

Investigating the Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles Synthesized by Bacteria Isolated From Agricultural Soils of Kerman, Iran

Alieh Hoseynzadeh, Mouj Khaleghi, Hoseynali Sasan

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2017/07/01

Accepted: 2017/09/17

Available online: 2017/11/20

Article Subject:

Antimicrobial Substance

IJMM 2017; 11(5): 136-148

Corresponding author:

Mouj Khaleghi

Department of Biology,
Faculty of Science, Shahid
Bahonar University of
Kerman, Kerman, Iran

Tel: 034-31322046

Email:

m.khaleghi@uk.ac.ir

Abstract

Background and Aims: The use of microorganisms in the synthesis of metal nanoparticles is known as an eco-friendly method. Moreover, because of the ability of microorganisms to synthesize nanoparticles of various sizes, shapes and morphologies, this method has gained extreme attentions in recent years. The aim of this study was, therefore, to investigate the antimicrobial effects of silver nanoparticles synthesized by bacteria isolated from agricultural soils of Kerman, Iran.

Materials and Methods: This study was carried out in 2014. Silver nanoparticles were characterized by SEM, EDS and XRD analyzes. The antimicrobial effects of silver nanoparticles were also assessed against some pathogenic bacteria.

Results: Of the 40 silver nanoparticle producing bacteria, the strains that were able to produce silver nanoparticles with high antimicrobial activity yielded under different environmental conditions, were selected. The results of scanning electron microscopy (SEM) confirmed the presence of silver nanoparticles with a spherical shape. EDS analysis showed that silver content of the particles was about 60 wt %. Sequence alignment and phylogenetic tree results showed that M9 and B7 strains are closely related to *Bacillus cereus* and *Pseudomonas argentinensis*, respectively, with 99% homology.

Conclusions: The results showed that the M9 and B7 strains can synthesize silver nanoparticles with high antimicrobial effects under different environmental conditions.

KeyWords: *Biosynthesis, Silver nanoparticles, Bacillus Cereus, Pseudomonas, Antimicrobial effect*

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Hoseynzadeh A, Khaleghi M, Sasan H. Investigating the Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles Synthesized by Bacteria Isolated From Agricultural Soils of Kerman, Iran . Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (5) :136-148



بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره تولید شده توسط باکتری‌های جداسازی شده از خاک‌های

کشاورزی استان کرمان

عالیه حسین‌زاده، موج خالقی، حسینعلی ساسان

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: استفاده از میکروارگانیسم‌ها در تولید نانوذرات فلزی روش مناسبی برای حفظ محیط زیست به شمار می‌آید. از سویی دیگر به این روش به دلیل توانایی میکروارگانیسم‌ها در تولید نانوذرات با اندازه‌ها، شکل‌ها و مورفولوژی‌های متفاوت در سال‌های اخیر بسیار توجه شده است. با توجه به این ویژگی‌ها، هدف از اجرای این پژوهش، بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره تولید شده توسط باکتری‌های جداسازی شده از خاک‌های کشاورزی استان کرمان است.

مواد و روش کار: این پژوهش در سال ۱۳۹۳ انجام شد. نانوذرات نقره تولیدی، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی و آنالیزهای EDS و XRD ارزیابی شدند و اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره تولید شده نیز بر روی برخی از باکتری‌های بیماری‌زا بررسی شد.

یافته‌ها: از بین ۴۰ باکتری تولیدکننده نانوذرات نقره، سویه‌هایی که توان تولید نانوذرات نقره با اثرات ضد میکروبی بالا و تولید شده در شرایط محیطی بودند، انتخاب شدند. نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی، وجود نانوذرات نقره با اشکال کروی را تأیید کرد. همچنین آنالیز EDS نشان داد که میزان نقره شناسایی شده در ذرات، نزدیک به ۶۰ درصد وزنی است. نتایج به دست آمده از تطبیق توالی و درخت فیلوژنتیکی نشانگر آن بود که سویه‌های M9 و B7 به ترتیب به باکتری *باسیلوس سرئوس* و *سودوموناس آرجنتیننسیس* به میزان ۹۹٪ شباهت دارند.

نتیجه‌گیری: نتایج بیانگر آن است که سویه‌های M9 و B7 قادر به تولید نانوذرات نقره در شرایط مختلف محیطی با اثر ضد میکروبی بالا هستند.

کلمات کلیدی: تولید زیستی، نانوذرات نقره، *باسیلوس*، *سودوموناس*، اثر ضد میکروبی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۱۰

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۶

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۸/۲۹

موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM1396;11(5):136-148

نویسنده مسئول:

موج خالقی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان،

کرمان، ایران

تلفن: ۰۳۴۳۱۳۲۲۰۴۶

پست الکترونیک:

m.khaleghi@uk.ac.ir

مقدمه

در موجودات پرسلولی مانند گیاهان تا موجودات تک‌سلولی مانند باکتری‌ها وجود دارد (۳-۶).

بخش مهمی از پژوهش‌های نانوبیوتکنولوژی، مربوط به بیوسنتز نانوذرات در اندازه و شکل‌های متفاوت، با کاربردهای مختلف است. امروزه کاربرد نانوذرات فلزی در بیوتکنولوژی، تحقیقات زیست‌دارویی، و علوم داروشناسی و مهندسی به صورت تصاعدی رو به رشد است. تولید زیستی نانوذرات فلزی باعث فراهم آمدن گستره وسیعی از روش‌های ارزان قیمت و نیز بی‌خطر برای محیط زیست شده است (۷). در این میان نانوذرات نقره و طلا، به دلیل اندازه و شکل منحصر به فرد و نیز کاربردهای بالقوه آن‌ها در زمینه‌های پزشکی، علوم دارویی و مهندسی، بیشتر مورد توجه هستند (۸، ۹). از دیرباز از فلز نقره استفاده‌های گوناگونی

امروزه نانوذرات فلزی که با روش‌های گوناگون سنتز می‌شوند، در زمینه‌های مختلف علمی و صنعتی کاربرد فراوانی دارند (۱). در فناوری نانو، به دنبال کاهش اندازه و حجم ذرات، افزایش سطح آن‌ها صورت می‌گیرد و این موجب می‌شود که اتم‌های واقع در سطح، بر خواص فیزیکی ذرات تأثیر بیشتری داشته باشند و واکنش‌پذیری نانوذرات افزایش یابد. از طرف دیگر با افزایش سطح ذرات، فشار سطحی نیز تغییر می‌کند و منجر به تغییر فاصله بین ذرات و یا فاصله بین اتم‌های ذرات می‌شود (۲). در حال حاضر در سنتز نانوذرات از روش‌های فیزیکی، شیمیایی و به‌ویژه زیستی استفاده می‌شود. در این میان به تولید زیستی نانوذرات توسط موجودات زنده توجه شده و به‌عنوان روشی سازگار با محیط زیست شناخته شده است. توانایی تولید نانوذرات

باکتری‌های مختلف مانند *اشریشیا کلی* و *اسپوروسارسینا کرینسیس* نانوذرات فلزی نقره و طلا را تولید کنند (۸، ۹)؛ Saravanan و همکاران نیز از مایع رویی کشت *باسیلوس مگاتریوم* برای تولید نانوذرات نقره به صورت برون‌سلولی بهره بردند (۱۸). Das و همکاران نیز نانوذرات نقره را با استفاده از مایع رویی کشت *باسیلوس سرئوس* سویه CS11 تولید کردند (۳). Pourali و همکاران توانستند تولید نانوذرات نقره را به صورت بیوسنتز برون‌سلولی از باکتری‌های جداسازی شده از خاک انجام دهند (۴). Zaki و همکاران با استفاده از سویه‌های مختلف باکتریایی از جمله *اشریشیا کلی*، *اسینتوباکترها* و *باسیلوس مگاتریوم*، توانستند به تولید نانوذرات نقره دست یابند (۱۹). همچنین بر اساس مدارک موجود، مشخص شده که نانوذرات نقره تولید شده توسط باکتری‌های مختلف به دلیل شکل و اندازه متفاوتی که دارند، اثرات ضد میکروبی متفاوتی را از خود نشان می‌دهند (۹، ۱۸، ۱۹، ۸، ۴، ۳). به همین دلیل با توجه به موارد گفته شده، در این پژوهش، تولید زیستی نانوذرات نقره توسط باکتری‌های بومی جداسازی شده از خاک‌های کشاورزی استان کرمان بررسی شده است و خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره تولید شده علیه برخی از سویه‌های باکتریایی بیماری‌زای استاندارد و جداسازی شده از نمونه‌های بالینی نیز ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

گردآوری نمونه‌ها و جداسازی باکتری‌ها

نمونه‌برداری و کشت نمونه‌ها بر اساس روش ذکر شده توسط Das و همکاران (۲۰۱۴) با یک سری تغییرات صورت گرفت (۳). نمونه‌های خاک زمین‌های کشاورزی از شهرستان‌های کرمان، بم، شهربابک و ارزوئیه در سطح استان کرمان گردآوری شدند. پس از کنار زدن ۵ سانتی‌متر از سطح خاک، نمونه‌های خاک برداشته و در ظروف بسته استریل نهاده شد و به آزمایشگاه انتقال یافت. سپس از هر یک از نمونه‌های خاک دو رقت پی‌درپی (10^{-1} و 10^{-2}) تهیه شد و هریک از رقت‌ها در محیط کشت Nutrient agar (Merck) در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت کشت شدند. هر یک از کلنی‌ها بر اساس اندازه، رنگ و شکل آن، ایزوله و کشت خالص از آن‌ها تهیه شد. سپس در محیط حاوی ۳۰٪ گلیسرول در ۲۰- درجه سلسیوس برای انجام آزمایشات بعدی ذخیره شدند.

غربال‌گری باکتری‌های مولد نانوذرات نقره

برای بررسی تولید نانوذرات نقره توسط هر یک از باکتری‌های جداسازی شده، سویه‌های باکتریایی به‌طور جداگانه

می‌شده است؛ مثلاً تهیه آلیاژهای دندانی، عکاسی، ابزار آشپزخانه و یا ساخت جواهرات. همچنین به دلیل خاصیت ضد میکروبی نقره، این فلز برای درمان عفونت‌های باکتریایی به کار می‌رفته است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که فعالیت ضد میکروبی نقره به شدت به برهم‌کنش این ماده با گروه تیولی وابسته است. نقره جلوی تقسیم سلولی را می‌گیرد و پوشش سلولی را تخریب می‌کند. سلول‌های باکتری تحت تأثیر نقره بزرگ می‌شوند و غشای سیتوپلاسمی، محتویات سیتوپلاسمی و لایه بیرونی سلول دچار مشکلات ساختاری می‌شوند (۱۰)، اما با رشد استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی ضد میکروبی، استفاده از نقره محدود شد (۹، ۱۱). با این حال امروزه به نانوذرات نقره نسبت به نقره و مشتقات آن توجه بیشتری می‌شود؛ زیرا روشن شده که اثرات ضد میکروبی، ضد بیوفیلمی، ضد التهابی و ضد سرطانی این نانوذرات بسیار زیاد است (۸).

فناوری نانو ذره نقره باعث به وجود آمدن انقلابی شگرف در مواد ضد میکروبی شده است. با توجه به گزارش‌های تحقیقاتی، نانونقره یکی از مقوله‌هایی است که به سرعت در بازار و صنعت نانوبیوتکنولوژی نمایان شده، رشد کرده و فعالیت ضد باکتریایی قوی آن موجب شده که بسیاری به گسترش محصولات نانونقره روی آورند. از نانو ذره نقره به‌عنوان دارو می‌توان در درمان بیماری‌های پوستی، انواع جراحات، سوختگی‌ها، و عفونت‌های باکتریایی و قارچی استفاده کرد (۱۲). از طرف دیگر در بسیاری از مطالعات مشخص شده است که نانوذرات نقره با اختلال در انتقال پیام سلولی، باعث ایجاد اختلال در شبکه ارتباطی سلولی می‌شوند. همچنین، نانوذرات نقره در آسیب به DNA و در افزایش بیان مولکول پروتئینی کاسپاز 3 و به راه انداختن مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوزیس) نقش دارند و بنابراین منجر به میانجی‌گری و تکثیر سیگنال‌های مرگ می‌شوند. این امر در درمان سرطان بسیار پراهمیت است و امروزه تحقیقاتی بر روی استفاده از نانوذرات نقره در درمان سرطان‌ها انجام گرفته است (۱۳).

سنتز میکروبی نانوذرات فلزی می‌تواند به صورت درون‌سلولی و یا برون‌سلولی انجام شود (۱۶-۱۴). سنتز نانوذرات به صورت داخل‌سلولی، به روش‌های مناسب برای لیز سلولی نیازمند است (۱۷)، در صورتی که بیوسنتز با روش برون‌سلولی، ارزان‌تر و ساده‌تر است (۳). به همین دلیل در بسیاری از مطالعات، بیوسنتز نانوذرات به صورت برون‌سلولی انجام شده است، به طوری که محققین توانستند با استفاده از مایع رویی کشت

اسپکتروفوتومتری UV-vis

نانوذرات نقره، امواج الکترومغناطیس را در ناحیه مرئی طیف (۴۷۰-۴۰۰) نانومتر جذب می‌کنند (۱). طیف‌سنجی UV-vis در طول موج ۷۰۰-۳۰۰ نانومتر انجام شد. برای انجام این کار، ۷۰۰ میکرولیتر از نمونه تغییررنگ‌داده درون کووت ریخته شد و توسط اسپکتروفوتومتر (Shimadzu Lambda UV mini-1240 instrument) در دامنه ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر بررسی شد. از محیط کشت استریل به همراه نیترا نقره به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

بررسی تشکیل رسوب AgCl در حضور NaCl

برای بررسی اولیه تولید نانوذرات نقره به محلول تغییررنگ‌یافته حاوی این ذرات، NaCl با غلظت ۰/۵ مولار افزوده شد. تشکیل نشدن رسوب شیرین‌رنگ AgCl نشانه حضور احتمالی نانوذرات نقره است (۲۰).

بررسی تشکیل بلور توسط میکروسکوپ پلاریزان

حضور بلورهای نانوذرات نقره تولیدشده توسط مایع روئی باکتریایی، با روش Al-Qadi (۲۰۰۹) و البته با کمی تغییرات انجام شد (۲۱). برای این منظور ۲۰۰ میکرولیتر نمونه تغییررنگ‌یافته حاوی نانوذرات نقره بر روی اسلاید شیشه‌ای قرار داده شد و توسط میکروسکوپ پلاریزان (OLYMPUS-BH₂) مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده بلورهای سبزرنگ تأیید اولیه حضور نانوذرات نقره بود (۲۱).

اندازه‌گیری pH محلول نانوذرات نقره

در مورد تمامی تیمارهای موردنظر که رنگ خرمایی داشتند، و احتمال نانوذرات نقره در آن‌ها وجود داشت، در چهار بازه زمانی (پیش از تلقیح، پس از ۲۴ ساعت، پس از ۴۸ ساعت و پس از ۷۲ ساعت)، اندازه‌گیری pH انجام شد.

بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره تولیدشده

برای بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره تولیدشده، از روش انتشار در چاهک استفاده شد. برای این منظور میکروارگانیزم‌های استاندارد، *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1112، *سراسیا مارسسنس* PTCC 1627، *اشریشیا کلی* O157H7، *باسیلوس سرئوس* PTCC 1015، *باسیلوس سوبتیلیس* PTCC 1023، *کاندیدا آلبیکنس* PTCC 5027 و سویه‌های جداشده از نمونه‌های بالینی *سودوموناس اثرئوزینوز*، *کلبسیلا پنومونیه* و *پروتئوس میرابیلیس* بررسی شدند.

در ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت Luria-Bertani (LB- Merck)، به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با دور ۱۲۰ در شرایط هوای کشت شدند. سپس در ۴۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و مایع شفاف رویی از توده سلولی جدا شد. برای بررسی توانایی تولید نانوذرات نقره، از رسوب سلولی و مایع رویی کشت استفاده شد و برای بررسی تولید نانوذرات نقره، مایع رویی کشت از فیلترهای ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد و همچنین توده سلولی در شرایط استریل سه بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. سپس مایع رویی کشت (۱:۱ حجمی/ حجمی) و توده سلولی باکتریایی (۱۰^۸cfu/mL) هر یک جداگانه در معرض محلول نیترا نقره با غلظت ۱ و ۱۰ میلی‌مولار به مدت ۲۴-۴۸ ساعت، در دمای ۳۰ سلسیوس در تاریکی انکوبه شدند. در صورت دیده شدن تغییر رنگ در محیط کشت، هر یک از نمونه‌ها از نظر تولید نانوذرات بررسی شدند. از نیترا نقره ۱۰ میلی‌مولار برای کنترل منفی استفاده شد (۳، ۹).

بررسی تولید نانوذرات نقره در شرایط مختلف

تولید نانوذرات نقره در شرایط روشنایی و تاریکی: تولید نانوذرات نقره در حضور نیترا نقره ۱۰ میلی‌مولار در تاریکی/ نور با استفاده از توده سلولی و مایع شفاف رویی هر یک از باکتری‌ها به‌طور جداگانه ارزیابی شد (۳).

تولید نانوذرات نقره در دماهای مختلف

تولید نانوذرات نقره در حضور محلول ۱۰ میلی‌مولار نیترا نقره در تاریکی و نور و در دمای ۳۰، ۴۰ و ۶۰ سلسیوس، با استفاده از توده سلولی و مایع شفاف رویی هر باکتری به‌طور جداگانه ارزیابی شد (۳). از کنترل منفی (نیترا نقره ۱۰ میلی‌مولار) در کنار همه نمونه‌های آزمون‌شده استفاده شد.

آزمون‌های تأییدی تولید نانوذرات نقره

همان‌گونه که پیش‌تر اشاره شد، تأیید اولیه تولید نانوذرات نقره بر اساس تغییر رنگ محیط آزمون به دلیل تغییر ماهیت مواد به‌صورت نانوذره است (۲۰، ۲۱، ۱). برای اطمینان از تولید این نانوذرات، آزمون‌های تأییدی بر روی نمونه‌های باکتریایی‌ای که مشکوک به تولید نانوذرات نقره بودند، صورت گرفت تا از حضور و تولید نانوذرات فلزی در مقایسه با محلول نیترا نقره اطمینان حاصل شود. از جمله این آزمون‌های تأییدی، بررسی جذب نانوذرات نقره در ناحیه مرئی طیف (۴۷۰-۴۰۰) نانومتر، تشکیل رسوب AgCl در حضور NaCl و بررسی تشکیل بلور توسط میکروسکوپ پلاریزان بود.

افزودیم. میکروتیتر پلیت‌ها در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند. آنگاه حداقل غلظت مهارکننده و کشنده تعیین شد.

شناسایی سویه‌های تولیدکننده نانوذرات نقره

برای شناسایی اولیه جدایه‌های باکتریایی موردنظر، ابتدا بر اساس واکنش گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی اکسیداز، کاتالاز، حرکت، اوره، تولید اندول، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین و TSI طبقه‌بندی انجام گرفت. سپس سویه‌های متفاوت با روش مولکولی شناسایی شدند.

شناسایی مولکولی باکتری مولد نانوذرات نقره

پس از تأیید حضور نانوذرات نقره، باکتری تولیدکننده نانوذرات شناسایی شد. بدین گونه که در آغاز استخراج DNA ژنومی از باکتری موردنظر با روش فنل-کلوفرم (۲۲) صورت گرفت. در این مطالعه برای تکثیر ژن ناحیه 16S rRNA باکتریایی از واکنش زنجیره پلی‌مرز توسط آغازگرهای بالادست (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و پایین‌دست (5'-GACGGCGGTGTGTACAA-3') U1390R استفاده شد. واکنش زنجیره پلی‌مرز بر طبق برنامه جدول ۱ انجام شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکننده و کشنده نانوذرات نقره

تولیدشده

برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) و کشنده (MBC) نانوذرات نقره تولیدشده، از روش میکرودايلوشن در میکروتیتر پلیت‌های ۹۶ چاهک استفاده شد؛ در آغاز نانوذرات نقره را از یون‌های اضافی نیترات نقره، آنزیم‌ها و دیگر عوامل موجود در مایع روئی کشت باکتریایی که ممکن است با نتایج تداخل داشته باشند، شستشو دادیم. بنابراین یک میلی‌لیتر از مایع روئی باکتریایی حاوی نانوذرات نقره (Ag Nano-Particles: AgNPs) به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل اضافه گردید و در ۲۰۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب به دست آمده را سه بار با استفاده از یک میلی‌لیتر بافر فسفات استریل (PBS) شسته دادیم (۹، ۴، ۱)، سپس نانوذرات نقره به دست آمده را در دمای ۶۰°C به مدت یک شب خشک کردیم (۱۹). از نانوذرات نقره به دست آمده رقت‌های پی‌درپی (در محدوده ۱۰۰-۱۹۵ میکروگرم/میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس از کشت شبانه باکتری‌های بیماری‌زا غلظت قابل مقایسه با کدورت نیم مک فارلند به نسبت ۱:۱۰۰ به چاهک‌ها

جدول ۱. برنامه زنجیره پلی‌مرز

مرحله	دما (سلسیوس)	زمان
واسرشت اولیه	۹۵	۵ دقیقه
واسرشت	۹۵	۱ دقیقه
اتصال آغازگر	۶۰	۱ دقیقه
گسترش	۷۲	۱ دقیقه
گسترش نهایی	۷۲	۴ دقیقه

برنامه تکثیر DNA در ۳۵ چرخه حرارتی انجام گرفت.

بررسی خصوصیات نانوذرات نقره تولیدشده

میکروسکوپ الکترونی روبشی (Microscope- SEM Scanning Electron) نمونه‌هایی که در طی آزمون‌های اولیه از نظر تولید نانوذرات نقره مثبت بودند، برای عکس‌برداری توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی انتخاب و به مرکز متالورژی رازی (تهران) فرستاده شدند. در این مطالعه از دستگاه High resolution Schottky FE-SEM مدل MIRA 3 ساخت شرکت TESCAN مجهز به طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (Energy-dispersive X-ray spectroscopy -EDS) استفاده شد. برای تصویربرداری و آنالیز عنصری از محلول موردنظر، ۱۰۰ میکرولیتر توسط سمپلر برداشته و بر روی یک قرص استاندارد از مانت

برای تأیید تکثیر DNA، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ جریان یافت (مارکر استفاده شده ۱۰۰ bp بود که از شرکت سیناکلون تهیه شد) و پس از اطمینان از حضور باند ۱۴۰۰ bp، محصول PCR توسط شرکت بیونیر (کره) تعیین توالی شد. همانندی توالی نوکلئوتیدهای ژن 16S rDNA به کمک نرم‌افزار BLAST با توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی ژنوم بانک ژنی مقایسه شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 درخت فیلوژنی مربوط ترسیم شد.

بر طبق نتایج اولیه تولید نانوذرات نقره بر اساس تغییر رنگ محیط توسط مایع رویی کشت (شکل ۱)، ۴۰ سوبه باکتریایی به عنوان تولیدکننده انتخاب شدند. گفتنی است تغییر رنگ محیط توسط هیچ‌یک از توده‌های سلولی باکتریایی صورت نگرفت.

تأثیر دما و نور بر تولید نانوذرات نقره

نتایج حاصل از بررسی اثر نور بر تولید نانوذرات نقره توسط سویه‌های مولد نشان دادند که از بین ۴۰ سوبه تولیدکننده، تنها ۲۸ سوبه قادر به تولید نانوذرات نقره هم در تاریکی و هم در روشنایی بودند.

مطالعه تأثیر سه دمای ۳۰، ۴۰ و ۶۰ درجه سلسیوس بر روی ۲۸ سوبه انتخابی بالا، انجام شد. از بین آن‌ها تنها ۱۲ سوبه (۴۳٪) قادر به تولید نانوذرات نقره در هر سه دما بودند (جدول ۲). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد که ۱۰۰٪ سوبه‌ها در دمای ۳۰°C، ۵۳٪ در دمای ۴۰°C و ۴۳٪ در ۶۰°C قادر به تولید نانوذرات نقره بودند.

جدول ۲. تغییر رنگ ایجادشده در محیط حاوی نیترات نقره توسط

جدایه‌ها در شرایط دمایی مختلف

سوبه‌های باکتریایی	۳۰ °C	۴۰ °C	۶۰ °C
k1	+	+	+
K4	+	+	-
K2	+	+	+
K3	+	+	+
K5	+	-	-
K6	+	-	-
B4	+	+	+
B5	+	+	+
B1	+	-	-
B6	+	+	+
B7	+	+	+
B2	+	-	-
B3	+	-	-
B8	+	-	-
M1	+	+	+
M2	+	-	-
M8	+	+	+
M3	+	-	-
M9	+	+	+
M10	+	+	+
M4	+	-	-
M5	+	+	+
M6	+	-	-
M7	+	-	-
O11	+	+	+
O13	+	-	-
O14	+	-	-
O12	+	+	+

هادی (هدایت توسط کربن) قرار داده شد. پس از آن مانت هادی در دمای محیط قرار داده شد تا نمونه رسوب دهد و رطوبت آن خشک شود.

آنالیز الگوی پراش اشعه X (X-ray diffraction analysis- XRD)

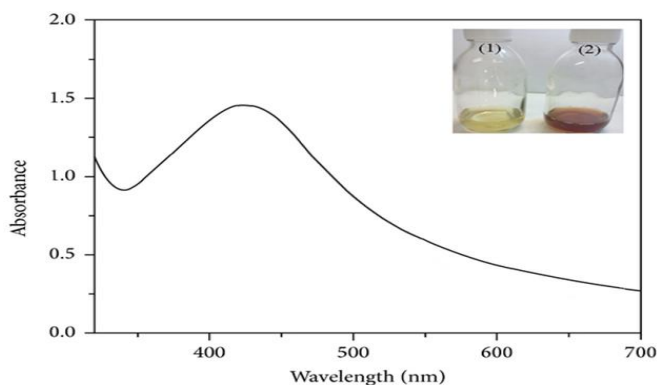
نمونه موردنظر برای آنالیز دستگاهی XRD به آزمایشگاه تخصصی کفا (شرکت کارآفرینی و فن‌آوری ایران- تهران) فرستاده شد. در این رابطه نمونه به‌صورت پودر بسیار ریز درآمد و در معرض بمباران پرتوهای اشعه X قرار داده شد که حاصل کار یک الگوی پراش یا دیفراکتوگرام بود. هر نمونه بلورین، الگوی پراش منحصربه‌فردی دارد که با مقایسه آن با الگوهای پراش استاندارد، نوع ترکیب شناسایی می‌شود.

محاسبات آماری

همه آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شدند. محاسبات آماری مربوط به این تحقیق توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ و آزمون آماری Duncan یک‌طرفه و آزمون ANOVA، تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

جداسازی باکتری‌های تولیدکننده نانوذرات نقره نمونه‌ها از خاک مزرعه‌های کشاورزی و باغ‌های چهار شهر استان کرمان در شرایط استریل گردآوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. پس از تهیه رقت‌های پی‌درپی و کشت، هر یک از کلنی‌ها جداسازی و کشت خالص تهیه شد و ۹۵ نوع کلنی باکتریایی مختلف به دست آمد.



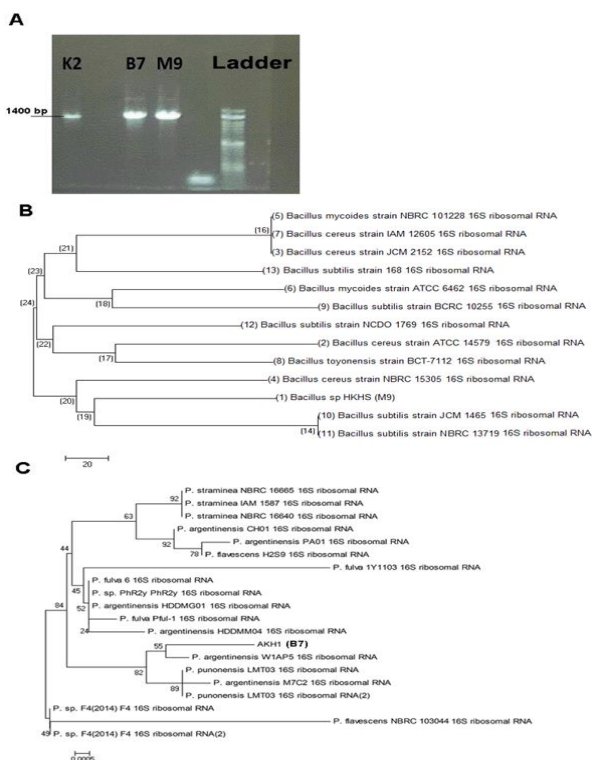
شکل ۱. تغییر رنگ محیط LB در اثر تولید نانوذرات نقره توسط مایع رویی کشت؛ (۱) محیط کشت استریل با حضور نیترات نقره (به‌عنوان کنترل منفی)، (۲) تغییر رنگ محیط حاوی نیترات نقره و مایع رویی کشت باکتریایی پس از ۲۴ ساعت. نتایج اسپکتروفوتومتری به‌دست‌آمده برای نانوذرات نقره که دارای بیشینه جذب در حدود ۴۲۰ نانومتر است.

آن‌ها نیز هستند. حداقل غلظت مهارکننده و کشنده نانوذرات نقره برای باکتری‌های بیماری‌زا در محدوده ۲۵-۱/۵۶ میکروگرم/ میلی لیتر است.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی نانوذرات نقره نتایج تعیین MIC و MBC نانوذرات نقره تولیدشده توسط سویه‌های K1، K2، B7 و M9 بر باکتری‌های بیماری‌زا در جدول ۴ آمده است. نتایج به روشنی نشان می‌دهند که نانوذرات نقره نه تنها بر روی رشد باکتری‌ها اثر مهارکنندگی دارند، بلکه کشنده

جدول ۴. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) نانوذرات نقره تولیدشده، برای میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا (میکروگرم/ میلی لیتر)

نانوذرات سنتز شده توسط سویه‌های مولد								میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا
M9		B7		K2		K1		
MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	
۳/۱۲۵	۱/۵۶	۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۱/۵۶	<i>استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1112</i>
۱۲/۵	۶/۲۵	۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	<i>سراشیا مارسنس PTCC 1627</i>
۶/۲۵	۳/۱۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	<i>اشریشیا کلی H7 O157</i>
۶/۲۵	۳/۱۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	<i>باسیلوس سرئوس PTCC 1015</i>
۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	<i>باسیلوس سوبتیلیس PTCC 1023</i>
۶/۲۵	۳/۱۲۵	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	<i>کاندیدا آلبیکنس PTCC 5027</i>
۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	<i>سودوموناس آئروژینوزا</i>
۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	<i>کلسیلا پنومونیه</i>
۱۲/۵	۶/۲۵	۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	<i>پروتئوس میرابیکس</i>



شکل ۳. (A) محصول PCR پرایمر U1310R و U8F سویه‌های M9، B7 و K2؛ (مارکر ۱۰۰bp). (B) درخت فیلوژنی، نشان‌دهنده ارتباط بین توالی ژن 16S rDNA سویه‌های M9 و B7. (C) اعداد واقع در گره کلادها نمایانگر ارزش (bootstrap 100%) است.

شناسایی سویه‌های تولیدکننده نانوذرات نقره در حد

جنس و گونه

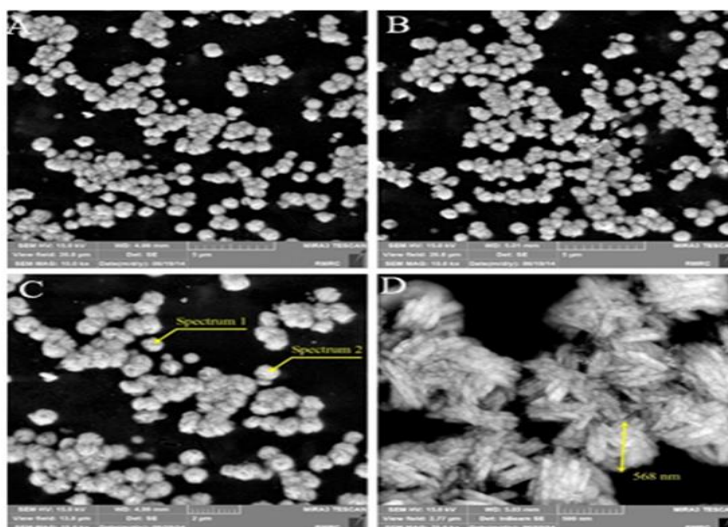
بر اساس نتایج حاصل از واکنش گرم و تست‌های بیوشیمیایی مشخص شد که سویه M9 از جنس باسیلوس و سویه‌های K1، K2 و B7 از جنس سودوموناس بودند؛ بنابراین دو سویه M9 و B7 برای شناسایی مولکولی انتخاب شدند. نتایج حاصل از تطبیق توالی و درخت فیلوژنتیکی نشان دادند که سویه‌های M9 و B7 به ترتیب به گونه‌های باکتریایی باسیلوس سرئوس (۹۹٪) و سودوموناس آرژنتیننسیس (۹۹٪) شباهت دارند (نک: شکل ۳B، C).

بررسی خصوصیات نانوذرات نقره تولیدشده

میکروسکوپ الکترونی FE-SEM

شکل ۴، تصاویر FE-SEM از نانوذرات نقره تولیدشده در سه بزرگنمایی ۱۰ kx، ۱۵ kx و ۷۵ kx را نشان می‌دهد. در این تصاویر، چگونگی توزیع، شکل هندسی و ابعاد ذرات به خوبی مشخص هستند. بر اساس نتایج به دست آمده روشن شد که قطر نانوذرات نقره تولیدی در محدوده ۵۰۰-۱۰۰ نانومتر است و این نانوذرات شکلی کروی دارند. در شکل ۴ (D)، چگونگی تجمع نانوذرات نقره سنتز شده نشان داده شده است.

برای آنالیز عنصری ذرات، به صورت تصادفی دو ذره (Spectrum 1، Spectrum 2) انتخاب و با EDS آنالیز شدند.

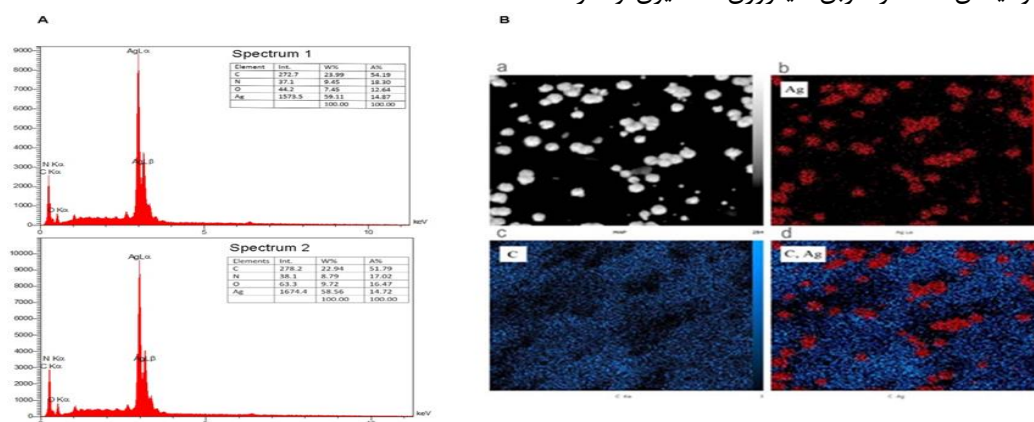


شکل ۴. تصویر میکروسکوپ الکترونی گرفته شده از نانوذرات نقره سنتز شده توسط سوبه M9.

شناسایی شدند. کربن موجود در نتایج EDS مربوط به بستر مانت هادی است. لزوم استفاده از مانت هادی، برای جلوگیری از دشارژ الکترون در سطح نمونه در هنگام تصویربرداری است. میزان نقره شناسایی شده در این دو ذره، نزدیک به ۶۰ درصد وزنی است.

طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS)

برای آنالیز عنصری ذرات، به طور تصادفی دو ذره (نمونه ۱ و نمونه ۲؛ شکل C ۴) انتخاب و با EDS آنالیز شدند. شکل شماره ۵A نتایج آزمون EDS از این دو نقطه را نشان می دهد. در هر دو الگوی انرژی پرتو ایکس، عناصر کربن، نیتروژن، اکسیژن و نقره



شکل ۵. (A) نتایج آزمون طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس نانوذرات تولید شده توسط سوبه M9: (B) نقشه عنصری الگوی پراش اشعه ایکس، (a) نانوذرات تولید شده توسط سوبه M9، (b) توزیع نانوذرات تولیدی، (c) بستر کربنی مانت هادی، (d) تطبیق مکان رسوب نانوذرات نقره بر روی بستر مانت هادی

می دهد. در این تصاویر مکان های حضور عنصر نقره به طور کامل با مکان های رسوب ذرات روی سطح بستر کربنی منطبق است.

بحث و نتیجه گیری

در سال های اخیر به دلیل شیوع عفونت های ناشی از باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک، تحقیقات بسیاری برای ساخت و تولید ترکیبات ضد میکروبی جدید انجام شده است. به همین دلیل یکی از زمینه های پژوهشی که امروزه بدان بسیار توجه می شود، نانوتکنولوژی و نانوبیوتکنولوژی است. سنتز ذرات با ابعاد

الگوی پراش اشعه ایکس (XRD)

الگوی پراش اشعه ایکس نشان داد که نانوذرات سنتز شده توسط سوبه M9، از جنس نقره فلزی هستند. نتایج حاصل، با نتایج به دست آمده به وسیله طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS) هماهنگی داشت.

شکل شماره ۵B نقشه عنصری الگوی پراش اشعه ایکس (XRD-map)، چگونگی توزیع عناصر نقره و کربن را نشان

(۲۰۱۳) نشان دادند که آنزیم نیتراژ ردوکتاز موجود در سوپرناتانت کشت باسیلوس/استروترموفیلوس نقش مهمی در احیاء یون‌های نقره و تشکیل نانوذرات نقره دارد (۲۳).

پس از مشاهده تغییر رنگ محیط از زرد به قهوه‌ای، برای تأیید اولیه تولید نانوذرات نقره توسط جدایه‌ها، جذب نانوذرات نقره در ناحیه مرئی طیف ۴۰۰ تا ۴۷۰ نانومتر، تشکیل نمک AgCl، مشاهده بلورها توسط میکروسکوپ پلاریزان و اثر ضد میکروبی آن‌ها بررسی شد.

بر طبق نتایج اسپکتروفوتومتر UV-vis، یک پیک در حدود ۴۲۰ نانومتر دیده شد که نشانگر حضور نانوذرات نقره بود. Singh و همکاران (۲۰۱۶) و Kalishwaralal و همکاران (۲۰۱۰) در پژوهشی نشان دادند که بیشترین جذب نوری نانوذرات نقره تولید شده توسط اسپوروسارسینا کورینسیس، سویه DC4 و بر روی باکتریوم کازئی به ترتیب در طیف ۴۲۴ و ۴۲۰ نانومتر بود (۱۶، ۹).

بر اساس یافته‌های Levard و همکاران (۲۰۱۳)، مشاهده رسوب سفید AgCl پس از افزودن NaCl در نمونه، حاکی از آن است که در این محیط یا یون نقره وجود دارد و یا Ag^0 به یون نقره اکسید شده است (۲۰). در مطالعه پیش رو، تنها در دو نمونه رسوب سفید AgCl دیده شد.

از طرف دیگر، pH از عوامل دیگری بود که در این پژوهش بررسی شد و مشخص شد که پس از تلقیح مایع روئی باکتریایی به محلول نیتراژ نقره، با گذشت زمان (۷۲-۲۴ ساعت) pH محلول به سمت قلیایی متمایل می‌شود. Sadowski و همکاران (۲۰۱۰) دریافته‌اند که با احیاء نیتراژ نقره شرایط قلیایی ایجاد می‌شود. این امر احتمالاً به دلیل ارتباط احیاء زیستی یون‌های نقره با روند متابولیسمی مصرف نیتراژ توسط نیتراژ ردوکتاز و تبدیل آن به نیتریل و آمونیوم است (۲۹).

امروزه به بسیاری از نانوذرات فلزی از جمله نانوذرات نقره به دلیل طیف اثر ضد میکروبی وسیع بر روی بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و منفی، قارچ‌ها و ویروس‌ها، توجه شده است (۳۰، ۲۷). در این مطالعه بر روی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره تولید شده توسط چهار جدایه K1، K2، B7 و M9 که بر اساس مشاهده بلورهای کریستالی توسط میکروسکوپ پلاریزان، بیشترین میزان بلور را تولید کرده بودند، پژوهش‌هایی انجام گرفت. نتایج این پژوهش‌ها نشان دادند که از بین تمام نمونه‌ها، سویه M9 دارای بیشترین اثر ضد میکروبی است و سویه B7 کمترین اثر ضد میکروبی را دارد. نتایج MIC و MBC نانوذرات

نانومتری با ویژگی‌های ضد میکروبی که با عنوان «نانوآنتی‌بیوتیک» شناخته می‌شوند، در توسعه محصولات دارویی جدید بسیار جالب‌اند (۲۳)؛ زیرا مشخص شده به دلیل کاهش اندازه نانوذرات، سطح تماس این ذرات افزایش می‌یابد و در کمترین غلظت با سطح سلولی باکتریایی واکنش نشان می‌دهند (۴). در حال حاضر روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی برای تولید نانوذرات شناخته شده‌اند (۲۴). در تولید زیستی، ترکیبات بیولوژیکی مختلف از جمله میکروب‌ها کاندیدای مؤثری برای سنتز نانوذرات به شمار می‌آیند. تولید نانوذرات با این روش زیستی، مقرون به صرفه، آسان و سازگار با محیط زیست است (۳). در این مطالعه باکتری‌های مولد نانوذرات نقره از خاک‌های کشاورزی در استان کرمان جداسازی و شناسایی شدند. در غربالگری اولیه، با استفاده از نیتراژ نقره ۱ و ۱۰ میلی‌مولار و مشاهده تغییر رنگ محیط پس از ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۰°C، مشخص شد که ۴۰ سویه قادر به احیاء نیتراژ نقره در هر دو غلظت هستند. افزون بر این، تولید نانوذرات نقره در شرایط نوری و دمایی مختلف (۳۰، ۴۰ و ۶۰ درجه سلسیوس) نیز بررسی شد. در بیشتر مطالعات انجام شده، شرایطی که برای تولید نانوذرات نقره در نظر گرفته شده، تاریکی بوده است؛ زیرا به نظر می‌رسد نور باعث تغییر رنگ نیتراژ نقره از بی‌رنگ به سیاه شود (۱۶، ۹، ۸، ۴). ولی در مطالعات Thomas و همکاران (۲۰۱۴) و Das و همکاران (۲۰۱۴) یکی از شرایط تولید نانوذرات نقره، روشنایی گزارش شده است (۲۵، ۳). از طرف دیگر Singh و همکاران (۲۰۱۳) تولید نانوذرات نقره را توسط سینتوباکتر/کواستیکوس در دماهای ۴ تا ۸۰ درجه سلسیوس بررسی کردند (۲۶). نتایج پژوهش آنان نشان داد که ۱۲ سویه قادر به تولید نانوذرات نقره در تمامی شرایط نوری و دمایی بررسی شده، به صورت برون‌سلولی بودند. مدارک متعددی در دسترس است که نشان می‌دهند سویه‌های مختلف باکتریایی، هم به صورت برون‌سلولی و هم درون‌سلولی، قادر به تولید نانوذرات نقره هستند (۲۷، ۲۳، ۱۹، ۱۶، ۴، ۳). البته هنوز مکانیسم دقیق سنتز برون‌سلولی نانوذرات توسط میکروارگانیسم‌ها شناخته نشده است (۳)، ولی به نظر می‌رسد که میکروارگانیسم‌ها با تولید آنزیم‌های احیاء کننده یون‌های فلزی، مانند نیتراژ ردوکتاز، در احیاء یون‌های فلزی و تولید نانوذرات فلزی نقش دارند. چنانچه این آنزیم‌ها در درون سلول قرار داشته باشند، احیاء به صورت درون‌سلولی و در صورتی که این آنزیم‌ها از داخل سلول به بیرون ترشح شوند، سنتز برون‌سلولی خواهد بود (۲۸). El-Batal و همکاران

اندازه‌های مختلفی از ۴ نانومتر تا ۲۰۰ نانومتر دارند (۳۳، ۲۷، ۱۸، ۳).

نتایج آزمون EDS نشان داد که در هر دو الگوی انرژی پرتوی ایکس، عناصر کربن، نیتروژن، اکسیژن و نقره شناسایی شدند. الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) نیز نشان داد که نانوذرات سنتز شده توسط سوپه M9، از جنس نقره فلزی است. نتایج به دست آمده در این مطالعه با دیگر پژوهش‌ها هماهنگی داشت (۳۳، ۲۷، ۱۹، ۱۶، ۹).

به طور کلی، از نتایج به دست آمده در این مطالعه مشخص شد که نانوذرات نقره تولید شده توسط باکتری‌ها با روش برون سلولی، دارای طیف اثر ضد میکروبی گسترده بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی هستند. همچنین تأثیر نانوذرات تولید شده بر میکروارگانیسم‌ها، وابسته به سوپه میکروبی تولید کننده است. در این پژوهش به علت محدودیت‌های زمانی و مالی، امکان آنالیز تمامی نانوذرات نقره سنتز شده توسط باکتری‌ها فراهم نشد، بنابراین پیشنهاد می‌شود که در آینده افزون بر بررسی ساختاری نانوذرات نقره تولیدی توسط هر یک از میکروارگانیسم‌ها با استفاده از FE-SEM و سایر آنالیزهای مربوطه، اثر این نانوذرات بر سلول‌های جانوری و انسانی نیز ارزیابی شود.

تقدیر و تشکر

از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه شهید باهنر کرمان به دلیل پشتیبانی مالی برای انجام این پژوهش سپاسگزاریم. مقاله پیش رو حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد خانم عالیه حسین زاده در شهریور ماه ۱۳۹۳ است و در بین نویسندگان هیچ تعارض منافی وجود ندارد.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

نقره تولید شده توسط سوپه‌های K1، K2، B7 و M9، بر روی باکتری‌های بیماری‌زا مشخص کردند که نانوذرات نقره نه تنها مهار کننده رشد باکتری‌ها هستند، بلکه کشنده نیز هستند. حداقل غلظت مهار کننده و کشنده نانوذرات نقره بر روی باکتری‌های بیماری‌زا در محدوده ۲۵-۱/۵۶ میکروگرم/ میلی‌لیتر بود. نتایج مشابهی بر اساس مطالعاتی که توسط دیگر پژوهشگران انجام گرفت، نشان داد که نانوذرات نقره تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها، اثر ضد میکروبی وسیع‌الطیفی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی دارند (۳۲، ۳۱، ۲۷، ۸). البته در حال حاضر مکانیسم عمل ضد میکروبی نانوذرات نقره به طور کامل شناخته نشده است، ولی پژوهشگران احتمال می‌دهند که نانوذرات نقره به پروتئین‌های برون سلولی متصل می‌شوند و با ایجاد منافذ در غشاء سلولی، اختلال در واکنش‌های تنفسی، تداخل در همانند سازی DNA و یا تشکیل ترکیبات ضد میکروبی مانند پراکسید هیدروژن، آنیون‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل، به سلول آسیب می‌رسانند (۲۷، ۹). در مطالعات پیشین مشخص شده است که نانوذرات نقره اثر باکتری سیدال قوی‌تری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند (۳۳، ۹). به نظر می‌رسد که میل ترکیبی نقره برای واکنش با بیومولکول‌های حاوی گوگرد و فسفر در سلول بیشتر باشد؛ بنابراین پروتئین‌های حاوی گوگرد در غشاء سلولی و یا در داخل سلول و نیز عناصر در بردارنده فسفر مانند DNA، به عنوان جایگاه انتخابی برای اتصال نانوذرات نقره به شمار می‌آیند (۳۳).

در پژوهش پیش رو، نانوذرات نقره تولید شده توسط سوپه M9 که دارای بیشترین اثر ضد میکروبی بود، با استفاده از TEM و FE-SEM بررسی شد. نتایج نشان دادند که قطر نانوذرات نقره تولیدی در محدوده ۵۰۰-۱۰۰ نانومتر و دارای شکل کروی بودند. در گزارش‌های متعدد مشخص شد که اندازه و شکل نانوذرات نقره تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها، در باکتری‌های گوناگون، متفاوت و متنوع است. نانوذرات نقره تولید شده توسط گونه‌های مختلف باسیلوس، عمدتاً به کروی شکل هستند، ولی

References

1. Krishnaraj C, Jagan E, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan P, Mohan N. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water born pathogens. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;76(1): 50-6.
2. Prasad K, Jha AK, Kulkarni A. *Lactobacillus* assisted synthesis of titanium nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 2007;2(5):248-50.
3. Das VL, Thomas R, Varghese RT, Soniya E, Mathew J, Radhakrishnan E. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS 11 isolated from industrialized area. *3 Biotech* 2014;4(2):121-6.

4. Pourali P, Yahyaei B. Biological production of silver nanoparticles by soil isolated bacteria and preliminary study of their cytotoxicity and cutaneous wound healing efficiency in rat. *J Trace Elem Med Biol* 2016;34:22-31.
5. Kannan N, Selvaraj S, Murty RV. Microbial production of silver nanoparticles. *Dig J nanomater biostruct* 2010;5(1):135-40.
6. Nithya R, Ragunathan R. Synthesis of silver nanoparticle using *Pleurotus sajor caju* and its antimicrobial study. *Dig J nanomater biostruct* 2009;4(4):623-9.
7. Tran QH, Le AT. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology ,applications and perspectives. *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol* 2013;4(3):033001.
8. Kushwaha A, Singh VK, Bhartariya J, Singh P, Yasmeen K. Isolation and identification of *E. coli* bacteria for the synthesis of silver nanoparticles: characterization of the particles and study of antibacterial activity. *Eur J Exp Biol* 2015;5(1):65-70.
9. Singh P, Singh H, Kim YJ, Mathiyalagan R, Wang C, Yang DC. Extracellular synthesis of silver and gold nanoparticles by *Sporosarcina koreensis* DC4 and their biological applications. *Enzyme microb technol* 2016;86:75-83.
10. Lengke MF, Fleet ME, Southam G. Biosynthesis of silver nanoparticles by filamentous cyanobacteria from a silver (I) nitrate complex. *Langmuir* 2007;23(5):2694-9.
11. Prabhu S, Poulouse EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int nano lett* 2012;2(1):32.
12. Sastry M, Ahmad A, Khan MI, Kumar R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr sci* 2003;85(2):162-70.
13. Remya RR, Radhika Rajasree SR, Aranganathan L, Suman TY. An investigation on cytotoxic effect of bioactive AgNPs synthesized using *Cassia fistula* flower extract on breast cancer cell MCF-7. *Biotechnol Rep* 2015; 8: 110-5.
14. Shahverdi AR, Minaeian S, Shahverdi HR, Jamalifar H, Nohi A-A. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: a novel biological approach. *Process Biochem* 2007;42(5):919-23.
15. Jain N, Bhargava A, Majumdar S, Tarafdar J, Panwar J. Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: a mechanism perspective. *Nanoscale* 2011;3(2):635-41.
16. Kalishwaralal K, Deepak V, Pandian SRK, Kottaisamy M, BarathManiKanth S, Kartikeyan B, et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;77(2):257-62.
17. Kalimuthu K, Babu RS ,Venkataraman D, Bilal M, Gurunathan S. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2008;65(1):150-3.
18. Saravanan M, Vemu AK, Barik SK. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles from *Bacillus megaterium* (NCIM 2326) and their antibacterial activity on multi drug resistant clinical pathogens. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011;88(1):325-31.
19. Zaki S, El Kady M, Abd-El-Haleem D. Biosynthesis and structural characterization of silver nanoparticles from bacterial isolates. *Mater Res Bull* 2011;46(10):1571-6.
20. Levard Cm, Mitra S, Yang T, Jew AD, Badireddy AR, Lowry GV, et al. Effect of chloride on the dissolution rate of silver nanoparticles and toxicity to *E. coli*. *Environ Sci Technol* 2013;47(11):5738-45.
21. Al Qadi B, Toshiharu S, editors. A study of optical anisotropy for nearly spherical gold nanoparticles. Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications. *Proc SPIE* 2009;7190: 719016-20.
22. Cheng HR, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol lett* 2006. 28(1): 55-9.
23. El-Batal A, Amin M, Shehata MM, Hallol MM. Synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus stearothermophilus* using gamma radiation and their antimicrobial activity. *World Appl Sci J* 2013;22(1):01-16.
24. Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi S, Zolfaghari B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res pharm sci* 2014;9(6):385.
25. Thomas R, Janardhanan A, Varghese RT ,Soniya E, Mathew J, Radhakrishnan E. Antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized by marine *Ochrobactrum* sp. *Braz J Microbiol* 2014;45(4):1221-7.
26. Singh R, Wagh P, Wadhwani S, Gaidhani S, Kumbhar A, Bellare J, et al. Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *Int J nanomed* 2013;8:4277.

27. Shanthi S, Jayaseelan BD, Velusamy P, Vijayakumar S, Chih CT, Vaseeharan B. Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dabhl and their antibiofilm activity and toxicity effects in *Ceriodaphnia cornuta*. *Microb pathog* 2016;93:70-7.
28. Sadhasivam S, Shanmugam P, Yun K. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces hygroscopicus* and antimicrobial activity against medically important pathogenic microorganisms. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;81(1):358-62.
29. Sadowski Z. Biosynthesis and application of silver and gold nanoparticles. In: Perez DP (Ed). *Silver Nanoparticles*. 4th. Croatia: InTech; 2010. p. 342.
30. Singh R, Shedbalkar UU, Wadhwani SA, Chopade BA. Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. *Appl microbiol biotechnol* 2015;99(11):4579-93.
31. Paul D ,Sinha SN. Extracellular Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 and Its Antibacterial Activity. *Jordan J Biol Sci* 2014;7(4):245-50.
32. Vala A, Shah S. Rapid synthesis of silver nanoparticles by a marine-derived fungus *Aspergillus niger* and their antimicrobial potentials. *Int J Nanosci Nanotechnol* 2012;8(4):197-206.
33. Priyadarshini S, Gopinath V, Priyadharsshini NM, MubarakAli D, Velusamy P. Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using novel strain, *Bacillus flexus* and its biomedical application. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013;102:232-7.

