

مروری بر سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از باکتری‌ها

نسیم ادیب‌پور، مرضیه حسینی‌نژاد*، عباس عابدفر

گروه زیست فناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد

چکیده

نانوذرات نقره به دلیل ویژگی‌های ضد میکروبی ویژه خود مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. گزارشات زیادی مبنی بر سنتز فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی نانوذرات کلوئیدی نقره بویژه سنتز باکتریایی برون و درون سلولی نانوذرات نقره و نیز با استفاده از ترکیبات مشتق شده باکتریایی در دسترس است. ژن‌های مقاومت به نقره، پپتیدها و آنزیم‌های سلولی نقش مهمی در سنتز نانوذرات نقره در باکتری‌ها ایفا می‌کنند. مواد آلی باکتریایی به عنوان پوشش طبیعی و تثبیت‌کننده برای نانوذرات نقره، از تجمع آنها جلوگیری کرده و پایداری آنها را تضمین می‌کنند. نانوذرات نقره‌ای باکتریایی دارای خواص ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بوده و مکانیسم چندگانه‌ای میکروبی این ترکیبات که وابسته به سایز و شکل آنها می‌باشد، دریچه‌ای رو به تولید آنتی‌بیوتیک‌های نوین گشوده است. نظر به ضرورت ابداع و توسعه روش‌های سازگار با محیط زیست مطالعه‌ی حاضر به طور خاص بر سنتز باکتریایی نانوذرات نقره، مکانیسم و کاربردهای آن متمرکز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌ها، سنتز نانوذرات، ضد میکروبی، نانوذرات نقره.

m.hosseininezhad@rifst.ac.ir : ایمیل نویسنده مسئول

۱- مقدمه

به عنوان ترکیبات زیست سازگار کاربردهای درمانی خواهد داشت. اولین مطالعه روی سنتز نانوذرات نقره به واسطه‌ی باکتری‌ها در سال ۱۹۹۹ زمانی که کلاوس و همکارانش تجمع نانوذرات نقره درون سلول‌های سودوموناس استوتزری AG259، یک باکتری ایزوله شده از معادن نقره گزارش کردند، منتشر شد. این باکتری ویژگی زنده ماندن در یک محیط فوق غنی نقره را از خود نشان داد، که ممکن است توضیح محتمل برای تجمع نانوذرات نقره باشد [۵]. پس از آن، تعدادی از باکتری‌های مقاوم به نقره، اعم از گرم مثبت و گرم منفی به منظور سنتز نانوذرات نقره غربالگری شدند [۶ و ۷]. تعدادی از میکروارگانیسم‌های تولید کننده نانوذرات نقره در جدول ۱-۱ و ۲-۱ ارائه شده است.

نقره از زمان‌های قدیم به خاطر خواص ضد میکروبی خود جهت درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد توجه بوده است. اما استفاده از آن به دلیل تأثیرات تداخلی تمک و توسعه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های موثر جدید، کاهش پیدا کرد [۲ و ۳]. این ترکیبات در حال حاضر به عنوان یکی از بهترین نانو مواد تجاری شده، در بیش از ۲۰۰ محصول از علم پزشکی تا مواد غذایی کاربرد دارند [۱]. روش‌های بیولوژیکی سنتز نانوذرات نقره، مانند میکروارگانیسم‌ها [۳] و گیاهان [۴] در مقایسه با سنتز فیزیکی و شیمیایی، به علت استفاده از سوبستراهای غیر سمی، سازگار با محیط زیست و روند سنتز نسبتاً ساده‌تر در دمای محیط، اهمیت ویژه‌ای به دست آورده‌اند. سنتز گیاهی کمتر زمان‌بر بوده ولی نانوذرات نقره‌ی چند پراکنشی به دلیل حضور فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، پلی‌فنول‌ها و همچنین تغییرات فصلی و جغرافیایی، در کاهش یون‌های نقره تولید می‌کنند [۴]. سنتز میکروبی این مواد با چنین تغییراتی روبرو نمی‌شود، اگرچه، نگهداری از کشت و حفظ شرایط استریل در مراحل سنتز نیاز است. با وجود انتشار حجم قابل توجهی از مقالات مختص به سنتز میکروبی، تجزیه و تحلیل انتقادی از اطلاعات موجود در این زمینه هنوز هم دچار فقدان است. بنابراین، مطالعه‌ی مروری پیش رو، سنتز باکتریایی نانوذرات نقره و مکانیسم آن در کنار بهینه‌سازی، ویژگی‌ها و کاربردهای این ترکیبات مورد بحث قرار داده است.

۲- سنتز باکتریایی نانوذرات نقره

طبیعت، فرایندهای مختلف برای سنتز مواد معدنی در مقیاس کوچک ابداع کرده است. نانوذرات طی سنتز بیولوژیکی، در سیستم‌های زیستی باکتریایی، قارچی و گیاهی تولید می‌شوند که

جدول ۱-۱: باکتری‌های گرم مثبت سنتز کننده نانوذرات نقره	
Bacteria	Ref
<i>Bacillus</i> sp.	[۱۷]
<i>Brevibacterium linens</i>	[۱۸]
<i>Bacillus flexus</i>	[۱۹]
<i>Bacillus licheniformis</i> Dahb1	[۲۰]
<i>Bacillus subtilis</i>	*
<i>Brevibacterium casei</i>	*
<i>Bacillus thuringiensis</i>	*
<i>Corynebacterium</i> SH09	*
<i>Enterococcus faecalis</i>	*
<i>Exiguobacterium</i> sp.	*
<i>Lactobacillus mindensis</i>	*
<i>Lactobacillus</i> sp.	*
<i>Pedococcus pentosaceus</i>	*
<i>Rhodococcus</i> sp.	*

۳-۱- سنتز با استفاده از توده‌ی زیستی (بیوماس)

در معرض نمک‌های نقره، نانوذرات نقره تولید می‌کنند. دو مسیر احتمالی برای آن وجود دارد: الف) مولکول‌های زیستی رها شده در محیط خارج توسط باکتری‌ها به کاهش یون‌های نقره در محیط و تبدیل آن‌ها به نانوذرات نقره کمک می‌کند و یا ب) نانوذرات نقره شکل گرفته در داخل سلول به بیرون ترشح می‌شوند. چنین سنتزی با استفاده از هر دو توده‌ی باکتری زنده و خشک شده نشان داده شده است [۸]. نانوذرات نقره خارج سلولی ممکن است متصل به دیواره سلولی باکتریایی باقی بمانند که به یک فراصوت ملایم برای بازیابی آن نیاز است. برای تولید نانوذرات نقره‌ی باکتریایی بیشتر استفاده از نمک نیترات نقره و پس از آن سولفید نقره (Ag_2S) و اکسید نقره (Ag_2O) گزارش شده‌اند [۹]. پاریخ و همکاران در سال ۲۰۱۱ وابسته به جنس بودن سنتز نانوذرات نقره را در تولید نانوذرات کریستالی در جنس مورگانلا مشاهده کرده، در حالی‌که اعضای مشابه در خانواده انتروباکتریاسه، از جمله اشرشیاکلی، سالمونلا تیفی موریوم، کلبسیلا پنومونیه و سراسیا قادر به سنتز نانوذرات نقره نبودند، گزارش کردند.

۳-۲- سنتز با استفاده از مایع رویی (سوپرناتانت) کشت

مایع رویی کشت باکتریایی، که طی ۴۸-۲۴ ساعت رشد کرده، در شرایط استریل نگه داشته شده و در شرایط مناسب پس از قرار گیری در معرض نمک نقره جهت سنتز نانوذرات نقره انکوبه می‌شود. حتی گزارش شده است که تابش مایکروویو به سوپرناتانت کشت تکمیل شده با نقره منجر به تولید نانوذرات نقره می‌شود. در واقع مایع رویی کشت از مواد مغذی موجود در محیط کشت و مولکول‌های آلی ترشح شده از باکتری‌ها در طول رشد آن‌ها تشکیل شده و منبعی ایده‌آل برای کاهش یون‌های نقره به نانوذرات نقره را تشکیل می‌دهد. با این حال، باید توجه داشت که سنتز نانوذرات نقره از مایع رویی کشت قادر است از پراکندگی کلونیدی، ویژگی‌ها، بازیابی و در عین حال کاربردهای قلمداد شده برای آن جلوگیری کند [۲].

۳-۳- سنتز با استفاده از عصاره عاری از سلول

با در نظر گرفتن مشکل ذکر شده در بالا با توده‌ی زیستی و مایع رویی کشت، روشی جایگزین با نام به کارگیری عصاره عاری از سلول باکتریایی برای سنتز خارج سلولی نانوذرات نقره معرفی شد. در این روش، زیست توده‌ی باکتریایی مجدداً در آب مقطر برای یک بازه‌ی زمانی مشخص از ۱ تا ۳ روز به شکل سوسپانسیون در آورده می‌شوند. عصاره عاری از سلول که پس از سانتریفیوژ و یا عبور از فیلتر غشائی جمع آوری شده، در شرایط بهینه جهت تولید نانوذرات نقره در معرض نمک نقره قرار می‌گیرند [۳]. ثابت شده است که تابش خورشیدی و اشعه مایکروویو به عصاره عاری از سلول منجر به تسریع سنتز نانوذرات نقره می‌شود. این روش، حذف کامل زیست توده

<i>Staphylococcus epidermidis</i>	*
<i>Streptococcus thermophiles</i>	*
<i>Thermoactinomyces</i> sp.	*
<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	*
<i>Actinobacteria</i>	
<i>Nocardiopsis</i> sp.	*
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	*
<i>Archaeobacteria</i>	
<i>Halococcus salifodinae</i>	*

[۲] *

۳-۳- سنتز برون سلولی

سنتز برون سلولی نانوذرات خارج از سلول باکتریایی اتفاق می‌افتد. این نانوذرات دارای شکل‌های متنوع از جمله بیضوی، گرد، مکعبی، شش ضلعی، مثلثی و غیره، با استفاده از سلول‌ها، مایع رویی (سوپرناتانت) کشت و عصاره‌ی آبی عاری از سلول سنتز می‌شوند. روش‌های سنتز خارج سلولی دارای مزایایی در مقایسه با نوع درون سلولی هستند که مهم‌ترین آن امکان بازیابی آسان نانوذرات از محلول است. بازیابی این ترکیبات معمولاً به شکل یک رسوب گلوله مانند که قادر است مجدداً در حلال مناسب پراکنده گردد، توسط سرعت بالای سانتریفیوژ (۲۰۰۰۰ rpm -۱۰۰۰۰) محلول حاوی نانوذرات انجام می‌شود [۲].

جدول ۱-۲: باکتری‌های گرم منفی سنتز کننده نانوذرات نقره

Bacteria	Ref
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	*
<i>Aeromonas</i> sp.	*
<i>Bordetella</i> sp.	*
<i>Enterobacter aerogenes</i>	*
<i>Escherichia coli</i>	*
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	*
<i>Gluconobacter roseus</i>	*
<i>Idiomarina</i> sp.	*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	*
<i>Morganella</i> sp.	*
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	[۲۱]
<i>Proteus mirabilis</i>	*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*
<i>Pseudomonas putida</i>	[۲۲]
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	*
<i>Salmonella typhimurium</i>	*
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	*
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	*
<i>Vibrio alginolyticus</i>	*
<i>Vibrio cholerae</i>	[۲۱]
<i>Xanthomonas oryzae</i>	*
<i>Yersinia enterocolitica</i>	*
<i>Cyanobacteria</i>	
<i>Anabaena flos-aquae</i>	*
<i>Calothrix pulvinata</i>	*
<i>Microcoleus</i> sp.	*
<i>Oscillatoria willei</i>	*
<i>Plectonema boryanum</i>	*

میکروها در طبیعت با فلزات و شبه فلزات از انواع مختلف مواجه می‌شوند و برخی از مکانیسم‌های ژنتیکی و زیست-شیمیایی، مقاومت در برابر فلزات را جهت زنده ماندن به دست می‌آورند. برخی از این مکانیسم‌ها شامل رسوب خارج سلولی، اتصال و تشکیل کمپلکس خارج سلولی، تفکیک به ترکیبات پیچیده توسط مولکول‌های حاوی تیول، رسوب درون سلولی، تغییر در حلالیت و سمیت با تغییر پتانسیل اکسیداسیون-احیا یون‌های فلزی، سیستم پمپاژ جریان سلولی و فقدان سیستم انتقال فلزی مخصوص می‌باشند. برای بسیاری از فلزات، ایجاد این مقاومت و هموستاز شامل ترکیبی از مکانیسم‌های ذکر شده در بالا می‌باشد. مقاومت به یون‌های نقره در اشرشیاکلی، انتروباکتر کلوآکه، سودوموناس استوتزری و اسپینتوباکتر باثومانی مشاهده شده است. جالب توجه است که سودوموناس استوتزری AG259 تجمع درون سلولی یون‌های نقره به صورت نانوذرات نقره را نشان می‌دهد، در حالی‌که موتانت باکتری اشرشیاکلی مقاوم به نقره یک جریان فعال از یون‌های نقره نشان می‌دهد. این امر می‌تواند کاهش یون‌های فلزی به فلز عنصری از طریق ماشین سلولی را شامل شود [۲]. هر چند مکانیسم دقیق سنتز نانوذرات هنوز به درستی شناخته نشده است، فرضیه‌های مختلفی برای روشن کردن نقش ژن‌ها و پروتئین‌های باکتریایی در سنتز نانوذرات نقره ارائه شده است.

۴-۱- ژنتیک سنتز نانوذرات نقره

تجمع یون‌های نقره ممکن است در دو مرحله اتفاق بیفتد: الف) اتصال غیر اختصاصی و مستقل از انرژی به سطح سلول و ب) تجمع درون سلولی. باکتری اسپینتوباکتر باثومانی به سبب داشتن پلاسمید واسطه حاوی ژن مقاومت به نقره، قادر به جمع آوری نقره درون سلول و حفظ آن توسط اتصال به متالوپروتئین غنی از سیستئین می‌باشد [۲]. سه ژن اصلی همولوگ به نام‌های *silE*، *silP* و *silS* از سیستم مقاومت به نقره که نقش مهمی در تولید نانوذرات نقره ایفا می‌کنند، پیشنهاد شده‌اند [۶]. ژن‌های همولوگ اتصال به نقره (*silE*) کد کننده یک پروتئین پری-پلاسمیک متصل شونده به نقره می‌باشند که مسئول دریافت نقره بوسیله حضور جایگاه‌های هیستیدین جهت اتصال به یون نقره است. در معرض یون‌های نقره، دستگاه اتصال به نقره باکتریایی بر اساس *silE* به سبب ورود یون‌های نقره به درون سلول فعال می‌شود. یون‌ها به سیستم کاهش نقره باکتریایی ارائه داده می‌شوند، محلی که در آن مولکول‌های زیستی تولید شده توسط این سیستم به یون‌ها اتصال یافته و آن‌ها را به هسته‌ی فلزی نقره یا دانه‌های نانوذره کاهش می‌دهند. این ذرات به فرم‌های مختلف (کروی یا بشقاب مانند) شکل گرفته و به دنبال جریان سلولی از سلول خارج می‌شوند [۱۲]. باکتری‌ها متناوباً در طول رشد خود پروتئین‌های ویژه‌ی نقره با سیستم مقاومت به نقره ایجاد کرده و به فضای خارج سلولی ترشح می‌کنند. این پروتئین‌ها می‌توانند یون‌های نقره را متعاقباً به فرم پایدار نانوذرات نقره شکل دهند [۶]. مطالعات بیشتری برای کشف نقش دقیق ژن‌های *silP* و *silS* در تولید نانوذرات نقره مورد نیاز است.

باکتریایی و ترکیبات محیط کشت را از طریق شستشوی مکرر تضمین می‌کند و این امکان را فراهم می‌کند که سنتز نانوذرات تنها از طریق مولکول‌های زیستی آلی رهاسازی شده توسط سلول‌ها در محلول آبی به دلیل شرایط گرسنگی یا توسط هضم خودبخودی، انجام شود. علاوه بر این، هیچ فرآیند تکمیلی برای بازیابی نانوذرات مورد نیاز نیست.

۴-۲ سنتز درون سلولی

کاهش یون‌های فلزی توسط سلول‌های باکتریایی به فرم نانو، یکی از استراتژی‌های بقاء یعنی تبدیل یون‌های فلزی سمی به فرم غیر سمی آنهاست [۵]. برای سنتز درون سلولی، سلول‌های باکتریایی به محیط کشت حاوی نمک نقره افزوده شده و در شرایط مناسب رشد گرمخانه‌گذاری می‌شوند. جهت جلوگیری از ویژگی ممانعتی ترکیبات محیط کشت، سلول‌های رشد یافته همچنین می‌توانند پیش از قرارگیری در معرض نمک نقره مجدداً در آب مقطر به شکل سوسپانسیون درآیند. سایز نانوذرات نقره درون سلولی به محتوی و مقدار محیط کشت به کار رفته برای رشد سلول‌ها بستگی دارد. نشان داده شده است که استنوباکتر سازگاری زیستی با نانوذرات فلزی خود نشان می‌دهد، هر چند، قرارگیری در معرض مستمر نمک فلز تعداد سلولی آنها را کاهش می‌دهد [۱۰]. ممکن است زیست مولکول‌های خود باکتری که سطح نانوذرات را می‌پوشانند آنها را برای میزبان غیر سمی سازند. روش سنتز درون سلولی نیازمند مراحل اضافی جهت بازیابی نانوذرات تجمع یافته از سلول بوده و در نتیجه کمتر ترجیح داده می‌شود. فرارگیری سلول‌های باکتریایی در معرض امواج فراصوت رایج‌ترین تکنیک برای بازیابی نانوذرات نقره می‌باشد. علاوه بر این، تیمار حرارتی مانند اتوکلاو کردن و استفاده از مواد شوینده و نمک‌ها نیز می‌توانند جهت فروپاشی سلول‌ها مورد استفاده قرار گیرند [۲].

برخی از باکتری‌ها توانایی تولید خودبخودی نانوذرات نقره به هر دو صورت درون و برون سلولی را دارند. این امر شامل گونه لاکتوباسیلوس، گونه آئروموناس SH10، ویبریو آگینولیتیکوس و سیانوباکترها مانند پلکوتوما پرویانوم UTEX485، کالوتریس پولویناتا و آناپائنا فلاس-آکوا. برخی باکتری‌ها، در کنار تجمع درون سلولی نانوذرات نقره، ترشح نانوذرات به محیط بیرونی انجام می‌دهند [۲].

۵- سنتز با استفاده از ترکیبات مشتق شده از باکتری‌ها

میکروارگانیزم‌ها به عنوان منبع خوبی از سورفاکتانت‌های زیستی با مزایایی مانند تجزیه‌پذیری زیستی، سمیت کمتر و سازگاری زیستی بیش از همتایان شیمیایی خود خدمت می‌کنند. سورفاکتانت‌های زیستی باکتریایی به دلیل افزایش سرعت سنتز و عملکرد به عنوان عامل پایدار کننده جهت سنتز نانوذرات نقره به کار برده می‌شوند [۱۱]. آنزیم باکتریایی، اگرزوپلی‌ساکاریدها، تاژک‌های بومی و دوباره پلیمریزه شده، رنگدانه اکتینورودین و اسپورهانیز برای سنتز نانوذرات نقره گزارش شده است [۲].

۶- مکانیسم سنتز نانوذرات نقره

۲-۶- نقش دیواره سلولی

دیواره سلولی باکتری‌ها نیز نقش عمده‌ای در پیدایش نانوذرات به علت دخالت اجزای دیواره سلولی و آنزیم‌ها ایفا می‌کند. شکل‌گیری هسته از خوشه‌های یون‌های نقره در مرحله اول سنتز نانوذرات نقره، باعث یک واکنش الکتریکی بین یون‌ها و گروه‌های کربوکسیلات دارای بار منفی موجود در دیواره سلولی می‌شوند. یون‌های نقره به دام افتاده در سطح باکتری توسط ردوکتازهای سلولی و سایر پروتئین‌های اکسید و احیاء رها شده از سلول برای تشکیل نانوذرات نقره کاهش می‌یابند [۹]. لایه S باکتریایی به طور فیزیکی صفحات پتیدوگلیکان دیواره سلولی را دارای بار منفی می‌کند و همچنین می‌تواند در برهمکنش سطحی باکتری‌های فلز را شرکت داشته باشند [۷]. مکانیسم بالقوه دیگر در سراسر دیواره سلول باکتریایی با استفاده از پتانسیل الکتروکینتیک از طریق تولید نیروی به دست آمده از شیب انتقال پروتون غشائی، اعطا شده است. این شیب به طور غیر مستقیم قادر است نقل و انتقال فعال سدیم را همراه با یون‌های نقره از محیط اطراف سلولی انجام دهد [۷]. از آنجا که نانوذرات نقره به هر دو صورت درون و برون سلولی تولید می‌شوند، نقش دهنده الکترون درون سلولی و سیستم انتقال غشایی باید برای توضیح دقیق مکانیسم سنتز مورد بررسی قرار گیرد.

۳-۶- آنزیم‌ها و عوامل احیاء کننده

سیستم کاهنده نقره شامل فرایند آنزیمی کاهش نقره از طریق نقل و انتقالات الکترونی می‌باشد. NADH تشکیل شده در طول گلیکولیز باکتریایی و زنجیره انتقال الکترون از طریق واکنش-های انرژی‌زا، یک محیط احیاء سلولی بوجود می‌آورد که به سبب آن اتم‌های هیدروژن برای سنتز نانوذرات نقره هدایت می‌شوند. آنزیم‌های وابسته به NADH به خصوص نیترات ردوکتاز، نقش مهمی در سنتز نانوذرات نقره دارند. یون‌های نیترات مربوط به نمک نیترات نقره آنزیم نیترات ردوکتاز را تحریک می‌کنند. آنزیم از NADH الکترون به دست می‌آورد و آن را به NAD^+ اکسید می‌کند و سپس جهت احیاء یون‌های نقره به نانوذرات نقره، متحمل اکسیداسیون می‌شود. علاوه بر آن، یون‌های نیترات نقره (NO_3^-) به دی‌اکسید نیتروژن (NO_2) و پیرو آن به اکسید نیتروژن (NO) و نیتروس اکساید (N_2O) و در نهایت به گاز نیتروژن (N_2) تبدیل می‌شوند [۲]. اگرچه، گاید هانی و همکاران در سال ۲۰۱۳ سنتز نانوذرات نقره غیر مستقل از احیاء نیترات دراستنوباکت‌ها گزارش کردند. آنزیم‌های احیاء کننده نوع نیتروژناز و هیدروژناز موجود در سیانوباکت‌ها قادرند یون‌های نقره را به نانوذرات نقره احیاء کنند. غلظت نیتروژنازهای سلولی تعیین کننده سایز نانوذرات نقره می‌باشند، که در آن غلظت بالاتر در هتروسیت‌ها منجر به تشکیل سریع نانوذرات نقره با سایز بزرگتر در نزدیکی دیواره سلولی شده و محتوای حدواسط تشکیل نانوذرات کلونیدی کوچک و غیر مجتمع را می‌دهد. NfsA، یک نیتروژدوکتاز غیر حساس به

اکسیژن موجود در انتروباکتریاسه نیز به عنوان کاهنده یون-های نقره به نانوذرات نقره پیشنهاد شده است [۱۳]. pH و فشار جزئی بالای گاز هیدروژن فاکتورهای مهم در تولید نانوذرات نقره به واسطه باکتری‌ها می‌باشند. pH بالا خاصیت احیاء کنندگی آنزیم‌های اکسید و احیاء را فعال می‌کند [۱۴]. در کنار آن، سیستم‌های گلوکاتایون و تیوردوکسین برای حفظ غیر مستقیم شرایط احیاء و تنظیم فعالیت آنزیم‌ها اهمیت دارند. کوفاکتورهای احیاء کننده تولید شده توسط فعالیت انواع مختلفی از آنزیم‌های مرتبط با اسپور، مانند گلوکز اکسیداز، آلکالاین فسفاتاز، لاکتاز و کاتالاز، می‌توانند سنتز زیستی نانوذرات نقره را تحریک کنند [۲]. لیو و همکاران در سال ۲۰۱۲ اعلام کردند که برای غلبه به تنش فلزی، گلوکوناستوباکتر زایلینوم از سیتوپلاسم خود یون‌های کلر ترشح کرده و ردوکتازهایی جهت احیاء زیستی یون‌های نقره و تشکیل نانوذرات نقره و کلرید نقره به عنوان محصول جانبی، تولید می‌کنند.

۴-۶- پتیدها

پس از آنکه نایک و همکاران در سال ۲۰۰۲ تشکیل نانوذرات نقره را با استفاده از پتیدهای متصل شونده به نقره نشان دادند، پتیدها برای سنتز و پایدار کردن نانوذرات نقره مورد توجه بسیاری قرار گرفتند. پتیدها در تعامل با فرم اولیه نانو خوشه‌های نقره در محلول و ایجاد یک فضای احیاء کننده در اطراف آنها منجر به احیاء یون‌های نقره و شکل‌گیری نانوذرات با سایزهای متفاوت می‌شوند. پتیدها حاوی اسیدهای آمینه مانند آرژینین، سیستئین، لایزین، متیونین، گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید هستند که در شناسایی و احیاء یون‌های نقره به کریستال-های نقره، دخالت دارند. شرایط فیزیولوژیکی نیز نقش مهمی در تعیین برهمکنش‌های بین سطحی فلز-پتید ایفا می‌کند. برای مثال، تیروزین تحت شرایط قلیایی در جریان یونیزاسیون گروه فنولی، به ساختار نیمه کوئینون تبدیل شده که منجر به احیاء یون‌های نقره می‌گردد. تریپتوفان در pH بالا به رادیکال تریپتوفیل ناپایدار تبدیل شده که با دادن الکترون، یون‌های نقره را احیاء می‌کند. پتیدهای دارای پل‌های دی‌سولفیدی نیز می‌توانند برای سنتز نانوذرات نقره پوشش داده شده با پتید مورد استفاده قرار گیرند [۲].

۷- بهینه سازی

اگرچه روش‌های بیولوژیکی به عنوان روش‌های ایمن و سازگار زیستی شناخته شده‌اند، اما کنترل شکل ظاهری نانوذرات تشکیل شده دشوار است [۱۰]. در روش‌های شیمیایی تنها یک عامل احیاء کننده مسئول احیاء یون‌های فلزی به نانوذرات می‌باشد، و علاوه بر آن، به راحتی می‌توان به نانوذراتی با اندازه یکنواخت دست یافت. از طرف دیگر، در سنتز باکتریایی فاکتورهای زیادی مانند آنزیم‌ها، اسیدهای آمینه، ترکیبات محیط کشت، کوفاکتورها و غیره به اشکال مختلفی با یون‌های فلزی واکنش داده و نانوذراتی با اندازه متفاوت و غیریکنواخت تشکیل می‌دهند. هر چند، پیش‌تر نشان داده شد که شکل ظاهری

جهت غوطه‌وری آنها تشکیل می‌دهند، بنابراین از تجمع آنها جلوگیری کرده و پایداری طولانی‌تری فراهم می‌آورند [۳].

۱۰- کاربردهای نانوذرات نقره

ویژگی ضد میکروبی نانوذرات نقره به خوبی مستند شده و به طور گسترده در صنایع بهداشتی، پوشش نساجی، ماسک‌های جراحی، باند، مواد ضد عفونی‌کننده، تصفیه آب و دیگر برنامه‌های زیست محیطی، مورد استفاده قرار می‌گیرد. در کنار آن، استفاده از نانوذرات نقره سنتز شده به روش شیمیایی در نورسنجی، سنسورهای زیستی، تجزیه و تشخیص گزارش شده است. با وجود کاربرد در زمینه‌های متعدد، تاکنون تنها نوع محدودی از کاربردها برای نانوذرات نقره‌ی باکتریایی مورد ارزیابی قرار گرفته است [۲].

۱۰-۱- فعالیت ضد میکروبی

نانوذرات نقره‌ی باکتریایی به طور گسترده‌ای برای فعالیت ضد میکروبی در مقابل دامنه‌ی وسیعی از میکروارگانیسم‌ها اعم از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت، قارچ‌ها، مخمرها و بیوفیلم‌های میکروبی مورد آزمون قرار گرفته‌اند [۲]. روش‌های متنوعی جهت ارزیابی ممانعت از فعالیت میکروب‌ها در مواجهه با نانوذرات نقره وجود دارد. این روش‌ها عبارتند از تعیین (الف) منطقه‌ی ممانعت از رشد توسط انتشار دیسک و انتشار از چاهک، (ب) حداقل غلظت بازدارندگی بوسیله‌ی آزمون رقیق‌سازی در محیط مایع، (ج) حداقل غلظت غیر فعال سازی میکروبی، (د) الگوی رشد و (ه) منحنی زمان کشندگی [۲]. در این میان، تکنیک‌های انتشار غالباً ترجیح داده می‌شوند. روش‌های منحنی رشد و زمان کشندگی در مطالعات نانوذرات نقره‌ی باکتریایی به ندرت مورد استفاده قرار می‌گیرند.

در مهار رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در مواجهه با نانوذرات نقره معمولاً افزایش وابسته به غلظت مشاهده می‌شود؛ با این حال، پاسخ گونه‌های مختلف، بسته به نوع گونه، مورفولوژی نانوذرات نقره، حساسیت ذاتی میکروارگانیسم و ترکیب دیواره‌ی سلولی که به عنوان مانعی برای نفوذ نانوذرات نقره عمل می‌کند، متفاوت است. پورعلی و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره‌ی سنتز شده توسط باکتری‌ها پس از حرارت در ۱۰۰ تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت، کاهش می‌یابد. دلیل محتمل، تجمع نانوذرات پس از تیمار حرارتی بود که افزایش سایز نانوذرات نقره منجر به کاهش قابلیت نفوذپذیری آن‌ها گردید. اثر افزایش نانوذرات نقره‌ی باکتریایی بر فعالیت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌ها نیز با افزایش تغییرات درون گروهی در درجه‌ی سینترژیسم، مشاهده شده است [۱۳]. این امر بستگی به برهمکنش میان نانوذرات و آنتی‌بیوتیک استفاده شده و میکروارگانیسم بیماری‌زای مورد آزمون دارد. نقاط شکست حداقل غلظت بازدارندگی که در دستورالعمل‌های CLSL برای اولین بار ارائه شده‌اند، مقاومت و حساسیت میکروارگانیسم‌ها در مواجهه با آنتی‌بیوتیک‌ها را معرفی می‌کنند و مهم است که قدرت آنتی‌بیوتیک مد نظر قرار گیرد. جالب توجه است که باکتری اسپینتوباکتر باثومانی AHMS7 که به ۱۰ مورد از ۱۴

نانوذرات نقره‌ی باکتریایی می‌تواند از طریق تنظیم پارامترهای فیزیکوشیمیایی متنوع دیگر مانند سن کشت، غلظت یون‌های نقره، دما و زمان گرمخانه‌گذاری کنترل شود و امکان تولید نانوذرات نقره با سایز کنترل شده از طریق بهینه‌سازی ترکیبی از فاکتورهای ذکر شده، وجود دارد. این فاکتورها بر بازده نانوذرات نقره نیز تأثیر می‌گذارند [۳]. فاکتورهای دیگر موثر بر مورفولوژی و بهره‌وری نانوذرات نقره موثرند شامل مقدار تلقیح، نوع محیط کشت، pH، تقویت‌کننده‌ها و غیره می‌باشند. هر دو عامل بهینه‌سازی تک فاکتوری و روش پاسخ سطح آماری، برای به دست آوردن نانوذرات نقره با اندازه کنترل شده و به حداکثر رساندن عملکرد سنتز اتخاذ شده‌اند [۹].

۸- تکنیک‌های ارزیابی نانوذرات

تشخیص اولیه‌ی سنتز در یک محیط آزمایشگاهی معمولاً با مشاهده‌ی بصری تغییر رنگ ایجاد شده، انجام می‌شود. محیط واکنش در طول سنتز نانوذرات نقره به قرمز متمایل به قهوه‌ای یا قهوه‌ای تغییر می‌یابد [۳ و ۱۳]. تغییر رنگ از بنفش تا قهوه‌ای تیره برای نانوذرات هسته طلا و پوسته نقره در نسبت‌های مولاریته‌ی مختلف از AuCl_4 و AgNO_3 مشاهده شده است [۱۵]. با این حال، تکنیک‌های آنالیزی متنوعی مانند اسپکتروفتومتری مرئی-ماوراء بنفش، FTIR، آنالیز توسط انرژی متفرق اشعه X، پراش اشعه X، میکروسکوپ الکترونی، میکروسکوپ نیروی اتمی، پراکندگی نور دینامیکی و پتانسیل زتا معمولاً برای اندازه‌گیری ویژگی‌های سطحی، ترکیبات، خلوص، پایداری و مورفولوژی نانوذرات مورد استفاده قرار می‌گیرند. تکنیک‌های دیگر برای تشخیص نانوذرات شامل طیف سنجی جذب اتمی، طیف سنجی فوتوالکترون اشعه X، روش فعال سازی نوترونی و تجزیه و تحلیل حرارتی می‌باشند [۲].

۹- ویژگی‌های نانوذرات نقره

این امر به خوبی شناخته شده که خواص نانو مواد کاملاً از هم‌تایان توده‌ای و بزرگ اندازه‌ی خود متمایز هستند. نانوذرات، تک و یا چند فلزی، دارای ویژگی‌های منحصر به فرد فیزیکی، شیمیایی، نوری، دی الکتریک، حرارتی، مکانیکی، کاتالیزوری و بیولوژیکی به سبب ترکیب و خصوصیات وابسته به سایز آنها می‌باشند. با این حال، در سنتز باکتریایی نانوذرات نقره، تمرکز اصلی بیشتر بر روی پایداری کلئیدی آنها می‌باشد.

پایداری نانوذرات می‌تواند به هر دو طریق پایداری الکترواستاتیک یا پایداری پلیمریک به دست آید. پایداری الکترواستاتیک بر اساس تشکیل لایه‌ای باردار در سطح نانوذرات بواسطه‌ی جذب گروه‌های یونی حاضر در محیط می‌باشد، در نتیجه یک نیروی دافعه میان یکدیگر ایجاد می‌کنند. این امر اجازه نمی‌دهد که تجمع ذرات اتفاق بیفتد. تجمع نانوذرات نقره در طول زمان یکی از مشکلات رایج در روش‌های سنتز شیمیایی است؛ بنابراین، پایدار کننده‌هایی مانند پلی وینیل پیرولیدون، آمونیاک، سیترات، ژلاتین، سلولز و نشاسته به سیستم اضافه می‌شوند [۲]. در سنتز باکتریایی، سلول ترکیبات آلی طبیعی در قالب پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های زیستی از خود ترشح می‌کند. این عوامل نانوذرات را پوشش داده و یا ماتریکسی آلی

نقره منجر به کاهش توده زیستی میکروبی و بقای سلولی و همچنین ممانعت از تولید آگزوپلی ساکارید پروتئین می‌شود [۸].

۱۱- نتیجه‌گیری و چشم‌انداز آینده

باکتری‌ها به عنوان انتخابی مناسب برای بیوسنتز نانوذرات نقره از طریق سلول‌ها، سوپرناتانت (مایع رویی) و عصاره آبی به خدمت گرفته می‌شوند. نانوذرات چند فلزی با توجه به ارتقاء خواص مبتنی بر ترکیب و کاربردهای موثر آنها دارای مزایای بیشتری هستند. با این وجود، نانوذرات چند فلزی سنتز شده بواسطه باکتری‌ها به ندرت مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. علاوه بر این، در حال حاضر تمام آزمایشات انجام شده در مقیاس آزمایشگاهی بوده و از این رو، ضرورت دارد که بر روی روش‌هایی جهت تولید انبوه این ترکیبات تحقیقاتی صورت گیرد. اگر چه مکانیسم سنتز درون و برون سلولی هنوز به درستی شناخته نشده است، سیستم مقاومت به نقره نقش بسیار مهمی در سنتز زیستی نانوذرات نقره در باکتری‌ها ایفا می‌کند. در سلول باکتری چندین مسیر انتقال الکترون برای احیاء یون‌های نقره وجود دارد، که این مسیرها برای عملکرد خود نیاز به مشارکت سایر آنزیم‌ها و کوفاکتورهای احیاء کننده دارند. مشخص شده است که نانوذرات نقره با اندازه کوچک، قدرت ضد میکروبی بیشتری به دلیل نسبت بالای سطح به حجم از خود نشان می‌دهند، هر چند تا کنون مطالعه‌ای وابسته به اندازه ذرات نانوذرات نقره‌ای باکتریایی انجام نشده است. علاوه بر این، فعالیت ضد قارچی و ضد ویروسی این نانوذرات نیز نیاز به بررسی دارد. همچنین بسیاری از کاربردهای مهم که در رابطه با نانوذرات نقره سنتز شده شیمیایی، مانند ویژگی ضد عفونی کنندگی، استفاده به عنوان سنسور و کاتالیزوری گزارش شده است، تا کنون برای نانوذرات نقره باکتریایی مورد مطالعه قرار نگرفته است.

۱۲- منابع

1. L, Sintubin; W, Verstraete; N, Boon; Biologically produced nanosilver: current state and future perspectives. *Biotechnology Bioengineering*. 109: 2422-2436, 2012.
2. R, Singh; VU, Shedbalkar; SA, Wadhvani; BA, Chopade; Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism and applications. *Applied Microbiology Biotechnology*. 99: 4579-4593, 2015.
3. R, Singh; P, Wagh; S, Wadhvani; S, Gaidhani; A, Kumbhar; J, Bellare; BA, Chopade; Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *International Journal of Nanomedicine*. 8: 4277-4290, 2013.
4. GR, Salunkhe; S, Ghosh; RJ, Santoshkumar; S, Khade; P, Vashisth; T, Kale; S, Chopade; V, Pruthi; G, Kundu; JR, Bellare; BA, Chopade; Rapid efficient synthesis and characterization of silver, gold and bimetallic nanoparticles from the medicinal plant *Plumbago zeylanica* and their

آنتی‌بیوتیک مورد استفاده مقاومت نشان داده بود، در حضور نانوذرات نقره به ۷ مورد از آنها حساس شد. اثر هم‌افزایی آنتی-بیوتیک و نانوذرات نقره چنان عمیق بود که شاخص‌های حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت باکتری‌کشی را تا ۲۰۰۰ برابر کاهش داد [۳]. چنین مطالعاتی در میان وجود نگرانی برای مقاومت میکروارگانیسم‌ها به ترکیبات ضد میکروبی، اهمیت دارند.

بر خلاف آنتی‌بیوتیک‌های تجاری، نانوذرات نقره تأثیرات خود را تنها در یک زمینه‌ی خاص نشان نمی‌دهند. ترکیبی از مکانیسم‌ها مانند اختلال در مورفولوژی سلولی، غیر فعال‌سازی آنزیم‌های حیاتی سلول و پروتئین‌ها، تغلیظ DNA، از بین رفتن همانندسازی DNA، کاهش ATP، واسرشت پروتئین، ممانعت از برهم‌کنش ریبوزوم، تجمع در سلول تا حد غلظت کشنده، تولید اکسیژن فعال، تنش اکسیداتیو و تعدیل پیام‌رسانی سلولی [۲] اشاره داشته و نانوذرات نقره را برای هدف قرار دادن طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها ایده‌آل می‌سازد. این امر همچنین نشان می‌دهد که میکروپها برای محافظت از خود در برابر نانوذرات نقره مجبور به توسعه‌ی همزمان تعداد جهش‌ها خواهند شد. ترکیبی از نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک‌ها سمیت هر دو آنها را در برابر سلول‌های انسانی بواسطه‌ی کاهش مقدار مصرفی مورد نیاز و افزایش ویژگی‌های ضد میکروبی، کاهش می‌دهد. علاوه بر این، چنین ترکیباتی توانایی آنتی-بیوتیک‌هایی که باکتری‌ها در برابر آنها مقاومت پیدا کرده بودند را باز می‌گردانند [۳]. بنابراین رویکردی متفاوت در استفاده از نانوذرات نقره‌ای باکتریایی به تنهایی یا بطور ترکیبی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی نوین موثر در برابر بیماری‌زاهای مقاوم می‌توان عمل کنند. با این حال، مراقبت‌هایی برای جلوگیری از قرار گیری مداوم میکروارگانیسم‌ها در برابر این نانوذرات باید انجام گیرد چرا که مطالعه بر روی اشرشاکلی نشان داد که در اثر قرار گیری مداوم باکتری برای ۲۲۵ نسل متوالی در معرض نانوذرات نقره از طریق جهش‌های ژنتیکی به این مواد مقاومت پیدا کند [۱۶].

۱۰-۲- فعالیت ضد بیوفیلم

بیوفیلم یک ساختار کنسرسیوم تولید شده توسط باکتری و در واقع یک ماتریکس هیدراته متشکل از پروتئین‌ها، DNA و پلی-ساکاریدهاست. بیوفیلم‌ها در فرورفتگی‌های دستگاه‌های پزشکی می‌چسبند و منجر به عفونت‌های مزمن و آسیب بافتی می‌شوند. مهم است بدانیم که بیش از ۸۰ درصد عفونت‌های میکروبی در انسان بواسطه‌ی بیوفیلم‌ها ایجاد می‌شود [۲]. این امر مقاومتی ۱۰۰۰ برابر بیشتر از آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌دهد و بنابراین به عنوان یک مشکل در پزشکی مطرح است. یکی از استراتژی‌های امیدوار کننده برای مقابله با بیوفیلم استفاده از نانوذرات نقره است که می‌تواند به درون بیوفیلم نفوذ کرده و از این طریق آن را ریشه‌کن سازد. مهار تشکیل بیوفیلم و ایجاد اختلال در بیوفیلم‌های شکل گرفته می‌تواند با به کارگیری نانوذرات باکتریایی به دست آید. قرارگیری در معرض نانوذرات

Staphylococcus aureus and *Escherichia coli*. Nanomedicine. 3: 168–171, 2007.

14. K, Prasad; AK, Jha. K, Prasad; AR, Kulkarni; Can microbes mediate nano-transformation? Indian Journal of Physics. 84: 1355–1360, 2010.

15. K, Govindaraju; SK, Basha; VG, Kumar; G, Singaravelu; Silver, gold and bimetallic nanoparticles production using single-cell protein (*Spirulina platensis*) Geitler. Journal of Materials Science. 43: 5115–5122, 2008.

16. JL, Graves; M, Tajkarimi; Q, Cunningham; A, Campbell; H, Nonga; SH, Harrison; JE, Barrick; Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. Frontiers in Genetics. 6: 42, 2015.

17. C, Malarkodi; S, Rajeshkumar; K, Paulkumar; G, Gnanajobitha; M, Vanaja; G, Annadurai; Bacterial synthesis of silver nanoparticles by using optimized biomass growth of *Bacillus* sp.. Nanoscience and Nanotechnology: An International Journal. 3(2): 26-32, 2013.

18. N, Ranganathan; R, Ramachandran; Synthesis of silver nanoparticles using a probiotic microbe and its antibacterial effect against multidrug resistant bacteria. African Journal of Biotechnology. 11(49): 11013-11021, 2012.

19. S, Priyadarshini; V, Gopinath; NM, Priyadarshini; D, MubarakAli; P, Velusamy; Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using novel strain, *Bacillus flexus* and its biomedical application. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 102: 232-237, 2013.

20. S, Shanthi; BD, Jayaseelan; P, Velusamy; S, Vijayakumar; CT, Chih; B, Vaseeharan; Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dabhb1 and their antibiofilm activity and toxicity effects in *Ceriodaphnia cornuta*. Microbial Pathogenesis. 93: 70-77, 2016.

21. TJ, Park; KG, Lee; SY, Lee; Advances in microbial biosynthesis of metal nanoparticles. Applied in Microbiology and Biotechnology. 2015.

22. Sh, Li; X, Zhang; G, Sheng; Silver nanoparticles formation by extracellular polymeric substances (EPS) from electroactive bacteria. Environmental Science and Pollution Research, 2016.

application in biofilm control. International Journal of Nanomedicine. 9: 2635–2653, 2014.

5. T, Klaus; R, Joerger; E, Olsson; CG, Granqvist; Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. Proceedings of the National Academy of Sciences. 96: 13611–13614, 1999.

6. RY, Parikh; S, Singh; BLV, Prasad; MS, Patole; M, Sastry; YS, Shouche; Extracellular synthesis of crystalline silver nanoparticles and molecular evidence of silver resistance from *Morganella* sp.: towards understanding biochemical synthesis mechanism. Chembiochem. 9: 1415–1422, 2008.

7. A, Prakash; S, Sharma; N, Ahmad; A, Ghosh; P, Sinha; Synthesis of AgNPs by *Bacillus cereus* bacteria and their antimicrobial potential. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology. 2: 155–161, 2011.

8. H, Zhang; Q, Li; Y, Lu; D, Sun; X, Lin; X, Deng; N, He; S, Zheng; Biosorption and bioreduction of diamine silver complex by *Corynebacterium*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 80: 285–290, 2005.

9. VG, Debabov; TA, Voeikova; AS, Shebanova; KV, Shaitan; LK, Emel'yanova; LM, Novikova; MP, Kirpichnikov; Bacterial synthesis of silver sulfide nanoparticles. Nanotechnologies in Russia. 8: 269–276, 2013.

10. SA, Wadhwani; UU, Shedbalkar; R, Singh; MS, Karve; BA, Chopade; Novel polyhedral gold nanoparticles: green synthesis, optimization and characterization by environmental isolate of *Acinetobacter* sp. SW30. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 30: 2723–2731, 2014.

11. GS, Kiran; A, Sabu; J, Selvin; Synthesis of silver nanoparticles by glycolipid biosurfactant produced from marine. Biotechnology. 148: 221–225, 2010.

12. R, Ramanathan; AP, O'Mullane; RY, Parikh; PM, Smooker; SK, Bhargava; V, Bansal; Bacterial kinetics-controlled shape-directed biosynthesis of silver nanoplates using *Morganella psychrotolerans*. Langmuir. 27: 714–719, 2011.

13. AR, Shahverdi; A, Fakhimi; HR, Shahverdi; S, Minaian; Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against