع

1. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles. *Nanomedicine: NBM.* 2010;6(2): 257-262.

2. Parveen S, Misra R, Sahoo SK. Nanoparticles: a boom to drug delivery, therapeutics, diagnostics and

nanoparticle synthesis by optimization of nitrate reductase activity', COLLOID SURFACE B. 2010;75(1): 335-41. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.006.

Biosynthesis of silver nanoparticles using *E.coli* bacteria

*Bahareh Khodashenas, Department of Chemical Engineering, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran (*Corresponding author). bahar.khodashenas67@gmail.com

Hamid Reza Ghorbani, Department of Chemical Engineering, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Ehsan Binaeian, Department of Chemical Engineering, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

Abstract

Background: Today, the synthesis of silver nanoparticles is very common due to their many applications in various fields. The synthesis of these nanoparticles is done by means of physical, chemical, or biological methods. However, due to its inexpensive and environmentally friendly features, the biological method is more preferable than the other two methods. Previous research has shown that nitrate reductase enzyme released by microorganisms, is a major factor in the synthesis of silver nanoparticles. In the present paper the effects of nitrate reductase enzyme amount and silver nitrate concentration on nanoparticles synthesis were studied.

Methods: Silver nanoparticles obtained from biosynthesis using *E. coli* supernatant were synthesized. Finally, to be more accurate, Uv-VIS spectrophotometer and dynamic light scattering DLS were applied.

Results: Using Uv-Vis spectrophotometer, wavelengths for silver nanoparticles in concentrations of 0.001M silver nitrate, one with 5 and the other with 20 cc of the bacterial supernatant containing the soluble nitrate reductase enzyme was calculated as 415, and 405 nm, respectively. Also, the climax was seen in 435 nm for 0.01M silver nitrate with 20 cc of the bacterial supernatant. The spectrophotometer determined the silver nanoparticles' sizes for 0.001M containing 5 and 20 cc bacterial supernatant as 74.47, and 45.73 nm, respectively.

Conclusion: The results showed that by increasing the amount of bacterial supernatant containing the soluble nitrate reductase enzyme, the size of produced silver nanoparticles will be smaller. Also, it was found that by increasing the concentration of silver nitrate the size of produced nanoparticles increases.

Keywords: Silver nanoparticles, Biosynthesis, *E.coli*