

The survey of intra and extracellular biosynthesis of cadmium sulfide nanoparticles in Escherichia coli 35218

M. Houkhani¹, M. Rabiee^{*2}, M. Oskoui³, F. Moztarzadeh⁴, M. Shayan⁵

¹M.Sc, Biomaterial Group, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

²Associate Professor, Biomaterial Group, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran
mrabiee@aut.ac.ir

³Assistant Professor, Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran

⁴Professor, Biomaterial Group, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

⁵M.Sc Student, Biomaterial Group, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

Abstract

In recent years, nanoparticles have attracted considerable attention due to their special optical, chemical, and electrical properties. Developments of nanoparticles synthesis methods for producing materials with precise size and morphology have been considered recently. Among these methods, biosynthesis has a special position for its high compatibility with environment. The use of microorganism in nanotechnology is one of the important aspects of this issue. In this survey we have used Escherichia coli 35218 to Cadmium Sulfide nanoparticles synthesis. First, appropriate time of cadmium ions addition and their maximum concentrations were determined that they don't inhibit bacterial growth. Then we studied intra and extracellular biosynthesis.

According to this survey, this strain wasn't able to produce cadmium sulfide nanoparticles intracellularly but also these nanoparticles were extracellularly synthesized in the medium supplemented with L-cysteine. Formation of CdS nanoparticles, their morphologies and fluorescence properties were determined with WDX, SEM and fluorescence microscopy.

Keywords: Biosynthesis, Cadmium sulfide, Escherichia coli, Nanoparticles, Micro organism.

* Corresponding author

Address: Mohammad Rabiee, Biomaterial Group, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

Tel: +98 21 64542368

Fax: +98 21 66468186

E-mail: mrabiee@aut.ac.ir

بررسی سنتز زیستی داخل و خارج سلولی نانو ذرات سولفید کادمیم در سوپه ۳۵۲۱۸ باکتری اشرشیاکولی

ملیکا ایلوخانی^۱، محمد ربیعی^{۲*}، مهوش اسکویی^۳، فتح الله مضطر زاده^۴، مهدیس شایان^۵

^۱ کارشناس ارشد مهندسی پزشکی، گروه بیومتریال، دانشگاه صنعتی امیرکبیر

^۲ دانشیار دانشکده مهندسی پزشکی، گروه بیومتریال، دانشگاه صنعتی امیرکبیر

mrabiee@aut.ac.ir

^۳ استادیار بخش میکروبی شناسی، انستیتو پاستور ایران

^۴ استاد دانشکده مهندسی پزشکی، گروه بیومتریال، دانشگاه صنعتی امیرکبیر

^۵ دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی پزشکی، گروه بیومتریال، دانشگاه صنعتی امیرکبیر

چکیده

در سالهای اخیر تلاشهای بسیار زیادی برای تولید نانو ذرات به دلیل خواص ویژه نوری، شیمیایی و الکتریکی آنها صورت گرفته است. توسعه روشهای سنتز نانو مواد برای تولید موادی با مورفولوژی و اندازه معین و توزیع مناسب اندازه ذرات، از محورهای پژوهشی چند سال اخیر محسوب می شود. در این میان روشهای مبتنی بر فناوری زیستی به دلیل تمیز بودن و سازگاری بالا با محیط زیست از جایگاه ویژه ای برخوردارند. یکی از مهمترین ابعاد این بحث استفاده از میکروارگانیسم ها در نانو فناوری است. در این پژوهش از سوپه ۳۵۲۱۸ باکتری اشرشیاکولی برای سنتز نانو ذرات CdS استفاده شد. ابتدا زمان مناسب و بیشینه غلظتی از یون کادمیم که به جلوگیری از رشد و لیز باکتری منتج نمی شود مشخص گردید. سپس دو فرآیند سنتز زیستی داخل و خارج سلولی بررسی شد. طبق بررسی های صورت گرفته مشخص شد که این سوپه به شکل داخل سلولی قادر به سنتز نانو ذرات CdS نیست اما با غنی سازی محیط کشت با اسید آمینه سیستئین نانو ذرات CdS به شکل خارج سلولی سنتز شدند. تشکیل نانو ذرات، مورفولوژی و خاصیت فلورسانت آنها به ترتیب با کانال آنالیزور WDX، SEM و میکروسکوپی فلورسانس بررسی شد.

کلیدواژگان: سنتز زیستی، سولفید کادمیم، اشرشیاکولی، نانو ذرات، میکروارگانیسم

عهده دار مکاتبات

نشانی: تهران، خیابان حافظ، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، گروه بیومتریال

تلفن: ۰۲۱۶۴۵۴۲۳۶۸، دورنگار: ۰۲۱۶۶۴۶۸۱۸۶، پیام نگار: mrabiee@aut.ac.ir

۱- مقدمه

برای سنتز نانو ذرات نیمه هادی از روش های سنتز مختلفی استفاده شده است که هرکدام از این روش ها دارای عیوبی هستند. در روش میکرو امولسیون عدم انحلال پذیری در آب، استفاده از لیگاند های سمی جهت ایجاد حلالیت در حلال های آلی [۱]؛ در روش هیدروترمال فشار و دمای بالا، استفاده از TOP، عدم انحلال پذیری در آب [۲]؛ روش های سنتز از فاز بخار تمایل ذاتی ذرات به آگلومراسیون [۳ و ۴]؛ روش پرتو لیزر- پالسی نیاز به تجهیزاتی مانند لیزر و بازدهی پایین؛ روش هم رسوبی از محلول عدم همگنی و آگلومراسیون [۴]؛ روش سنتز احتراقی دمای بالا و عدم کنترل اندازه ذرات و در روش مکانیکی هزینه بالا و مشکل بودن فرآیند از عیوب این روش ها محسوب می شوند [۵]. در حال حاضر با توجه به سازگاری بالا با محیط زیست استفاده از میکرو ارگانسیم ها در سنتز نانو ذرات فلزی و نیمه هادی مانند سولفید کادمیم مورد توجه قرار گرفته است. یکی از میکرو ارگانسیم های مورد توجه در سنتز نانو ذرات باکتری گرم منفی اشرشیاکولی است. برای اولین بار Sweeny و همکارانش در سال ۲۰۰۴ توسط دو سویه از این باکتری نانو ذرات CdS را به شکل داخل سلولی سنتز کردند [۶]. تا کنون سنتز خارج سلولی نانو ذرات CdS در باکتری کلسیلا پنومونیه توسط Holmes و همکارانش (۱۹۹۸) و در قارچ *Fusarium oxysporum* توسط *Absar Ahmad* و همکارانش (۲۰۰۲) صورت گرفته است [۱ و ۴]. در این پژوهش توانایی سنتز نانو ذرات CdS به دو شکل داخل و خارج سلولی در سویه *E. coli* 35218 بررسی شده است.

۲- مواد و روش کار

۲-۱- بررسی تأثیر حضور یون کادمیم و غلظت آن

در رشد باکتری *E. coli* 35218

هدف از این بررسی تعیین غلظت و زمان مناسب جهت افزودن محلول کلرید کادمیم به محیط کشت باکتری در فرآیند

سنتز زیستی بود. که از دو روش اندازه گیری OD و MIC با استفاده از دیسک استفاده شد.

روش اندازه گیری OD: ابتدا یک محلول ۰/۲۵ M از $CdCl_2 \cdot 2H_2O$ با آب دیونیزه تهیه و اتوکلاو شد. سپس با چند تک کلنی *E. coli* 35218 (برداشت از روی پلیت مک کانکی کشت ۲۰ h) در ۷ cc محیط LB برات $[pH_{LB} = 6.84 (T = 24.8^\circ C)]$ استوک اولیه تهیه شد. سپس ۱ cc از این استوک به شش لوله استریل اضافه گردید (نمونه ۱ تا ۶). بعد از افزودن استوک، به نمونه های ۱ تا ۶ به ترتیب ۴، ۳/۹۹، ۳/۹۸، ۳/۹۶، ۳/۹۴، ۳/۹۲ میلی لیتر LB اضافه کردیم. آخرین مرحله افزودن به ترتیب ۱، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرو لیتر محلول کلرید کادمیم مذکور به نمونه های ۲ تا ۶ بود. نمونه ۱ به عنوان شاهد منفی و فاقد کادمیم بوده است. غلظت یون کادمیم در نمونه های ۲ تا ۶ به ترتیب ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۴ mM بود. سپس $OD_{600 nm}$ در زمان های ۰، ۶، ۱۸ و ۲۴ ساعت از کشت با دستگاه اسپکتروفوتومتر^۱ اندازه گیری شد (جدول و نمودار ۱).

روش تعیین MIC^۲ یون کادمیم با استفاده از دیسک: ابتدا پنج محلول با غلظت های ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و mM از $CdCl_2 \cdot 2H_2O$ با آب دیونیزه تهیه و اتوکلاو شد. سپس با استفاده از دیسک های خالی^۳ برای هر کدام از این غلظت ها دیسک هایی با حجم های ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میکرو لیتر از کلرید کادمیم ایجاد شد. لازم به ذکر است که در دیسک های کنترل کلرید کادمیمی وجود نداشت و به جای آن از سرم فیزیولوژی و آب دیونیزه شده استفاده شده است. سپس با برداشت یک تک کلنی از باکتری *E. coli* 35218 از یک پلیت مک کانکی کشت ۲۰ h در ۵ cc سرم فیزیولوژی یک محلول با غلظت نیم مک فارلند $(OD_{625 nm} = 0.08 - 0.1)$ از باکتری ایجاد کردیم. این محلول با استفاده از سوپ استریل روی پلیت های مولر کشت داده شد. سپس دیسک ها کادمیمی را روی پلیت ها قرار دادیم. پلیت ها داخل اتو ۳۷°C گذاشته شد و بعد از گذشت ۲۰ ساعت بررسی شدند و قطر هاله های عدم رشد

^۱CECIL-CE 2501^۲ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)^۳BLANK PAPER disc -6.4 mm -PT PadTan Co

برای لیز دیواره باکتری به دو روش عمل شد. روش اول استفاده از فرآیند شوک اسمزی و روش دوم استخراج با فرآیند جوشاندن^۴. در فرآیند شوک اسمزی ابتدا با رسوب باکتری در محلولی که شامل ۰/۷۵ M ساکاروز، ۰/۱ M EDTA ۱ mM تریس با pH=8، ۱۰ µg/ml آنزیم لیزوزیم و با pH=7.5 بود، سوسپانسیونی ایجاد کردیم [۶]. لازم به ذکر است که در ساخت این محلول آخرین مرحله افزودن آنزیم لیزوزیم بود. بعد از ایجاد سوسپانسیون فوق، نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در ظرف حاوی یخ انکوباسیون شدند. سپس محلول کلرید منیزیم با غلظت ۰/۵ M به نمونه ها اضافه شده و آنها را سانتریفیوژ کردیم. سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط صورت گرفت. سپس مایع روینمونه ها برای بررسی با دستگاه نانو سایزر^۵ (نمودار ۶) و اسپکتروفوتومتر فلورسانس^۶ (نمودار ۴ و ۵) برداشته شد.

در فرآیند جوشاندن بعد از خروج نمونه های سوسپانسیون باکتریایی از داخل انکوباتور آنها را با سمپلر داخل میکرو تیوپ های ۱/۵ CC ریخته و با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای ۲۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کردیم. سپس با استفاده از سمپلر مایع رویی را از رسوب جدا نمودیم. بعد از جداسازی محیط کشت از رسوب، به هرکدام از میکرو تیوپ ها ۰/۵ CC آب دیونیزه استریل اضافه شد. میکرو تیوپ ها را ورتکس کرده تا سوسپانسیونی غلیظ از باکتریها ایجاد شود. در این مرحله میکرو تیوپ ها را با استفاده از یک رک یونولیتی داخل یک بشر آب در حال جوش قرار دادیم. نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در آب در حال جوش قرار داشتند. سپس میکرو تیوپ ها را از بشر خارج کرده و سانتریفیوژ کردیم. فرآیند سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm در دمای ۴ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. بعد از این مرحله مایع رویی با دقت توسط سمپلر از رسوب جدا شد. مایع جدا شده توسط دستگاه نانو سایزر (نمودار ۷) و اسپکتروفوتومتر فلورسانس (نمودار های ۲ و ۳) برای بررسی سنتز یا عدم سنتز داخل سلولی نانو ذرات CdS آنالیز شد.

اندازه گیری شد. مراحل مذکور چندین بار تکرار شد. (جدول ۲ و شکل های ۲).

۲-۲ سنتز نانو ذرات CdS با استفاده از E. coli

35218

۱-۲-۲ بررسی سنتز داخل سلولی

ابتدا باکتری E. coli 35218 را روی پلیت مک کانکی آگار کشت دادیم (با فرآیند کشت چهار ناحیه ای تا کولونی تک ایجاد شود) و در اتو ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس با لوپ دو تک کولونی از روی پلیت آگار برداشته شده و در دو فالکن استریل حاوی ۷ CC محیط LB برات کشت داده شدند. فرآیند کشت در انکوباتور با دور ۶۰ rpm و دمای ۳۷ °C به مدت ۱۸ ساعت صورت گرفت. در این مرحله باکتری ها در فاز ایستایی هستند و رشد آنها کامل شده است. بنابراین بهترین زمان برای افزودن یون های کادمیم به محیط کشت باکتری خواهد بود. در نتیجه نمونه ها با دور rpm ۴۴۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ °C) سانتریفیوژ شده و محیط کشت قبلی را خارج کردیم. سپس به رسوب باکتری ۷ CC محیط LB تازه اضافه و با استفاده از سمپلر رسوب باکتری را در این محیط پخش کردیم. نهایتاً محلول کلرید کادمیم اتو کلاو شده با غلظت ۰/۲۵ M به یکی از فالکن ها اضافه شد به گونه ای که غلظت نهایی کادمیم در آن ۱ mM بود. فالکن دوم به عنوان نمونه شاهد بود. به این فالکن محلول کلرید کادمیم اضافه نشد و تنها حاوی باکتری و محیط کشت LB برات بود. سپس این دو نمونه را در انکوباتور با دور ۷۰ rpm و دمای ۳۷ °C به مدت ۲۰ ساعت قرار دادیم. سپس به نمونه اول محلول سولفید سدیم اتوکلاو شده با غلظت ۰/۲۵ M اضافه شد. غلظت نهایی سولفید در نمونه ۱ mM بود. سپس مجدداً نمونه داخل انکوباتور با دور ۷۰ rpm و دمای ۳۷ °C به مدت ۲ ساعت قرار گرفت.

استخراج محتویات داخل سلول های باکتری جهت

بررسی وجود نانو ذرات CdS

⁴boiling

⁵ Nano ZS (Red badge)-ZEN3600

⁶ Perkin Elmer- LS 55

۲-۲-۲ بررسی سنتز خارج سلولی نانو ذرات CdS با

استفاده از E. coli 35218

ابتدا هر یک تک کلنی از E. coli 35218 از پلیت مک کانکی آگار (کشت ۲۰ h) را در چهار فالکن استریل کشت دادیم. فالکن های ۱ و ۲ حاوی ۷ cc محیط LB-L.Cystein 1% و فالکن های ۳ و ۴ حاوی LB براث بودند. نمونه ها به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور با دور ۶۰ rpm و دمای ۳۷°C قرار گرفتند. سپس نمونه ها با دور ۴۴۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محیط کشت آنها را خارج کردیم. به هر چهار نمونه ۷ cc محیط تازه 1% LB-L.Cystein اضافه کردیم. هم چنین در یک فالکن استریل (فالکن ۵) ۷ cc محیط 1% LB-L.Cystein ریختیم. در این فالکن باکتری کشت داده نشد. به نمونه های ۱، ۳ و ۵، محلول کلرید کادمیم اتوکلاو شده با غلظت ۰/۲۵ M اضافه شد به گونه ای که غلظت نهایی کادمیم در این سه نمونه ۱ mM بود. نمونه های ۲ و ۴ به عنوان شاهد و فقط حاوی باکتری و محیط کشت بودند. نمونه ۵ نیز شاهد فاقد باکتری بود. تمام نمونه ها به مدت ۲۲ ساعت در انکوباتور با دور ۷۰ rmp و دمای ۳۷°C قرار گرفتند.

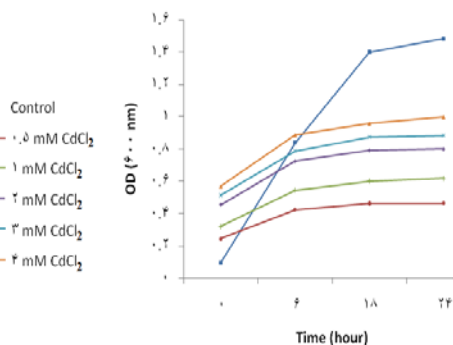
سپس نمونه ها با دور ۴۴۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی خارج شد. رسوب CdS سنتزی در نمونه ۱ برای آنالیز میکروسکوپ الکترونی^۷ و WDX Detector (Wave length Dispersive X-ray)^۸ (شکل های ۲ تا ۴) از نمونه خارج و در هوای محیط خشک شد.

از رسوب باکتری نیز برای بررسی با میکروسکوپ فلورسانس^۹ لام تهیه شد. بدین منظور یک قطره فسفات بافر سالین روی لام ریخته و با لوپ مقدار کمی از باکتری را در آن پخش کردیم. سپس لام را در هوای محیط قرار داده تا خشک شود. بعد از خشک شدن لام یک قطره گلیسرول ۹۸٪ (جهت کاهش حباب هایی که در نمونه ایجاد می شوند) روی نمونه ریخته و یک لامل روی آن قرار دادیم. برای مشاهده لام زیر میکروسکوپ فلورسانس یک قطره آب روی آن ریخته و با بزرگ نمایی 100x و طول موج تهییجی^{۱۰} ۳۲۰ nm از آن تصویر تهیه شد. (شکل ۵).

۳- نتایج

جدول ۱- مقادیر $OD_{600\text{ nm}}$ نمونه ها بعد از گذشت زمان های مختلف از کشت

زمان (hr) / نمونه	۰	۶	۱۸	۲۴
۱ (کنترل)	۰/۰۹۶	۰/۸۳۸	۱/۴۰۰	۱/۴۸۲
۲	۰/۲۴۴	۰/۴۲۵	۰/۴۶۳	۰/۴۶۴
۳	۰/۳۲۰	۰/۵۴۵	۰/۶۰۲	۰/۶۱۹
۴	۰/۴۵۵	۰/۷۲۵	۰/۷۹۳	۰/۸۰۰
۵	۰/۵۱۴	۰/۷۸۸	۰/۸۷۴	۰/۸۸۴
۶	۰/۵۶۸	۰/۸۸۸	۰/۹۵۹	۰/۹۹۸

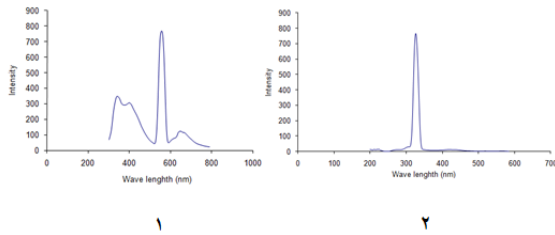


نمودار ۱- بررسی تغییرات OD در زمان های مختلف کشت باکتری با غلظت های متفاوت کلرید کادمیم

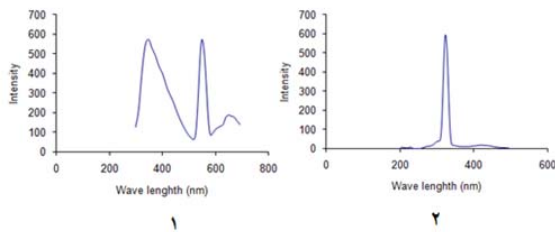
جدول ۲- مقادیر غلظت کلرید کادمیم بار گذاری شده با حجم ۵۰ μl در هر دیسک و قطر هاله عدم رشد

قطر هاله (cm)	غلظت کلرید کادمیم بار گذاری شده در دیسک (میلی مولار)
۳	۱۰۰۰
۲	۱۰۰
۱	۱۰
-	۱
-	۰.۱
-	کنترل

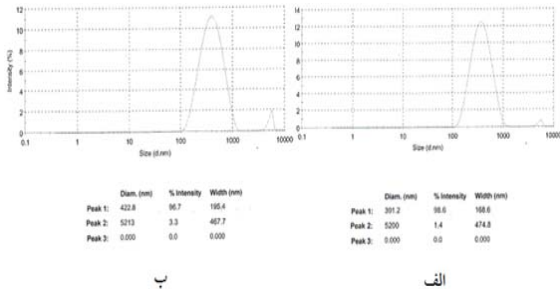
⁷Philips- Xl 30⁸ ICROSPEC WDX-3PC⁹ Nikon-ECLIPSE E200¹⁰ Excitation wave length



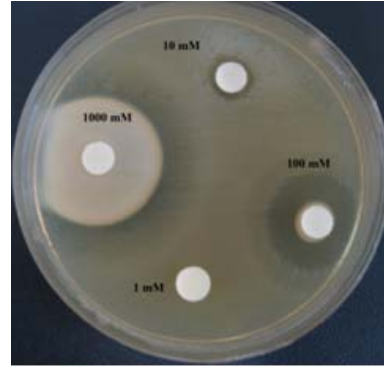
نمودار ۴- طیف (۱) گسیل و (۲) تهییج فلورسانس نمونه استخراجی از سوسپانسیون باکتریایی انکوباسیون شده با کلرید کادمیم و سولفید سدیم برای بررسی توانایی باکتری در سنتز داخل سلولی نانو ذرات Cds (استخراج با فرآیند شوک اسمزی)



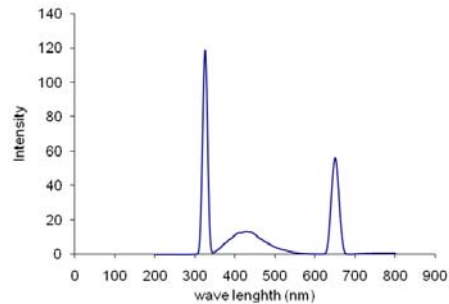
نمودار ۵- طیف (۱) گسیل و (۲) تهییج فلورسانس نمونه استخراجی از سوسپانسیون باکتریایی انکوباسیون شده در محیط کشت LB فاقد کلرید کادمیم و سولفید سدیم- نمونه شاهد (استخراج با فرآیند شوک اسمزی)



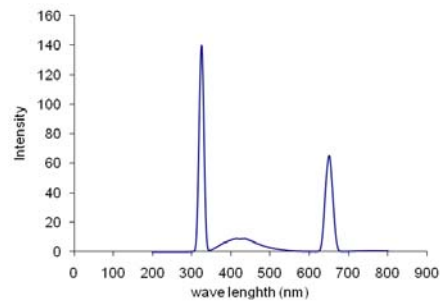
نمودار ۶- توزیع اندازه ذرات در نمونه استخراجی از سوسپانسیون باکتریایی انکوباسیون شده در محیط کشت LB فاقد کلرید کادمیم و سولفید سدیم -نمونه- شاهد (ب) حاوی ۱ mM کلرید کادمیم و سولفید سدیم برای بررسی توانایی باکتری در سنتز داخل سلولی نانو ذرات Cds. در هر دو نمونه استخراج با فرآیند شوک اسمزی صورت گرفته است.



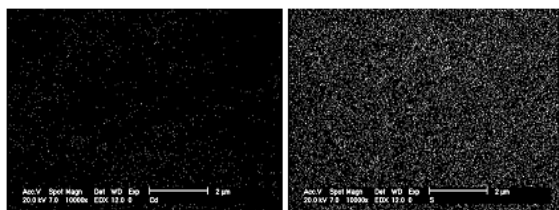
شکل ۱- رابطه قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک ها با غلظت های ۱ mM، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ از یون کادمیم (حجم کلرید کادمیم بار گذاری شده در هر دیسک: ۵۰ μl)



نمودار ۲- طیف گسیل فلورسانس نمونه استخراجی از سوسپانسیون باکتریایی انکوباسیون شده با کلرید کادمیم و سولفید سدیم برای بررسی توانایی باکتری در سنتز داخل سلولی نانو ذرات Cds (استخراج با فرآیند جوشاندن)



نمودار ۳- طیف گسیل فلورسانس نمونه استخراجی از سوسپانسیون باکتریایی انکوباسیون شده در محیط کشت LB فاقد کلرید کادمیم و سولفید سدیم- نمونه شاهد (استخراج با فرآیند جوشاندن)

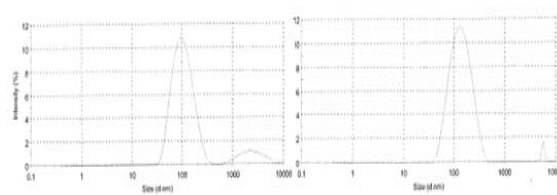


ج

د

(۲)

شکل ۳- تصاویر (۱) الف- نانو ذرات CdS سنتز زیستی در *E. coli* 35218 بعد از سانتیفیوژ ب- تصویر میکروسکوپ روبشی الکترونی (SEM) نانو ذرات CdS سنتز زیستی با بزرگ نمای $2 \mu\text{m}$ (۲) کانال آنالیزور WDX از نانو ذرات CdS سنتز زیستی با بزرگ نمای $2 \mu\text{m}$ برای: ج- عنصر کادمیم د- عنصر گوگرد

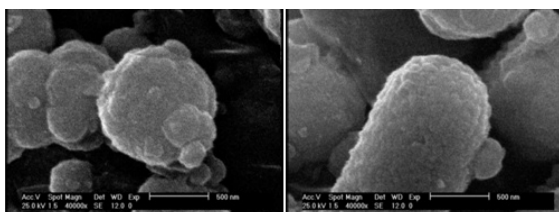


Peak	Diam. (nm)	%Intensity	Width (nm)
Peak 1:	100.3	89.0	50.77
Peak 2:	2443	11.0	1217
Peak 3:	0.000	0.0	0.000

ب

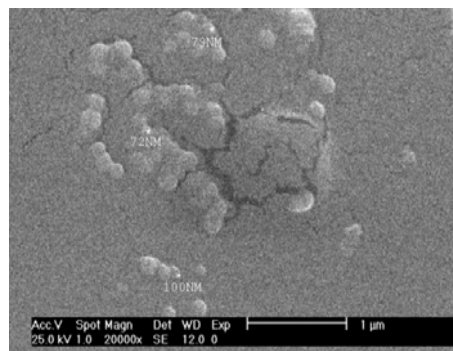
الف

نمودار ۷- توزیع اندازه ذرات در نمونه استخراجی از سوسپانسیون باکتریایی انکوباسیون شده در محیط کشت LB براث (الف) فاقد کلرید کادمیم و سولفید سدیم نمونه- شاهد (ب) حاوی 1 mM کلرید کادمیم و سولفید سدیم برای بررسی توانایی باکتری در سنتز داخل سلولی نانو ذرات CdS. در هر دو نمونه استخراج با فرآیند جوشاندن صورت گرفته است.

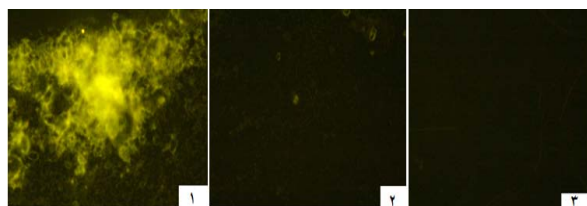


شکل ۴- تصویر SEM نانو ذرات CdS سنتز زیستی با بزرگ نمای 500 nm

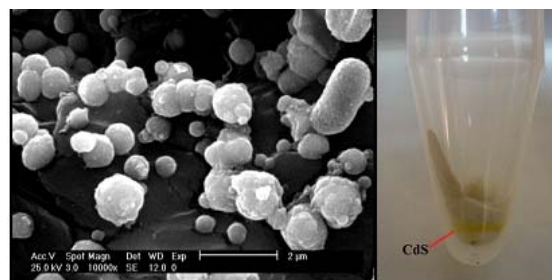
۵۰۰



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ روبشی الکترونی (SEM) نانو ذرات CdS سنتز زیستی با *E. coli* 35218 با بزرگ نمای $1 \mu\text{m}$



شکل ۵- (۱) فلورسانس نانو ذرات CdS سنتز زیستی روی سطح سلولهای باکتری *E. coli* 35218 (بعد از ۱۸ ساعت کشت اولیه باکتری در محیط $1\% \text{ LB-L.Cystein}$ و 22 ساعت کشت در محیط $1\% \text{ LB-L.Cystein}$ حاوی 1 mM کلرید کادمیم) (۲) فلورسانس و سنتز اندک نانو ذرات CdS (بعد از ۱۸ ساعت کشت اولیه باکتری در محیط $1\% \text{ LB-L.Cystein}$ براث و 22 ساعت کشت در محیط $1\% \text{ LB-L.Cystein}$ حاوی 1 mM کلرید کادمیم) (۳) عدم فلورسانس در نمونه شاهد (بعد از ۱۸ ساعت کشت اولیه باکتری در محیط $1\% \text{ LB-L.Cystein}$ تعویض محیط و مجدداً 22 ساعت کشت در محیط $1\% \text{ LB-L.Cystein}$ فاقد کلرید کادمیم)



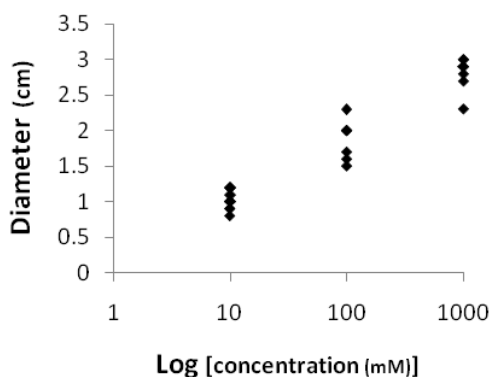
ب

الف

(۱)

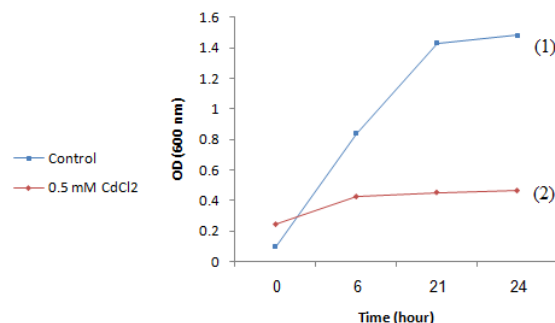
۴- بحث

تعیین مقاومت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک ها از دو روش آنتی بیوگرام و تعیین MIC با استفاده از تلقیح غلظت های متفاوت از آنتی بیوتیک به باکتری در میکروپلیت استفاده می کنند [۱۲]. از آنجا که یون کادمیم نیز سمی است و مانع از رشد باکتری می شود، استفاده از این دو روش برای تعیین غلظت مناسب کادمیم ارزیابی شد. در روش دوم (تعیین MIC با ایجاد رقت های مختلف در میکروپلیت) به دلیل تشکیل رسوب کادمیم در محیط کشت، نمی توان حضور یا عدم حضور رسوب باکتری را در چاهک های میکروپلیت تشخیص داد. بنابراین از روش اول یعنی آنتی بیوگرام (تعیین MIC با استفاده از دیسک) استفاده شد. با ساخت دیسک هایی از کلرید کادمیم با غلظت های مختلف (نسبت ۱ به ۱۰) و اندازه گیری قطر هاله عدم رشد ایجاد شده اطراف دیسک ها میزان سمیت غلظت های مختلف تعیین شد. از آنجا که بعد از قرارگیری دیسک روی محیط آگار محلول کلرید کادمیم بارگذاری شده در آن به فضای اطراف دیسک نفوذ می کند و مانع از رشد باکتری در آن ناحیه می شود [۱۳]. غلظت یون کادمیم در مرکز بیشترین و در اطراف هاله کمترین مقدار را داراست در نتیجه قطر هاله معیاری از میزان سمیت ماده می باشد.



نمودار ۹- توزیع قطر هاله در غلظت های مختلف از کلرید کادمیم بارگذاری شده در دیسک

اولین گام برای سنتز زیستی نانو ذرات سولفید کادمیم با استفاده از باکتری *E. coli* تعیین غلظت یون کادمیم (از نقطه نظر سمیت برای سلول های باکتری) و زمان مناسب برای افزودن محلول کلرید کادمیم بود [۶]. برای تعیین غلظت و زمان مناسب جهت افزودن محلول کلرید کادمیم به محیط کشت باکتری، تأثیر حضور غلظت های مختلف از کلرید کادمیم بر روی رشد باکتری *E. coli* 35218 بررسی شد. با توجه به نمودارهای به دست آمده مشخص شد که حضور حتی مقادیر اندک ($0/5$ mM) از کلرید کادمیم مانع از رشد مؤثر باکتری در مرحله لگاریتمیک (در مقایسه با نمونه کنترل) می شود (نمودار ۸). در نتیجه برای افزودن محلول کلرید کادمیم بهترین زمان فاز ایستایی است.

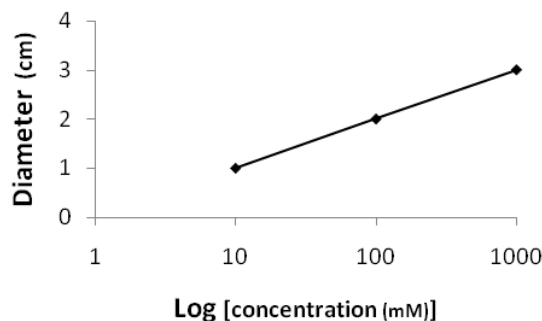


نمودار ۸- بررسی تأثیر حضور یون کادمیم در رشد و تغییرات OD در زمان های مختلف از کشت باکتری (۱) نمونه کنترل فاقد یون کادمیم است. (۲) در نمونه ۲ محیط کشت باکتری حاوی $0/5$ mM کلرید کادمیم است.

از سویی دیگر به دلیل رسوب مقادیر اندکی از کادمیم در محیط کشت LB نمی توان با اندازه گیری OD غلظت بهینه را اندازه گیری کرد. چون متناسب با افزایش غلظت کادمیم و میزان رسوب، OD نیز افزایش می یابد بنابراین همانند بعضی از پژوهش های قبلی نمی توان برای تعیین مقاومت نسبت به کادمیم در سویه های کلون شده که از اندازه گیری OD استفاده شده است، استفاده نمود [۹-۱۱]. در نتیجه برای تعیین غلظت مناسب باید از روش دیگری استفاده کرد. در

کولونی با کشت بر روی پلیت استفاده شده است که تلقیح کلرید کادمیم در دو حالت بوده است. در حالت اول در محیط مایع انکوباسیون انجام شده و بعداً روی پلیت آگار کشت و شمارش صورت گرفته است ولی در حالت دوم محیط آگار خود حاوی کلرید کادمیم بوده است [۱۵ و ۱۶] ولی با انجام فرآیند مشابه برای E. coli 35218 حتی با وجود غلظت های بالا از کلرید کادمیم در محیط کشت، تعداد کولونی ها رشد یافته روی پلیت (با تلقیح 10 لانداز از محصول انکوباسیون باکتری با کلرید کادمیم روی پلیت مک کانکی و کشت O.N) غیر قابل شمارش بودند در حالیکه در غلظت های بالا از کلرید کادمیم باکتری قادر به رشد و ادامه حیات نخواهد بود. بنابراین روش شمارش کولونی در این پژوهش ناکارآمد بوده است. البته شایان ذکر است که اگر چه MIC یکی از مؤثرترین روش های ارزیابی اثرات سمی فلزات سنگین برای فعالیت های میکروبی بوده است ولی در حال حاضر هیچگونه استاندارد (آستانه ای از غلظت های فلزات سنگین) برای تمایز بین سویه های حساس و مقاوم به فلزات سنگین وجود ندارد [۱۷].

با بررسی نمودارهای توزیع اندازه ذرات، تهییج و گسیل فلورسانس محصولات خارج شده از داخل باکتری بر اثر فرآیند شوک اسمزی (نمودار ۶) و بویل (نمودار ۷) مشخص شد که سنتز این نانو ذرات به شکل داخل سلولی صورت نگرفته است. طیف های گسیل فلورسانس نمونه کنترل و نمونه انکوباسیون شده با کلرید کادمیم و سولفید سدیم (در هر دو حالت استخراج با فرآیند بویل و شوک اسمزی) تقریباً بر هم منطبق است. به عنوان مثال در استخراج با فرآیند شوک اسمزی بیشینه تهییج^{۱۱} برای نمونه کنترل در طول موج ۳۲۸ nm و برای نمونه انکوباسیون شده با کلرید کادمیم ۳۲۵ nm بوده است. همچنین بیشینه گسیل^{۱۲} برای این دو نمونه به ترتیب در طول موج های ۵۴۹ nm و ۵۵۶ nm بوده است که نشان عدم وجود تفاوت قابل ملاحظه بین نمونه کنترل و نمونه اصلی است. نمودار توزیع اندازه ذرات نیز برای نمونه شاهد و نمونه انکوباسیون شده با کلرید کادمیم و سولفید سدیم مشابه بود. در استخراج با فرآیند بویل نمونه شاهد و



نمودار ۱۰- رابطه خطی بین لگاریتم غلظت کلرید کادمیم بارگذاری شده در دیسک با قطر هاله عدم رشد تشکیل شده اطراف آن

با بررسی نمودار داده های مربوط به هر غلظت می توان به شکل تخمینی به رابطه ذیل رسید:

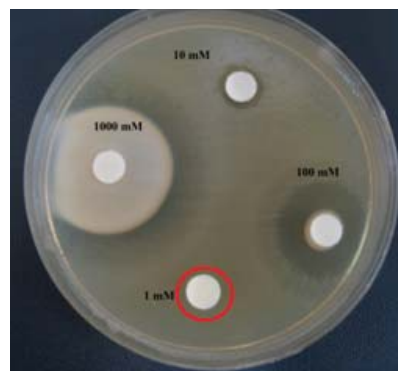
$$d = \text{Log}(C)$$

d: قطر هاله (سانتی متر)

C: غلظت محلول کلرید کادمیم بارگذاری شده در دیسک

(میلی مولار)

بنابراین با توجه به داده های به دست آمده حاصل از آنتی بیوگرام بیشترین غلظتی که می توان برای سنتز زیستی در مرحله فاز ایستایی استفاده کرد، ۱ mM می باشد (شکل ۶). این غلظت دقیقاً همان غلظتی است که از آن در سنتز زیستی نانو ذرات سولفید کادمیم در پژوهش های قبلی استفاده شده است [۶ و ۱۴].



شکل ۶- عدم تشکیل هاله (عدم رشد باکتری) در اطراف دیسک بارگذاری شده با محلول کلرید کادمیم ۱ mM

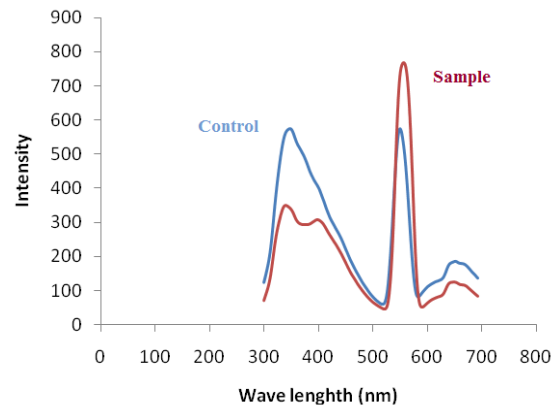
در پژوهش های قبلی برای تعیین سمیت یون کادمیم، باکتری با کلرید کادمیم انکوباسیون شده و از روش شمارش

¹¹ Maximum of excitation

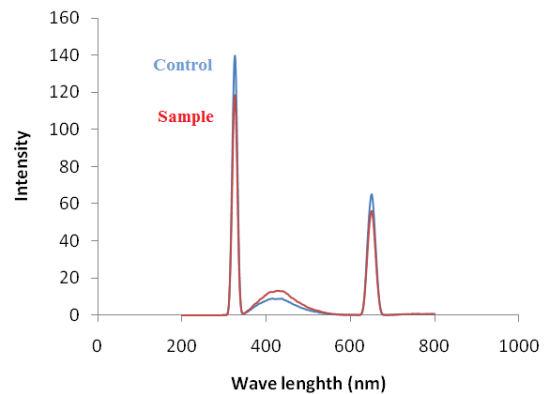
¹² Maximum of emission

در این پژوهش برای اولین بار سنتز خارج سلولی نانو ذرات CdS در *E. coli* صورت گرفته است. در پژوهش های قبلی نانو ذرات CdS توسط Sweeny و همکارانش (سال ۲۰۰۴) به شکل داخل سلولی در دو سویه از *E. coli* سنتز شده بودند [۶]. سنتز داخل سلولی نیازمند فرآیند لیز دیواره باکتری است به نحوی که حداقل آلودگی را با اجزای میکروارگانیسم داشته باشد [۱۸]. در نتیجه با این روش جدید (سنتز خارج سلولی) این مشکل حل خواهد شد. تا کنون در زمینه سنتز زیستی نانو ذرات CdS از باکتری ها، قارچ ها و مخمر ها استفاده شده است. در فرآیند سنتز زیستی با کلبسیلا پنومونیه [طبقه (u) *Klebsiella pneumoniae* (NCIMB 418)] نانو ذرات با اندازه تقریبی ۴ nm سنتز شده اند [۷]. در سنتز خارج سلولی این نانو ذرات با قارچ *Fusarium oxysporum* آنزیم های کاهنده یون های سولفات را به سولفید تبدیل می کنند و منتج به سنتز خارج سلولی CdS NPs با دامنه ابعادی ۲۰-۵ nm می شوند [۸]. نانو ذرات تشکیل شده در پژوهش مذکور به شکل محلول هستند درحالی که در این پروژه نانو ذرات به شکل نامحلول سنتز شده اند که احتمالاً ناشی از تفاوت در نوع پروتئین های و گروه های عاملی در سطح نانو ذرات است (شکل ۷). مشکل اصلی قارچ ها در فرآیند سنتز زیستی آن است که تغییرات ژنتیکی ارگانیسم های یوکاریوتی برای شناخت کامل آنزیم های ویژه در تولید نانو ذرات بسیار دشوارتر از پروکاریوت هاست [۱۹]. در مقایسه با کلبسیلا پنومونیه نیز ایمنی کار با *E. coli* 35218 بالاتر است چون BSL^۳ آن یک می باشد یعنی در افراد بزرگسال سالم ایجاد بیماری نمی نماید [۲۰]. از سویی دیگر این باکتری به آسانی رشد می کند و با فرآیند های متاژنیک می توان ساختار ژنتیکی آن را تغییر داد به گونه ای که بتوان با شناخت ژن های دخیل در این فرآیند سنتز زیستی بازدهی تولید نانو ذرات CdS را به شکل قابل ملاحظه ای افزایش داد [۲۱].

نمونه اصلی به ترتیب دارای بیشینه توزیع اندازه ذرات در ۱۴۵ و ۱۰۹ nm و در فرآیند شوک اسمزی به ترتیب دارای بیشینه توزیع اندازه ذرات در ۳۹۱ و ۴۲۲ nm هستند که نشان دهنده عدم تفاوت قابل ملاحظه بین شاهد و نمونه اصلی است. متوسط اندازه ذرات خارج شده از باکتری بسیار بزرگتر از مقدار گزارش شده در پژوهش های قبلی است که نشان دهنده عدم سنتز نانو ذرات CdS به شکل داخل سلولی در این سویه از *E. coli* است [۶].



نمودار ۱۱- مقایسه طیف گسیل باکتری انکوباسیون شده با محیط کشت فاقد کلرید کادمیم (Control) و نمونه باکتری انکوباسیون شده با محیط کشت حاوی کلرید کادمیم و سولفید سدیم (Sample)- استخراج با فرآیند شوک اسمزی صورت گرفته است.

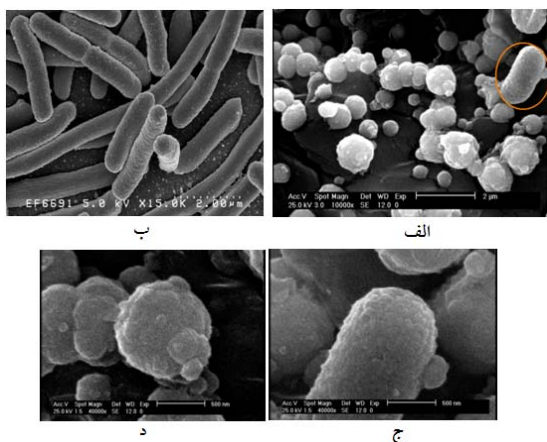


نمودار ۱۲- مقایسه طیف گسیل باکتری انکوباسیون شده با محیط کشت فاقد کلرید کادمیم (Control) و نمونه باکتری انکوباسیون شده با محیط کشت حاوی کلرید کادمیم و سولفید سدیم (Sample)- استخراج با فرآیند بویل صورت گرفته است.

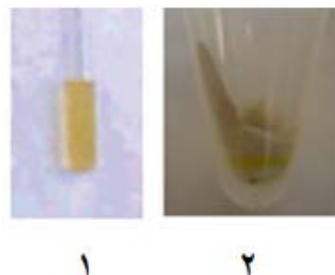
این امر حاکی از تولید مقدار بیشتری از نانو ذرات CdS و تجمع آنها در روی سطح خارجی دیواره باکتری است. در نمونه های شاهد (نمونه ۲، ۴ و ۵) هیچگونه فلورسانسی مشاهده نشد. عدم فلورسانس در نمونه ۵ نشان دهنده آن است که آنزیم های ترشح شده از باکتری مسئول فرآیند سنتز نانو ذرات CdS هستند و در غیاب باکتری هیچگونه سنتزی صورت نمی گیرد.

اندازه نانو ذرات CdS سنتزی با این روش حدوداً ۱۰۰-۷۰ nm است در حالی که در کارهای قبلی اندازه ذرات زیر ۱۰ nm بوده است [۶، ۷ و ۱۴]. شاید یکی از دلایل افزایش اندازه نانو ذرات، تجمع آنها در محیط خارج سلولی بعد از فرآیند سنتز زیستی باشد همانند سنتز خارج سلولی در *K.pneumoniae* که ذرات بزرگتر (۲۰۰ nm) از تجمع ذرات کوچکتر (۴ nm) ایجاد شده بودند [۷].

شکل نانو ذرات سنتزی با این روش تقریباً کروی است که مشابه کارهای قبلی بوده است شکل (۸) [۶ و ۱۴]. تجمع نانو ذرات نیز در بعضی نواحی میله ای شکل بوده و مانند باسیل های *E. coli* است ولی ابعاد آنها کوچکتر از ابعاد سلول های باکتری است. این اختلاف اندازه در شکل ذیل کاملاً مشخص است.



شکل ۸- مقایسه شکل نانو ذرات CdS سنتزی (الف، ج و د) با باسیل های *E. coli* (ب) با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی [۲۳]



شکل ۷- سنتز خارج سلولی CdS NPs (۱) سنتز با قارچ *Fusarium oxysporum* [۸] (۲) سنتز با *E. coli* 35218

در این پژوهشی که ما انجام دادیم برخلاف کارهای قبلی (سنتز داخل سلولی CdS NPs در *E. coli*) نظیر Sweeny و همکارانش در سال ۲۰۰۴ (ایالات متحده آمریکا) از نمک سولفید استفاده نشد [۶] بلکه اسید آمینه L - Cysteine به عنوان منبع گوگرد در محیط کشت LB مورد استفاده قرار گرفت [۲۱]. منبع گوگردی موجود در این اسید آمینه تنها با حضور باکتری و ترشح سیستمین دی سولفو هیدراز^{۱۴} قادر به ایجاد یونهای S^{۲-} می باشد در حالیکه استفاده از نمک های سولفیدی (مانند سولفید سدیم) باعث ایجاد سولفید کادمیم توده ای (بالک) می شود و اگر به شکل خارج سلولی سنتزی توسط باکتری صورت گیرد قابل تمایز نخواهد بود. از سویی دیگر حضور L - Cysteine در محیط کشت عاملی برای ترغیب سنتز زیستی نانوذرات CdS است [۲۱]. با افزودن محلول کلرید کادمیم به محیط کشت حاوی L-Cysteine و مواجهه باکتری ها با سمیت ناشی از این یون، باکتری شروع به ترشح سیستمین دی سولفو هیدراز می کند تا با ایجاد یون های سولفیدی، یون های کادمیم را به نانو ذرات نامحلول تبدیل کند. این راه یکی از روش های غلبه بر سمیت یون های فلزی توسط میکروارگانیسم هاست [۲۲]. نکته جالب آن است که در نمونه ای که از ابتدا با محیط LB-L.Cysteine انکوباسیون شده بود (۴۰ ساعت) توانایی تولید نانو ذرات CdS بیش از نمونه ای بود که ۱۸ ساعت در LB و ۲۲ ساعت در LB-L.Cysteine کشت شده بودند. فلورسانس نمونه ی اول به شکل چشمگیری بیش از نمونه سوم است که

^{۱۴}cysteine desulphydrase

[6] Rozamond Y. Sweeney, Chuanbin Mao, Xiaoxia Gao, Justin L. Burt, Angela M. Belcher, George Georgiou and Brent L. Iverson, "Bacterial Biosynthesis of Cadmium Sulfide Nanocrystals", Volume 11, Issue 11, November 2004, Pages 1553-1559.

[7] Peter R. Smith, Justin D. Holmes, David J. Richardson, David A. Russell and John R. Sodeau "Photophysical and photochemical characterisation of bacterial semiconductor cadmium sulfide particles" J. Chem. Soc., Faraday T rans., 1998, Vol. 94.

[8] Absar Ahmad, Priyabrata Mukherjee, Deendayal Mandal, Satyajyoti Senapati, M. Islam Khan, Rajiv Kumar, and Murali Sastry, "Enzyme Mediated Extracellular Synthesis of CdS Nanoparticles by the Fungus, *Fusarium oxysporum*" J. AM. CHEM. SOC. 9 V. 124, N. 41, 2002 12109.

[9] Irina M. Solovieva, Karl-Dieter Entian, "Metalloregulation in *Bacillus subtilis*: the copZ chromosomal gene is involved in cadmium resistance", FEMS Microbiology Letters 236 (2004) 115-122.

[10] Claire Geslina, Jenny Llanos, Daniel Prieur, Christian Jeanthon, "The manganese and iron superoxide dismutases protect *Escherichia coli* from heavy metal toxicity", Res. Microbiol. 152 (2001) 901-905.

[11] Reuven Babai, Eliora Z. Ron, "An *Escherichia coli* gene responsive to heavy metals", FEMS Microbiology Letters 167 (1998) 107-111.

[12] Andrews, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48 (Suppl. 1):5-16, (2001).

[۱۳] نویری هانیه - "بررسی آنزیم ESBLs و تشخیص مولکولی ژن های بتالاکتامازی blaCTX و blaPER در نمونه های بالینی *E. coli*"، استاد راهنما- دکتر فرشته شاهچراغی-استاد مشاور- دکتر ابوالفتح شجاعی- اسفند ۸۶- دانشگاه آزاد اسلامی- واحد لاهیجان

[14] H.J. Bai, Z.M. Zhang, Y. Guo and G.E. Yang "Biosynthesis of cadmium sulfide nanoparticles by photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris*", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Volume 70, Issue 1, 1 April 2009, Pages 142-146.

[15] Neha Chaurasia, Yogesh Mishra, Lal Chand Rai, " Cloning expression and analysis of phytochelatin synthase (pcs) gene from *Anabaena* sp. PCC 7120 offering multiple stress tolerance in *Escherichia coli*", Biochemical and Biophysical Research Communications 376 (2008) 225-230.

[16] Va'nia S. Braz, Marilis V. Marques, " Genes involved in cadmium resistance in *Caulobacter crescentus*", FEMS Microbiology Letters 251 (2005) 289-295.

[17] Zheng Zhengwei, Wei Fang, Helen Y. Lee, Zhongyi Yang, "Responses of *Azorhizobium caulinodans* to cadmium stress", FEMS Microbiology Ecology 54 (2005) 455-461.

[18] N.G. Nossal and L.A. Heppel, "The Release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase", J. Biol. Chem 13 (1966), pp. 3055-3062.

[19] P. Mukherjee, A. Ahmad, D. Mandal, S. Senapati, S. R. Sainkar, M. I. Khan, R. Parishcha, P. V. Ajaykumar, M. Alam, R. Kumar, and M. Sastry, "Fungus- Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis", NANO LETTERS, 2001, V. 1, No. 10, 515-519.

[20] <http://www.atcc.org>

برای اطمینان از حضور نانو ذرات CdS توزیع عناصر کادمیم و گوگرد در نمونه بررسی شد. تصاویر حاصل از کانال آنالیزور WDX نشان دهنده توزیع اتم های گوگرد و کادمیم در نمونه بودند (شکل ۳-۱۳) [۶]. نسبت اتم های گوگرد به کادمیم ۲۸ است که این مقدار حدوداً ۳/۵ برابر مقدار محاسبه شده در سنتز نانو ذرات CdS با مخمر *Candida glabrata* است که دلیل این امر می تواند حضور محیط غنی از گوگرد ۱% LB-L.Cysteine در این فرآیند باشد [۲۴]

۵- نتیجه گیری

در این پژوهش سنتز زیستی نانو ذرات CdS در سویه ۳۵۲۱۱۸ از باکتری اشرشیاکولی بررسی شد. ابتدا غلظت مناسب از یون کادمیم و زمان افزودن محلول کلرید کادمیم به سوسپانسیون باکتریایی تعیین شد. غلظت مناسب ۱ mM و زمان افزودن محلول در فاز ایستایی باکتری بود. سپس سنتز داخل و خارج سلولس در این سویه بررسی و برای اولین بار توانایی این سویه در سنتز خارج سلولی نانو ذرات CdS اثبات شد. نانو ذرات سولفید کادمیم به شکل نامحلول در محیط کشت غنی از سیستمین تشکیل شدند. نانو ذرات سنتزی با این روش در دامنه ابعادی ۷۰-۱۰۰ nm قرار داشتند.

مراجع

[1] Xiao Mo, Cuiying Wang, Lingyun Hao, Min You, Yurui Zhu, Zuyao Chen and Yuan Hu, "Convenient microemulsion route to star-shaped cadmium sulfide pattern at room temperature", Materials Research Bulletin Volume 36, Issue 11, 15 September 2001, Pages 1925-1930

[2] O'Donoghue, M. (1983). *A guide to Man-made Gemstones*. Great Britain: Van Nostrand Reinhold Company. pp. 40-44. ISBN 0-442-27253-7.

[3] J. Peña, A. Martínez, F. Conde, J. M. González-Calbet and M. Vallet-Regí, "In situ growth of SrTiO₃ thin films prepared by AACVD from strontium and titanium oxide bisdipivaloylmethanates", Solid State Ionics Volumes 101-103, Part 1, November 1997, Pages 183-190.

[4] Steen, William M. (1998). *Laser Material Processing* (2nd edition ed.). Great Britain: Springer-Verlag. ISBN 3-540-76174-8.

[5] P.M.Ajayan, L.S.Schadler, P.V.Braun, "Nanocomposite Science and Technology", Wiley-VCH Verlag, 2004.

[21] C. L. Wang · A. M. Lum · S. C. Ozuna · D. S. Clark J. D. Keasling "Aerobic sulfide production and cadmium precipitation by *Escherichia coli* expressing the *Treponema denticola* cysteine desulfhydrase gene" *J. Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 56, N. 3-4 / August, 2001.

[22] Dietrich H. Nies, " Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes", *FEMS Microbiology Reviews* 27 (2003) 313-339.

[23] http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli

[24] C T Dameron, B R Smith and D R Inge, "Glutathione-coated cadmium-sulfide crystallites in *Candida glabrata*", *J. BIOLOGICAL CHEMISTRY*, vol. 264. No. 29, Issue of October 15, pp. 17355-17360, 1989.