سنتز زیستی نانوذرات پلاتین با استفاده از باکتری‌های اکتینومیست جداسازی شده از خلیج فارس

محمد حسن ملائی[۱] منصور مشرقی[۱،۲،۳] * مریم مقدم متین[۱،۴،۵] بهار شهنواز[۱]

۱.گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲.گروه پژوهشی بیوتکنولوژی صنعتی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳. مرکز تحقیقات نانو، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

٤.گروه پژوهشی سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

۵.گروه پژوهشی تشخیص‌ها و درمان‌های نوین، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

پست الکترونیک: mollaei721@gmail.com

چکیده:

سنتز میکروبی نانوذرات، روشی سازگار با محیط زیست می‌باشد که بین فناوری نانو و بیوتکنولوژی میکروبی ارتباط برقرار می‌کند. شایع ترین روش‌های سنتز نانوذرات پلاتین، راهکارهای شیمیایی هستند که از نظر هزینه تولید ارزان بوده و بازده بالایی دارند. با این حال، نیاز به حلال‌های سمی در تولید نانوذرات، استفاده آن‌ها در کاربردهای پزشکی را محدود می‌کند. بنابراین یک روش سبز و غیر سمی برای تولید نانوذرات فلزی مورد نیاز است تا بتوان آن‌ها را در گستره وسیعی از زمینه‌ها مورد استفاده قرار داد. این هدف می‌تواند با استفاده از روش‌های زیستی نوین به دست آید. هدف اصلی این پژوهش بررسی توان سنتزی نانوذرات پلاتین توسط باکتری‌های اکتینومیست می‌باشد که در طی آن، مشخصه یابی ذرات تولید شده با روش‌های طیف سنجی UV-vis و پراکندگی نور دینامیکی (DLS) انجام شد. در این پژوهش سنتز ذرات با استفاده از روشناور لیز شده باکتری انجام گرفت. تشکیل رسوب و مشاهده جذب نوری در طول موج ۳۳۰ تائید کننده تشکیل نانوذرات بودند و اندازه تقریبی آن‌ها با استفاده از پراکندگی نور دینامیکی در حدود ۳۶ نانومتر تعیین شد. به طور کلی نتایج نشان داد که باکتری‌های اکتینومیست توان سنتز نانوذرات پلاتین را دارند. با توجه به روش کار و به کار بردن مواد بی خطر سازگار با محیط زیست، می‌توان این نانوذرات را نامزدی مناسب برای استفاده در زمینه‌های پزشکی، کاربردهای ضد میکروبی و ضد سرطان در آینده به شمار آورد.

کلمات کلیدی: سنتز زیستی، نانوذرات پلاتین، اکتینومیست

مقدمه:

نانو ذرات دارای خواص منحصر به فرد حرارتی، نوری، فیزیکی، شیمیایی، مغناطیسی و الکتریکی نسبت به ذرات معمولی خود هستند (۱۱). نانوذرات فلزی یکی از مهمترین و گسترده‌ترین مواد مورد مطالعه هستند که تنوع زیادی داشته و در زمینه‌های مختلف کاربرد دارند. در بین فلزات، پلاتین با توجه به خاصیت کاتالیزوری بالا و همچنین مقاومت بسیار بالا نسبت به خوردگی جایگاه ویژه‌ای دارد (۸).

برای سنتز نانوذرات روش‌های متعدد فیزیکی، شیمیایی و زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند. روش های فیزیکی و شیمیایی به خوبی برای سنتز نانوذرات استفاده می‌شوند اما مشکل اکثر این روش‌ها گران بودن و استفاده از مواد شیمیایی سمی است که همین امر باعث روی آوردن به توسعه‌ی روش‌های سازگار با محیط، یا سنتز سبز شده است (٤). بین سازواره‌ها، باکتری‌ها انتخاب خوبی برای مطالعه در این زمینه هستند زیرا به فراوانی در محیط یافت می‌شوند، رشد سریع و تنوع زیادی دارند، به راحتی دستکاری ژنتیکی می‌شوند و شرایط رشدشان مانند دما، اکسیژن و زمان گرمخانه گذاری را می‌توان به راحتی کنترل نمود (۱۱).

اکتینومیست‌ها باکتری‌های گرم مثبت رشته‌ای هستند که از لحاظ ریخت شناسیی و فیزیولوژی تنوع بالایی دارند، به نحوی که این تنوع هم در تولید هزاران ترکیب متابولیتی و هم در تولید آنزیم‌های متنوع دیده می‌شود. همین توانایی تولید آنزیم‌های متعدد می‌تواند اکتینومیست‌ها را گزینه مناسبی برای تولید زیستی نانوذرات کند (۲).

هدف این پژوهش، بررسی توان باکتری‌های اکتینومیست جداسازی شده از خلیج فارس برای سنتز نانوذرات پلاتین می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

مواد مورد استفاده:

نمک پلاتین یا هگزا کلرو پلاتینیک اسید (H_2PtCl_6)، محیط کشت TSB[1]، آگار

استخراج روشناور لیز شده:

پس از کشت سه جدایه باکتری بر روی پلیت با محیط جامد TSB آگار و گرفتن کلنی خالص، برای اطمینان از خلوص، باکتری‌ها رنگ آمیزی و شناسایی شدند. سپس یک کلنی از باکتری‌ها در محیط TSB تلقیح و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه در انکوباتور شیکر دار گرمخانه گذاری شد تا باکتری‌ها به تراکم مورد نظر برسند. بعد از این مرحله برای جدا کردن باکتری از محیط کشت، سانتریفیوژ با دور ۷۵۰۰ rpm انجام شده و جهت حذف کامل محیط کشت، شستشو با آب انجام شد. سپس برای لیز کردن باکتری‌ها از آب و گوی‌های شیشه‌ای به مدت ٢٤ ساعت استفاده شد. در نهایت برای به دست آوردن عصاره عاری از سلول، مخلوط مورد نظر با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و روشناور استخراج گردید (۷).

بیوسنتز نانوذره پلاتین:

برای سنتز نانوذرات، نمک ۱۰ میلی مولار پلاتین (H_2PtCl_6) به نسبت ۱:۱ به روشناور سلولی اضافه شد و تشکیل رسوب نشانه اولیه سنتز نانوذرات بود. رسوب نهایی بعد از ٢٤ ساعت سانتریفیوژ و جداسازی شده و در آون خلا با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت خشک شد.

[1] Tryptic Soy Broth

شناسایی باکتری:

از بین سه جدایه بررسی شده یک سویه بازده تولید بیشتری داشت که برای ادامه کار انتخاب شده و با توالی یابی ژن 16S مورد شناسایی قرار گرفت. جنس این باکتری *Streptomyces* شناسایی شد.

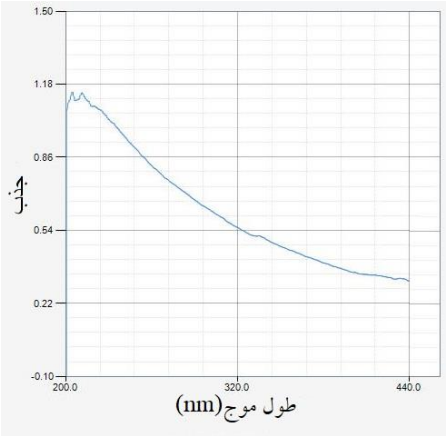
مشخصه یابی نانوذره پلاتین:

رسوب حاصل از مرحله قبل جهت تایید حضور نانوذره پلاتین و تعیین اندازه ذرات به ترتیب توسط دستگاه طیف سنجی اشعه ماوراء بنفش (Photonix Ar 2015, Iran) و پراکندگی نور دینامیکی[2] (DLS) (Cordouan- Vasco3, France) مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه گیری و بحث:

طیف سنجی اشعه ماوراء بنفش

پودر نانوذره پلاتین در آب یون زدایی شده پراکنده شده و توسط دستگاه طیف سنج اشعه ماوراءبنفش در طیف ۳۳۰ نانومتر پیک جذبی را نشان داد (تصویر ۱).

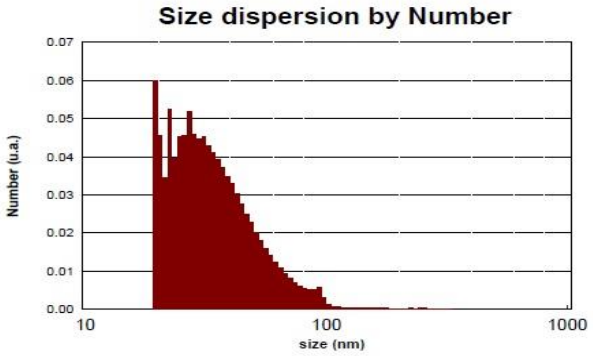


تصویر۱- بررسی جذب نانوذره پلاتین حاصل از عصاره عاری از سلول استرپتومایسس توسط دستگاه طیف سنجی ماوراءبنفش

پراکندگی نور دینامیکی (DLS)

[2] Dynamic Light Scattering

نتایج دستگاه DLS، میانگین سایز نانوذرات پلاتین سنتز شده را حدود ۳۶ نانومتر نشان داد (تصویر ۲)



تصویر۲- بررسی اندازه نانوذرات پلاتین تولید شده به کمک باکتری استرپتومایسس به روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS)

در این پژوهش با استفاده از باکتری استرپتومایسس جداسازی شده از خلیج فارس تولید نانوذرات پلاتین (PtNP) انجام پذیرفت. با مشاهده پیک در طول موج ۳۳۰ نانومتر در نتایج طیف سنجی UV-vis سنتز نانوذرات پلاتین تایید شد. نتایج DLS نشان داد نانوذرات تشکیل شده منودیسپرس[3] نیستند و طیف اندازه این نانوذرات از ۲۰ تا ۶۰۰ نانومتر بود اما بیشترین تعداد نانوذرات اندازه‌ای بین ۳۶-۳۰ نانومتر داشتند. با وجود پایداری بالا، نانوذرات زیستی مونودیسپرس نبوده و سرعت سنتز در این روش آهسته است. برای غلبه بر این مشکلات، عوامل متعددی مانند روش‌های کشت میکروبی و تکنیک‌های استخراج باید بهینه سازی شوند.

تاکنون گونه‌های متعددی از باکتری‌ها برای سنتز زیستی نانوذرات پلاتین مورد بررسی قرار گرفته‌اند. به عنوان مثال، در سال ۲۰۱۰ Ridin و همکاران با استفاده از مجموعه‌ای از باکتری‌های احیا کننده سولفات موفق به تولید نانوذره پلاتین با اندازه ۳۰۰-۵۰ نانومتر شدند (۹). همچنین در مطالعه‌ای دیگر از باکتری *Pseudomonas aeruginosa* برای این منظور استفاده کردند (۱۰). برخی از گونه-های باکتری که در مطالعات دیگر برای سنتز نانوذرات پلاتین مورد استفاده قرار گرفته‌اند عبارت‌اند از: *Plectonema boryanum* (۶)، *Shewanella algae* (۵)، *Escherichia coli* (۱)، *Acinetobacter Calcoaceticus* (۳). در این تحقیق باکتری جنس استرپتومایسس از گروه اکتینومیست‌ها برای اولین بار برای بیوسنتز پلاتین مورد استفاده قرار گرفت.

منابع:

1-**Attard, G., Casadesús, M., Macaskie, L. E., & Deplanche, K. (2012)**. Biosynthesis of platinum nanoparticles by Escherichia coli MC4100: can such nanoparticles exhibit intrinsic surface enantioselectivity? *Langmuir*, *28*(11), 5267-5274 .

2-**Balows, A., Trüper ,H. G., Dworkin, M., Harder, W., & Schleifer, K.-H. (1992)**. The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications: *Springer Science & Business Media*. new york, p. ۱۶۸.

[3] Monodisperse

3-Gaidhani, S. V., Yeshvekar, R. K., Shedbalkar, U .U., Bellare, J. H., & Chopade, B. A. (2014). Bio-reduction of hexachloroplatinic acid to platinum nanoparticles employing Acinetobacter calcoaceticus. *Process Biochemistry*, *49*(12), 2313-2319 .

4-Husseiny, M., El-Aziz, M. A., Badr, Y., & Mahmoud, M .(2007) . Biosynthesis of gold nanoparticles using Pseudomonas aeruginosa. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *67*(3-4), 1003-1006 .

5-Konishi, Y., Ohno, K., Saitoh, N., Nomura, T., Nagamine, S., Hishida, H., Takahashi, Y., Uruga, T. (2007). Bioreductive deposition of platinum nanoparticles on the bacterium Shewanella algae. *Journal of biotechnology*, *128*(3), 648-653 .

6-Lengke, M. F., Fleet, M. E., & Southam, G. (2006). Synthesis of platinum nanoparticles by reaction of filamentous cyanobacteria with platinum (IV)− chloride complex. *Langmuir*, *22*(17), 7318-7323 .

7-Masoudi, M., Mashreghi, M., Goharshadi, E., & Meshkini, A. (2018). Multifunctional fluorescent titania nanoparticles: green preparation and applications as antibacterial and cancer theranostic agents. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *46*(sup2), 248-259 .

8-Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*, *156*(1-2), 1-13 .

9-Riddin, T ,.Gericke, M., & Whiteley, C. (2010). Biological synthesis of platinum nanoparticles: effect of initial metal concentration. *Enzyme and Microbial Technology*, *46*(6), 501-505 .

10-Srivastava, S. K., & Constanti, M. (2012). Room temperature biogenic synthesis of multiple nanoparticles (Ag, Pd, Fe, Rh, Ni, Ru, Pt, Co, and Li) by Pseudomonas aeruginosa SM1. *Journal of Nanoparticle Research*, *14*(4), 831 .

11-Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *6*(2), 257-262 .

Biological synthesis of platinum nanoparticles using actinomycetes isolated from Persian Gulf

Mohammad Hasan Mollaei[1], Mansour Mashreghi*[,1,2,3] , Maryam M. Matin[1,4,5] Bahar Shahnavaz[1]

1. Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Industrial Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Center of Nano Research, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4. Stem Cell and Regenerative Medicine Research Group, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran
5. Novel Diagnostic and Therapeutics Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

E-mail: mollaei721@gmail.com

Abstract

Microbial synthesis of nanoparticles is a green approach that interconnects nanotechnology and microbial biotechnology. The most common methods for synthesizing platinum nanoparticles are chemical techniques that are generally inexpensive and with a high volume of production. However, the need for toxic solvents in the production of nanoparticles limits their potential use in medical applications. Therefore, a green and non-toxic approach to produce metal nanoparticles is needed so that they can be used in a wide range of fields. This goal can be achieved using biological methods. The main objective of this study was to investigate the ability of actinomycetes to product PtNP for the first time. Characterization of particles was performed using UV-vis spectroscopy and dynamic light scattering (DLS). Synthesis was carried out using cell lysis supernatant. Sediment formation and obsorbance at 330nm as revealed by UV-vis confirmed the formation of platinum nanoparticles, moreover, the results of DLS analysis indicated that platinum nanoparticle had an average size of 36 nm. In general, the results showed that actinomycetes can synthesize platinum nanoparticles. Due to the method used in this study and the use of environmentally friendly and safe materials, these nanoparticles can be considered a suitable candidate for use in medical, antimicrobial and anticancer applications in the future.

Keywords: biologycal synthesis, platinum nanoparticle, actinomycetes