

سنتز سبز و تعیین ویژگی نانوذرات سولفید نقره به‌وسیله‌ی باکتری *Bacillus GMS10 safensis* جدا شده از خاک آلوده‌ی معدن طلا

مراحم آشنگرف*؛ سینا داج^۲

چکیده

مقدمه: این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به نقره و بررسی پتانسیل آن‌ها در سنتز نانوسولفید نقره انجام شد. **روش‌ها:** بیوسنتز نانوذرات سولفید نقره از طریق مشاهدات چشمی و طیف‌های جذبی اسپکتروفتومتری مرئی ماورای بنفش بررسی شد. آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی مجهز به پرتوایکس پاشنده با هدف بررسی اندازه، شکل نانوذره و آنالیز عنصری انجام شد. به‌منظور تعیین گروه‌های عاملی دخیل در احیای زیستی سولفات نقره به نانوسولفید نقره از طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز استفاده شد. **نتایج و بحث:** براساس نتایج، سویه‌ی باکتری *Bacillus safensis GMS10* با بالاترین مقاومت نسبت به سولفات نقره (۵ میلی مولار)، قادر به سنتز نانوذرات سولفید نقره کروی شکل با متوسط اندازه‌ی ۲۲/۲ نانومتر در غلظت ۱ میلی مولار سولفات نقره تحت شرایط بهینه ۱۵ گرم در لیتر زیست توده و ۳۶ ساعت گرماگذاری بود. این مطالعه نخستین گزارش از سنتز سبز نانوذرات سولفید نقره در باکتری *B. safensis* است.

واژه‌های کلیدی: باکتری *B. safensis*، بیوسنتز، خاک، مشخصه‌یابی، نانوسولفید نقره

۱. دانشیار میکروبیولوژی صنعتی گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، کردستان، سنندج، ایران
*نویسنده مسئول: m.ashengroph@uok.ac.ir

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، کردستان، سنندج، ایران
این مقاله پژوهشی بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد آقای سینا داج دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی تحت راهنمایی دکتر مراحم آشنگرف است که با حمایت مالی دانشگاه کردستان اجرا شده است که بدینوسیله، نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام میدارند.

مقدمه

اثرات سطحی (تسهیل کننده در مقیاس‌گذاری به علت پخش شدن اتمها در سطح ماده) و خواص ذره‌ای (نشان دهنده‌ی رفتار ناپیوسته ذرات مواد) به‌عنوان دو عامل اصلی باعث شده است که نانومواد در مقایسه با نمونه‌های بالک (توده‌ای) دارای ویژگی‌های نوری، الکتریکی، مکانیکی، مغناطیسی و واکنش‌پذیری شیمیایی منحصر‌بفردی باشند و کاملاً متفاوت رفتار کنند

(Jeevanandam *et al.*, 2018). دو روش کلی تولید نانوذرات که شامل روش‌های بالا به پایین (Jayanta Kumar & Kwang-Hyun, 2014) و روش‌های پایین به بالا (Kumar *et al.*, 2018) می‌باشد، نقش مهمی در کنترل اندازه، شکل، ترکیب شیمیایی و پراکنش نانوذرات دارد و انتخاب روش مناسب می‌تواند امکان تولید نانوذرات مناسب در مقیاس تجاری را فراهم نماید. روش‌های فیزیکی و شیمیایی مختلفی برای تولید نانوذرات وجود دارد. روش‌های فیزیکی در دما و فشار محیط امکان‌پذیر نیستند و برای انجام فرآیند تولید نانوذرات به دما و فشار بالایی احتیاج دارند. روش‌های شیمیایی با استفاده از مواد شیمیایی قوی و حفاظت‌کننده مثل سدیم سیترات، سدیم بوروهیدرات و الکل امکان‌پذیر است و علاوه بر اینکه سمی و اشتعال‌پذیر هستند به دلیل آسیب به محیط زیست دفع آن‌ها به راحتی انجام نمی‌گیرد (Mansee *et al.*, 2021). بنابراین نیاز به روش‌های تولید جایگزین نانوذرات برای گسترش کاربردهای آن‌ها وجود داشته است. تولید زیستی نانوذرات با ویژگی‌هایی که دارد توانسته پاسخ مناسبی به این نیاز بدهد از جمله‌ی این ویژگی‌ها عبارتند از: سازگاری با محیط زیست، عدم استفاده از مواد سمی، دما و فشار بالا در فرآیند تولید و همچنین این روش احتیاج به استفاده از ترکیب پایدارکننده برای جلوگیری از ترکیب شدن نانوذرات و تبدیل شدن به ماکروذرات را ندارند و نسبت به سایر روش‌ها کم هزینه‌تر است. در روش زیستی از میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان کارخانجات کوچک و زنده‌ی تولید نانو مواد استفاده می‌شود. بدین وسیله علاوه بر اندازه‌ی نانوذرات شکل آن‌ها نیز کنترل می‌شود (Tijjani *et al.*, 2022). منابع آلی و معدنی مورد نیاز میکروارگانیسم‌های مختلف مثل مخمرها، قارچ‌ها و باکتری‌ها برای سوخت و ساز و فرایندهای حیاتی از مواد موجود در محیط تامین می‌شود. اگر یون‌های فلزی در دسترس این میکروارگانیسم‌ها قرار گیرد طی فرایندهای مختلف آن‌ها را به صورت عنصری داخل یا بر روی دیواره‌ی سلولی خود جمع می‌کنند. این تجمع غالباً باعث تولید ذراتی می‌شود که در دسته‌ی نانوذرات قرار می‌گیرند (Bansal *et al.*, 2017). از میان همه‌ی کالکوزنیدهای نانوساختار، نانو سولفید نقره دارای ضریب جذب بالایی در حدود 10^4 m^{-1} و یک نیمه رسانای شکاف باریک (حدود $1/5 \text{ eV}$) است. نانو ذرات سولفید نقره به‌دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد نوری، شیمیایی، مکانیکی و الکتریکی در زمینه‌های مختلفی از جمله حسگرهای ترموالکتریک، باتری‌های سلول‌های خورشیدی، آشکارسازهای مادون قرمز، رساناها، سلول‌های فتوولتائیک و درمان ضد میکروبی استفاده می‌شوند (Ghotekar *et al.*, 2021). کاربردهای بسیار زیاد نانوذره سولفید نقره باعث شده است روش‌های متعددی برای آماده‌سازی آن‌ها وجود داشته باشد که اکثر آن‌ها غیرزیستی می‌باشد. برای مثال گرماکافت زانتات نقره که زنجیره‌های آلیفاتیک طولانی دارد، در دمای 200°C درجه سانتی-گراد، باعث تشکیل ذرات تخم‌مرغی شکل در اندازه‌های مختلف می‌شود (Zhang *et al.*, 2012). نانوذرات برگی شکل سولفید نقره با استفاده از محلول AgNO_3 و CS_2 در دمای 160°C درجه سانتی‌گراد تولید شده است (Chen & Gao,)

2006). با توجه به معایب روش‌های غیرزیستی در سنتز نانوذرات سولفید نقره نیاز مضاعفی به روش‌های زیست‌سازگار و استفاده از زیست‌فناوری احساس می‌شود. کلاوس (Klaus) و همکاران (۱۹۹۹) توانستند نانوذرات سولفید نقره را به‌وسیله‌ی باکتری *Pseudomonas stutzeri* AG259 در محلول آبی AgNO_3 تولید کنند که اندازه‌ی ذرات را بالای ۲۰۰ نانومتر گزارش دادند. سورش (Suresh) و همکاران (۲۰۱۱) تولید نانوذرات سولفید نقره با اندازه‌ای در حدود ۹ نانومتر را طی یک فرایند ساده در محلول‌های آبی Na_2SO_3 و AgNO_3 و در دمای پایین تحت شرایط هوازی، به‌وسیله‌ی باکتری *Shewanella oneidensis* گزارش دادند. نانوکریستال‌های حاصل در این تحقیق به‌صورت خارج سلولی، کروی، تقریباً منو‌دیسپرس و بسیار پایدار بودند. دی بابوو (Debabov) و همکاران (۲۰۱۳) از باکتری *Shewanella oneidensis* MR-1 در یک محلول آبی Na_2SO_3 و AgNO_3 برای تولید نانوذرات سولفید نقره در دما و فشار معمولی استفاده کردند. اندازه‌ی نانوذرات بین ۲ تا ۱۶ نانومتر متغیر بود که ۷۰٪ آن‌ها اندازه‌ی ۶ تا ۱۲ نانومتر داشتند. در این تحقیق، برای نخستین بار در کشور جداسازی و تعیین هویت سویه‌های باکتری بومی جمع‌آوری شده از خاک‌های آلوده به معدن طلا ساریگونی قروه در استان کردستان برای سنتز نانوذرات سولفید نقره از محلول سولفات نقره مورد ارزیابی قرار گرفت. نانوذرات سنتز شده با استفاده از مطالعات طیف سنجی و میکروسکوپ الکترونی روبشی مشخصه‌یابی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و تکنیک غنی‌سازی

به‌منظور غنی‌سازی و جداسازی سویه‌های باکتری مقاوم به نقره، نمونه‌های خاک از معادن طلای ساریگونی قروه در استان کردستان جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها از فواصل ۵ تا ۱۵ سانتی‌متری خاک توسط بیلچه‌ی استریل در پاکت‌های استریل جمع‌آوری و در کوتاه‌ترین زمان ممکن به یخچال آزمایشگاه برای نگهداری انتقال داده شدند. برای تهیه‌ی سوسپانسیون اولیه از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده، ده گرم از هر نمونه خاک به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک (۰/۸۵ درصد نمک کلرید سدیم) تلقیح گردید. سپس یک درصد از سوسپانسیون فوق به ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی براث غنی شده با ۰/۵ میلی‌مولار سولفات نقره (درجه‌ی خلوص بالای ۹۹ درصد خریداری شده از شرکت سیگما-آلدریج) استریل شد و از طریق فیلترهای غشایی میلی‌پور با منافذ ۰/۲۲ میکرونی اضافه شد. ارلن‌های تلقیح شده به مدت دو هفته در گرمخانه شیکردار با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۲۰۰ rpm نگهداری شدند. هر سه‌الی چهار روز یکبار حدود ۱۰ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت مذکور به محیط کشت تازه‌ی لوریا برتانی غنی شده با یون نقره تلقیح شد. پس از چندین بار پاساژ متوالی و اطمینان از غنی‌سازی سویه‌های باکتری مقاوم به یون نقره، از پاساژ نهایی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط‌های کشت جامد لوریا برتانی آگار حاوی ۰/۵ میلی‌مولار یون نقره تلقیح و تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه‌گذاری شد. پس از اطمینان از رشد کلنی‌های باکتری از طریق مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی، کلنی‌های جداسازی شده بر روی محیط‌های کشت لوریا برتانی آگار خالص سازی گردید (Ashengroph, 2014).

تعیین الگوی مقاومت جدایه‌های باکتری نسبت به سولفات نقره

به ارلن‌های ۱۲۵ میلی لیتری حاوی ۲۵ میلی لیتر از محیط کشت لوریا برتانی آگار ذوب شده، غلظت‌های مشخصی از سولفات نقره (۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵، ۱/۷۵، ۲، ۲/۲۵، ۲/۵، ۲/۷۵، ۳، ۳/۲۵، ۳/۵، ۳/۷۵، ۴، ۴/۲۵، ۴/۵، ۴/۷۵، ۵) ۵/۲۵ میلی مولار) اضافه شد و سپس داخل پلیت‌های شیشه‌ای به قطر ۸ سانتی متر ریخته شد. پس از خشک شدن سطح پلیت‌ها، ۱۰ میکرولیتر از محیط لوریا برتانی مایع که سویه‌ی باکتری مورد نظر در آن رشد لگاریتمی کرده و غلظت معادل نیم مک فارلند (میکروب تلقیح شده 1.5×10^6 CFU/ml) را دارا بود، به‌صورت کشت نقطه‌ای تلقیح شد. پلیت‌ها پس از ۳ روز گرماگذاری در انکوباتور ۲۵ درجه‌ی سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفتند (Ashengroph & Arjmand, 2016). پس از انجام تعیین الگوی تحمل پذیری از طریق روش رقت در آگار، جدایه‌ی باکتری با بالاترین مقاومت نسبت به سولفات نقره به‌عنوان جدایه‌ی برتر برای آزمایشات بیوسنتز نانوذرات سولفید نقره تحت استراتژی سلول در حال استراحت انتخاب شد.

بررسی سنتز نانوذرات سولفید نقره تحت استراتژی سلول در حال استراحت

به منظور تهیه‌ی سلول‌های در حال استراحت برداشت شده از انتهای فاز رشد لگاریتمی؛ ابتدا باید منحنی رشد باکتری ترسیم شود (Ashengroph *et al.*, 2012). برای این منظور جدایه‌ی باکتری GMS10 با بالاترین مقاومت نسبت به سولفات نقره، در ارلن‌های ۱۲۵ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی آگار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بر روی همزن مدور (۲۰۰ دور در دقیقه)، به مدت ۴۴ ساعت انکوبه‌گذاری شد. در فواصل زمانی هر ۴ ساعت یکبار، میزان دانسیته سلولی (OD_{600nm}) و وزن خشک سلولی اندازه‌گیری شد. پس از تعیین مقادیر OD و وزن خشک سلولی، ارتباط خطی بین دو فاکتور مذکور تخمین زده شده است ($1 \text{ OD}_{600nm} = 4.3 \text{ g/L wet biomass}$). پس از مشخص شدن منحنی رشد سویه‌ی باکتری، باکتری منتخب تا انتهای فاز رشد لگاریتمی (ساعت ۲۸ ام از منحنی رشد) تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۲۰۰ rpm کشت داده شد. سپس با استفاده از سانتریفیوژ یخچالی (۵۰۰۰ دور در دقیقه، مدت زمان ۱۰ دقیقه، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) توده‌ی زیستی باکتری جدا شد. پس از سه بار شستشو با آب دوبار تقطیر استریل، ۵ گرم در لیتر از توده‌ی زیستی باکتری (وزن تر) به‌عنوان زیست کاتالیست در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه استریل غنی شده با ۰/۵ میلی مولار سولفات نقره تلقیح شد. ارلن‌ها به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۲۰۰ rpm انکوبه‌گذاری شد. به‌طور همزمان از محلول سولفات نقره (بدون تلقیح سلول در حال استراحت) و سلول در حال استراحت (بدون حضور سولفات نقره) به‌عنوان محیط‌های کنترل استفاده شد. ویژگی نانو ذرات Ag_2S تشکیل شده در واکنش، مورد آنالیزهای چشمی و اسپکتروفتومتری مرئی ماورای بنفش (UV-Vis spectrophotometer) قرار گرفت (Delgado-Beleño *et al.*, 2018).

شناسایی ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و ملکولی جدایه‌ی باکتری GMS10

بررسی اولیه ریخت‌شناسی جدایه‌ی باکتری با استفاده از رنگ آمیزی گرم و مشاهده مورفولوژی به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی انجام شد. آزمون‌های تولید کاتالاز، اکسیداز، آلکالین فسفاتاز، تولید اندول، تولید H_2S ، تست احیای نیترات، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز اسکولین، هیدرولیز کازئین، هیدرولیز توپین ۸۰، مصرف سیترات، تست DNAase، تست وژپروسکوئر، تولید اسید از منابع کربوهیدراتی (گلوکز، فروکتوز، مانوز، مانیتول، گالاکتوز، مالتوز)، مصرف منابع کربوهیدراتی (مالتوز، اینوزیتول، رافینوز، تورانوز، ملیبیوز)، رشد در دماهای مختلف (۱۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد) و رشد در درصد‌های مختلف نمک سدیم کلراید (۰ تا ۱۵ درصد وزنی/حجمی) براساس روش‌های متداول در باکتری‌شناسی انجام شدند (Holt et al., 1994). استخراج DNA ژنومی از طریق کیت استخراج DNA از باکتری-های گرم مثبت، بر طبق دستورالعمل موجود در کیت انجام شد. پس از حصول اطمینان از DNA استخراجی، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به کمک آغازگرهای همگانی fd1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) و rp2 (ACGGCTACCTTGTACGACTT) برای تکثیر ژن 16S rDNA استفاده شد (Weisburg et al., 1991). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و مراحل تکثیر همراه با چرخه‌های حرارتی بر طبق روش پیشنهادی Bereswill (1991) همکاران انجام شد (Bereswill et al., 1995). پس از تخلیص محصول PCR توسط کیت تخلیص DNA، محصول نهایی برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. توالی‌های به‌دست آمده پس از ویرایش توسط نرم افزار BioEdit با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن (NCBI GenBank) با استفاده از نرم افزار بلاست (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) مقایسه گردید. رسم درخت فیلوژنیک به روش Neighbor Joining با استفاده از نرم افزار MEGA ورژن 7.0 و آنالیز بوت استرپ ۱۰۰۰ با هدف تخمین قابل اطمینان وابستگی سویه‌ها انجام شد (Kumar et al., 2016). در نهایت، توالی نوکلئوتیدی حاصل از تعیین توالی با استفاده از سایت BankIt در بانک ژنی ثبت و شماره‌ی دسترسی دریافت شد.

اثر پارامترهای مختلف بر روی بیوسنتز نانوذرات سولفید نقره تحت استراحتی سلول در حال استراحت

با هدف بهبود بیوسنتز نانوذرات سولفید نقره توسط سلول در حال استراحت جدایه‌ی باکتری منتخب GMS10، تاثیر فاکتورهای مختلف شامل غلظت‌های اولیه سولفات نقره (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی مولار)، اثر غلظت‌های بیومس سلول (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ گرم در لیتر (بر حسب وزن تر) سنجش شد. همچنین اثرات دوره انکوباسیون شامل ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰ و ۲۵۶ ساعت بر روی مقدار کیفی نانوذره تولیدی، مورفولوژی و اندازه نانوذرات سولفید نقره در مخلوط واکنش زیست تبدیلی تحت سلول در حال استراحت، برداشت شده از انتهای فاز رشد لگاریتمی و تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۲۰۰ rpm تعیین گردید (Bolbanabad et al., 2020; Ashengroph & Hosseini, 2021).

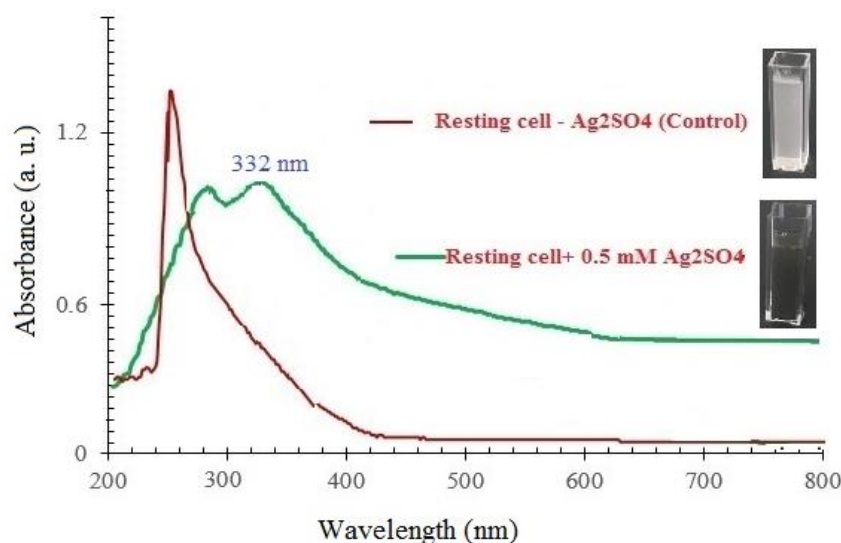
مشخصه‌یابی نانوذرات سولفید نقره تحت استراتژی سلول در حال استراحت

مشخصه‌یابی نانوذرات سولفید نقره (Ag_2SNPs) تحت استراتژی سلول در حال استراحت، از طریق مشاهدات چشمی (تغییر رنگ محلول واکنش پس از تیمار با سلول در حال استراحت جدایه‌ی باکتری GMS10) و بررسی طیف‌های جذبی اسپکتروفتومتری مرئی ماورای بنفش (analytikjena, Specord 210، آلمان) انجام شد. آنالیزهای میکروسکوپ الکترونی روبشی مجهز به پرتوایکس پاشنده انرژی (FESEM-EDX, TESCAN, Mira 3-Lmu) با هدف بررسی سایز، مورفولوژی و آنالیز عنصری انجام شد. به‌منظور تعیین شرایط عاملی دخیل در احیای زیستی سولفات نقره به نانوسولفید نقره و پایداری نانوذرات بیوسنتزی از طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) استفاده شد (Bruker, VECTOR 22، آلمان). به منظور جداسازی، خالص سازی و رسوب نانوذرات سولفید نقره تشکیل شده در مخلوط واکنش زیستی، از سانتریفیوژ با دور بالا (سرعت ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۶۰ دقیقه) استفاده شد. نانوذرات رسوبی حاصل پس از چند بار شستشو با اتانول ۷۰ درصد و آب دیونیزه استریل، در دستگاه فریز درایر (Alpha 1-2Dplus, Christ, آلمان) به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. در نهایت آنالیزهای طیف سنجی و میکروسکوپی ذکر شده بر روی آنها صورت گرفت (Soosani et al., 2021; Ashengroph & Muhtasam Zorab, 2022).

نتایج و بحث

غنی‌سازی جدایه‌های باکتری مقاوم به سولفات نقره و انتخاب جدایه‌ی کارآمد

با توجه به سمیت یون نقره بر روی سلول‌های میکروبی، غربال‌گری جدایه‌های باکتری مقاوم به غلظت‌های بالای نقره گام نخست در انتخاب سویه‌های کارآمد است که پتانسیل احیای سولفات نقره به نانوسولفید نقره را دارا است و قادر خواهد بود ما را در انتخاب جدایه‌ی میکروبی کارآمد هدایت نماید (Ashengroph, 2014). باکتری‌هایی که سیستم مقاومت به نقره دارند، می‌توانند نانوذرات سولفید نقره را به صورت درون یا برون سلولی تولید کنند به شرطی که غلظت یون نقره از میزان تحمل آنها بیشتر نباشد. سیستم مقاومت در برابر یون نقره در موجودات مختلف متفاوت است همچنین باکتری‌هایی که نانوذرات سولفید نقره را به صورت درون یا برون سلولی تولید می‌کنند به غلظت‌های بالای این یون حساسیت نشان می‌دهند. در واقع یون نقره یک ترکیب با دو عملکرد است، به گونه‌ای که در غلظت‌های پایین، باکتری را به سمت تولید نانوذره تحریک می‌نماید و در غلظت‌های بالا، مرگ سلولی را القا می‌کند (Tijjani et al., 2022). در این راستا بعد از جمع‌آوری نمونه‌های خاک از معادن طلای ساریگونی قروه در استان کردستان، ۱۸ جدایه‌ی باکتری مقاوم به سولفات نقره از طریق تکنیک غنی‌سازی در محیط کشت لوریا برتانی برآش غنی شده با ۰/۵ میلی مولار سولفات نقره جداسازی شد. الگوی مقاومت جدایه‌های باکتری جدا شده در محیط کشت لوریا برتانی آگار غنی شده با غلظت‌های مختلف یون نقره از طریق کشت نقطه‌ای و به روش رقت در آگار تعیین شد (شکل ۱).

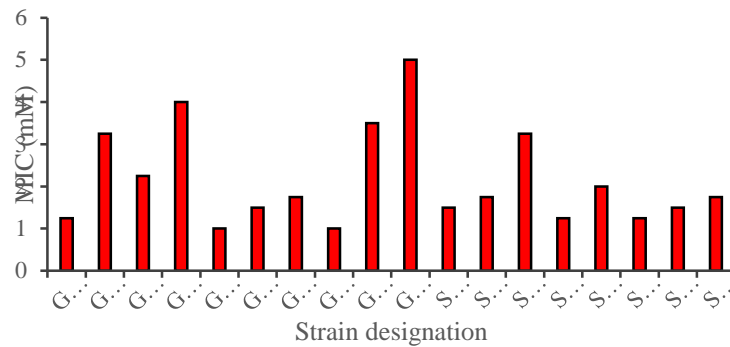


شکل ۱: الگوی مقاومت نسبت به سولفات نقره به روش رقت در آگار در محیط کشت لوریا برتانی غنی شده با غلظت‌های مختلف سولفات نقره (۰/۷۵ تا ۵/۲۵ میلی مولار) پس از سه روز انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سلسیوس

Figure 1. Resistance pattern to silver sulfate by agar dilution method in Luria Bertani broth culture medium enriched with different concentrations of silver sulfate (0.75 to 5.25 mM) after three days of incubation at 25 °C.

بررسی سنتز نانوذرات سولفید نقره در جدایه‌ی باکتری GMS10

تایید اولیه نانوذرات سولفید نقره با احیای زیستی سولفات نقره در غلظت ۰/۵ میلی مولار به نانوسولفید نقره با مشاهدات چشمی و مطالعه‌ی طیف جذبی مرئی-فرابنفش (UV-visible) قابل مشاهده است. در اثر احیای زیستی نمک سولفات نقره به سولفید نقره توسط سلول در حال استراحت جدایه‌ی باکتری GMS10 برداشت شده از انتهای فاز رشد لگاریتمی، رنگ محلول واکنش به قهوه‌ای متمایل به سیاه تبدیل شد که براساس منابع موجود نمایانگر تشکیل سوسپانسیون کلوئیدی نانوذرات سولفید نقره است (Sadovnikov & Gusev, 2014). برای اثبات وجود نانوذرات سولفید نقره طیف جذبی نمونه‌های کنترل و تیمار شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. ماکزیمم جذب پیک حاصل در طول موج ۳۳۲ نانومتر نشان دهنده‌ی باند جذب تشدید پلاسمون سطحی برای نانوذرات سولفید نقره است که براساس منابع معتبر ماکزیمم پیک جذبی نانوذرات سولفید نقره در طول موج های ۳۳۰ نانومتر می باشد (Liu et al., 2002; Delgado-Beleño et al., 2018). در محلول کنترل (سلول در حال استراحت بدون افزودن نمک سولفات نقره)، پیک جذبی مرتبط با رزنانس پلاسمون سطحی نانوذرات سولفید نقره مشاهده نشد. لازم به ذکر است که پیک‌های ظاهر شده در محدوده‌ی ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر مربوط به پروتئین‌های ترشح شده توسط سلول در حال استراحت است (شکل ۲).

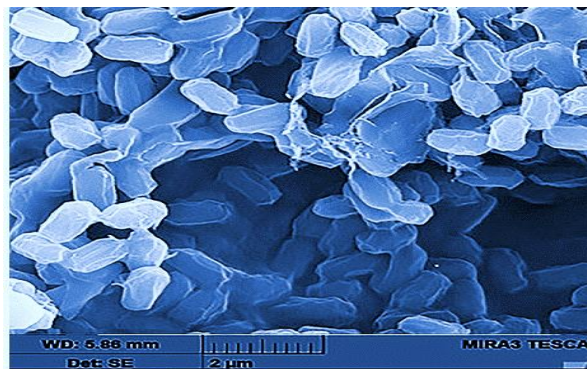


شکل ۲: مشاهدات چشمی و آنالیزهای اسپکتروفوتومتری محلول سولفات نقره (۰/۵ میلی مولار) تیمار شده با سلول در حال استراحت جدایه‌ی باکتری GMS10 و نمونه‌ی شاهد تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۲۰۰rpm پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون

Figure 2. Visual observations and spectrophotometric analyses of silver sulfate solution (0.5 mM) treated with resting cells of bacterial isolate GMS10 and the control sample at 30 °C and shaking speed of 200 rpm after 48 hours incubation

شناسایی فنوتیپی و ملکولی جدایه‌ی باکتری GMS10

جدایه‌ی باکتری GMS10 از نظر واکنش گرم، گرم مثبت و از نظر ریخت‌شناسی به‌صورت میله‌ای شکل با میانگین قطر ۰/۷ تا ۰/۹۵ میکرون و میانگین طول ۱/۲ تا ۱/۳ میکرون است (شکل ۳).

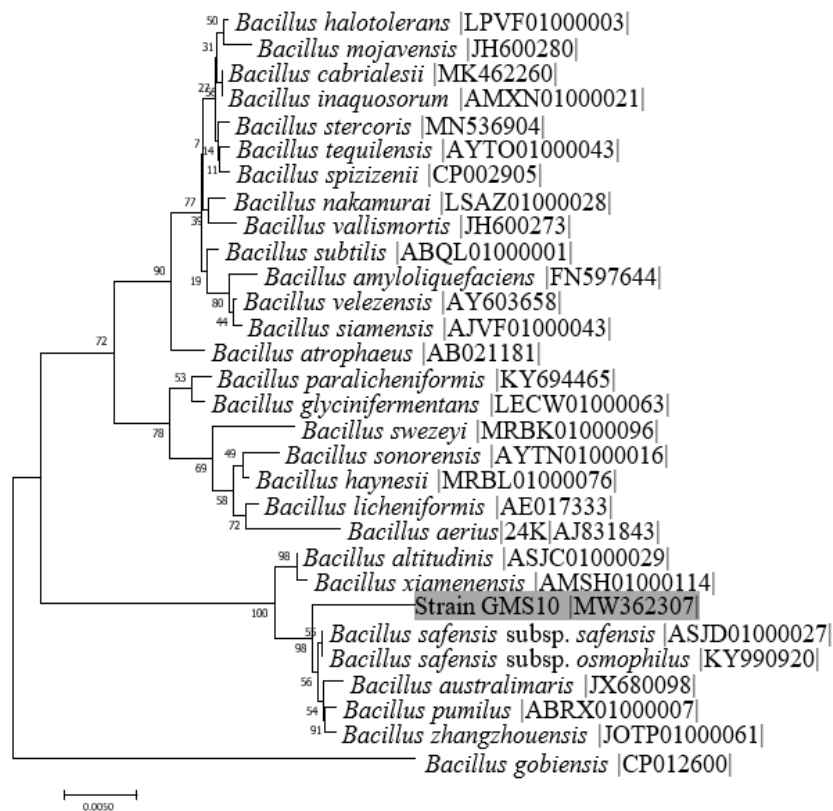


شکل ۳: تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM جدایه‌ی باکتری GMS10

Figure 3. Scanning electron microscope (SEM) image of bacterial isolate GMS10

در ادامه و با انجام تست های بیوشیمیایی مشخص شد که جدایه‌ی باکتری مذکور از نظر تست های اکسیداز، کاتالاز، تست حرکت، تست بتاگالاکتوزیداز، تست آلکالین فسفاتاز، مثبت و از نظر تست های اندول، تولید H₂S، تست احیای نیترات، تست DNAase، منفی است. جدایه‌ی باکتری مذکور همچنین از نظر تست های هیدرولیز اوره و کازئین، منفی و از نظر هیدرولیز ژلاتین و هیدرولیز اسکولین، مثبت بود. جدایه‌ی مذکور قابلیت رشد در دماهای ۱۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد با بهینه رشد ۳۰ درجه سانتی گراد را دارا بود. قابلیت رشد در دماهای ۴ و ۵۵ درجه سانتی گراد منفی بود. جدایه‌ی باکتری مذکور قابلیت رشد در درصدهای مختلف نمک کلرید سدیم بین ۰ تا ۱۰ درصد را دارا بود. براساس

نتایج آزمون های ریخت شناسی و بیوشیمیایی و بر طبق کتاب های مرجع و مقالات منتشره در این باره (Satomi *et al.*, 2006)، جدایه ی باکتری GMS10 به طور موقت به عنوان *Bacillus safensis* تشخیص داده شد. در ادامه و با هدف شناسایی دقیق سویه ی باکتری منتخب، ژن 16S rDNA از طریق آغازگرهای یونیورسال fd1 و rp2 با روش PCR تکثیر گردید. نتایج حاصل از بلاست در بانک جهانی ژن نشان داد که سویه ی باکتری GMS10 دارای شباهت ۹۹ درصدی با *Bacillus safensis* است. درخت فیلوژنیک سویه ی باکتری GMS10 به روش neighbor-joining رسم شد که وابستگی سویه ی باکتری مذکور را در بین گونه های مختلف جنس *باسیلوس* نشان داد (شکل ۴). براساس نتایج بدست آمده، سویه ی باکتری GMS10 متعلق به جنس *باسیلوس* و از نظر قرابت ژنتیکی بیشترین مشابهت را با *Bacillus safensis* subsp. *safensis* دارد. در نهایت سویه ی باکتری مذکور در بانک اطلاعات ژنی با شماره دسترسی MW362307 ثبت شد.

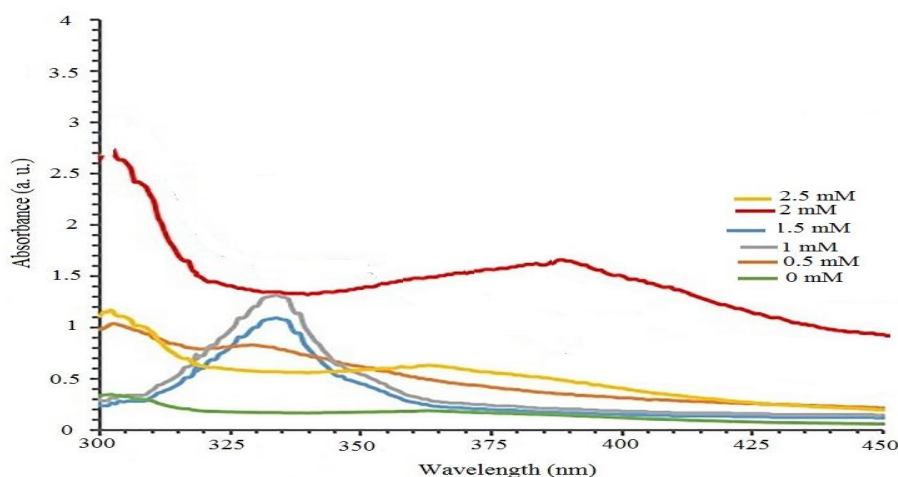


شکل ۴: درخت فیلوژنی رسم شده براساس توالی ژنی 16S rDNA که وابستگی سویه ی باکتری GMS10 را با سویه های باکتری متعلق به گونه های مختلف متعلق به جنس *باسیلوس* نشان می دهد. شماره ی دسترسی در بانک ژنی متعلق به گونه های انتخاب شده در داخل پرانتز آورده شده است

Figure 4. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences that shows the relationship of strain GMS10 with bacterial strains belonging to different species belonging to the genus *Bacillus*. GenBank accession number is given in parenthesis

سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید نقره و بهینه سازی فرآیند

سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید نقره تحت استراتژی سلول در حال استراحت و تاثیر پارامترهای مختلف بر روی راندمان سنتز نانوذرات در مخلوط واکنش زیست تبدیلی ارزیابی شد. سنتز برون سلولی نانوذره در فضای بیرون از میکروارگانسیم انجام می‌گیرد. در این روش نانوذرات با اشکال مختلف و روش‌های متفاوت ایجاد می‌شوند که شامل مراحل ترشح آنزیم‌ها، احیای زیستی و کلاهیک گذاری می‌باشند. لازم به ذکر است ساخت برون سلولی نسبت به روش درون سلولی مناسب تر است زیرا در روش برون سلولی نیازی به مراحل لازم برای خارج کردن نانوذره از داخل سلول نیست همچنین نانوذرات فلزی تولید شده در روش برون سلولی مقاومت بالاتری در مقابل اکسیداسیون دارند و قابلیت استفاده در زمینه‌های مختلف را دارند (Ashengroph & Hosseini, 2021). در شکل ۵، نتایج اثر غلظت اولیه‌ی سولفات نقره بر روی راندمان بیوسنتز نانوذرات سولفید نقره‌ی سنتزی توسط سلول در حال استراحت *Bacillus* strain GMS10 *safensis* نشان داده شده است.



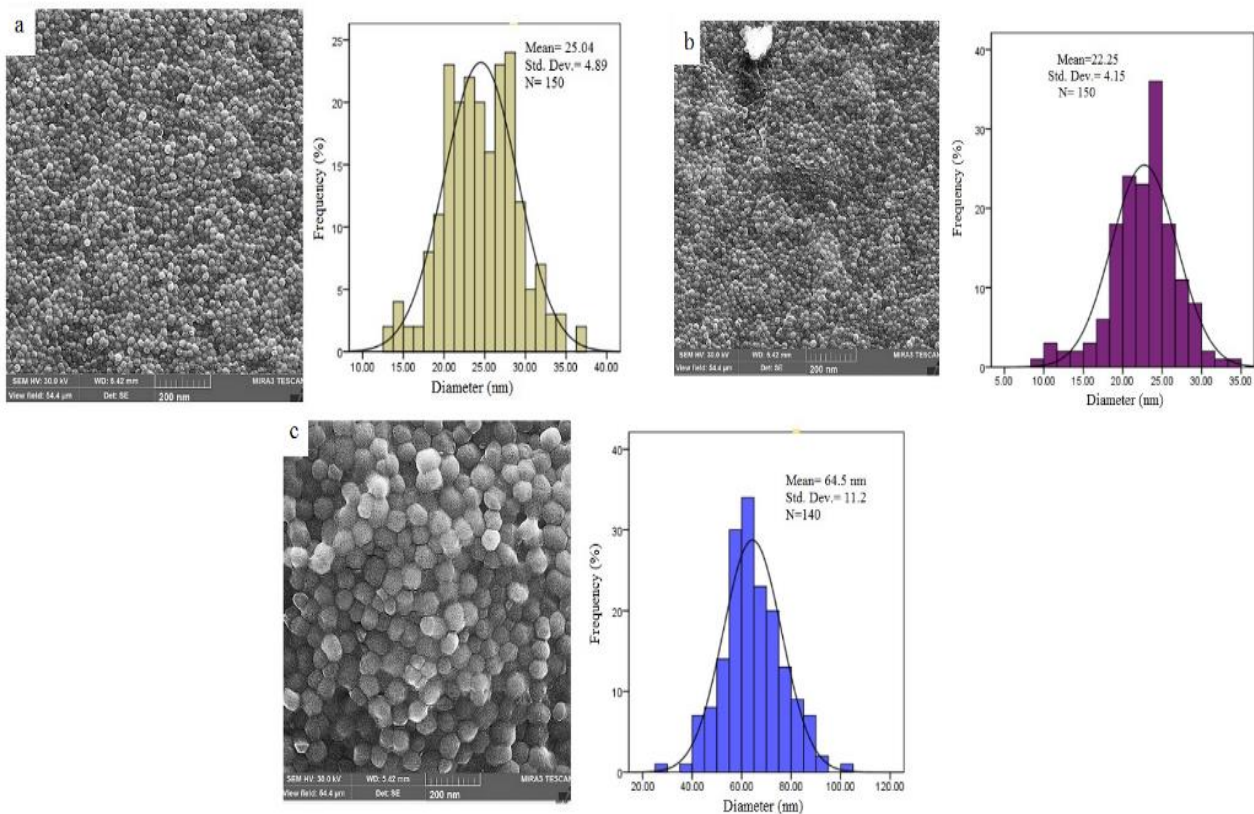
شکل ۵: نمودار تعیین بهترین غلظت سولفات نقره برای بیوسنتز نانوذرات سولفید نقره تحت استراتژی سلول در حال استراحت *B. safensis* strain GMS10 در غلظت ۱ میلی مولار بالاترین پیک جذبی مربوط به نانوذرات سولفید نقره مشاهده گردید

Figure 5. Chart for determining the best concentration of silver sulfate for the biosynthesis of silver sulfide nanoparticles under the resting cell strategy of *B. safensis* strain GMS10. At the concentration of 1 mM, the highest absorption peak related to silver sulfide nanoparticles was observed

همان‌گونه که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، ماکزیمم تولید نانوذرات سولفید نقره در غلظت ۱ میلی مولار تحت سلول در حال استراحت *Bacillus safensis* strain GMS10 و بعد از ۴۸ ساعت گرماگذاری تحت دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و دور شیکر ۲۰۰ rpm مشاهده شد. در غلظت‌های بالاتر از ۱/۵ میلی مولار، تغییر شیفیت در پیک جذبی مرتبط با رزنانس پلاسمون سطحی نانوذرات سولفید نقره مشاهده شد و عملاً سنتزی از نانوذرات مذکور مشاهده نشده است. در غلظت‌های ۲ و ۲/۵ میلی مولار پیک‌های جذبی در ۳۹۰ نانومتر مشاهده شد که احتمالاً ناشی از سنتز نانوذرات نقره است.

مشخصه یابی نانوذرات سولفید نقره از طریق زیست توده‌ی باکتری و بهینه سازی فرآیند

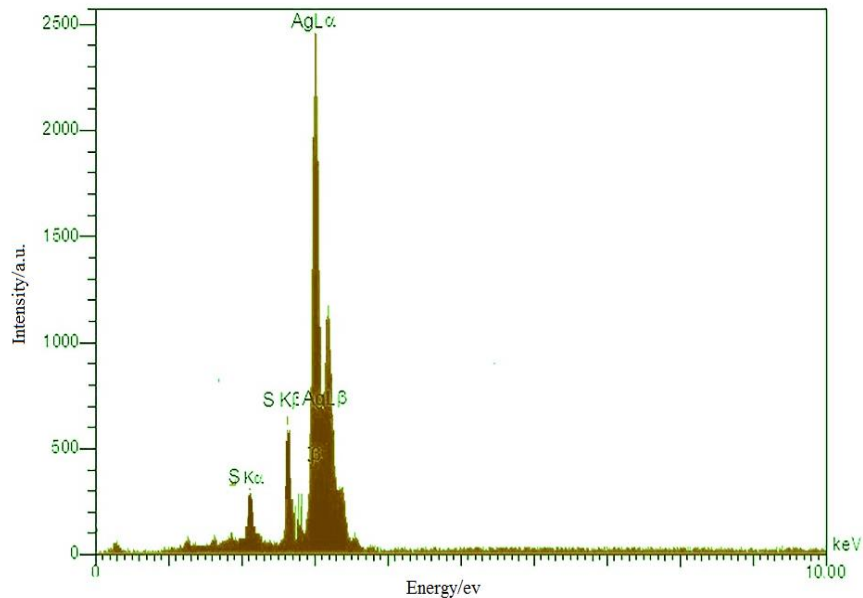
در ادامه و با هدف بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف سولفات نقره بر روی سایز و مورفولوژی نانوذرات سولفید نقره تشکیل شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی، آنالیزهای میکروسکوپ الکترونی روبشی انجام شد (شکل ۶). میکروگراف‌های حاصل، سنتز نانوذرات سولفید نقره کروی شکل با متوسط اندازه‌ی ۲۲/۲ نانومتر در غلظت ۱ میلی مولار را نشان داد (شکل ۶ قسمت b). در غلظت‌های بالاتر متوسط اندازه‌ی ذرات افزایش یافته است. بنابراین غلظت ۱ میلی مولار به‌عنوان غلظت بهینه برای آزمایشات بعدی انتخاب شد.



شکل ۶: اثر غلظت‌های مختلف سولفات نقره (a) غلظت ۰/۵ میلی مولار، b) غلظت ۱ میلی مولار، و c) غلظت ۱/۵ میلی مولار) بر روی سایز و مورفولوژی نانوذرات سولفید نقره تشکیل شده تحت استراتژی سلول در حال استراحت *B. safensis* strain GMS10. در غلظت ۱ میلی مولار نانوذرات با اندازه‌ی کوچکتر و توزیع مناسب‌تر تشکیل شده است.

Figure 6: The effect of different concentrations of silver sulfate (a: 0.5 mM, b: 1 mM, and c: 1.5 mM) on the size and morphology of silver sulfide nanoparticles formed under the resting cell strategy of *B. safensis* strain GMS10; At a concentration of 1 mM, nanoparticles with a smaller size and a more suitable distribution are formed.

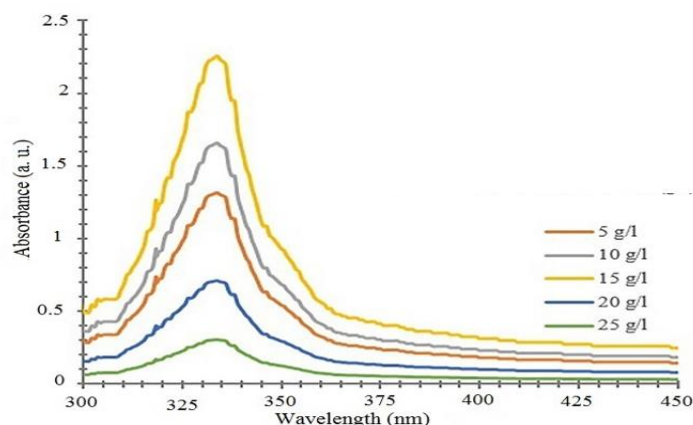
آنالیز طیف سنجی پراش پرتو اشعه ایکس حضور مقدار قابل توجهی از عناصر نقره و گوگرد را در ترکیب نانوذرات سنتزی نشان داد که حکایت از بیوسنتز نانوذرات سولفید نقره است (شکل ۷).



شکل ۷: طیف EDX نانوذرات سولفید نقره تولیدی به وسیله سلول در حال استراحت *B. safensis* strain GMS10

Figure 7: EDX spectrum of silver sulfide nanoparticles produced by resting cells of *B. safensis* strain GMS

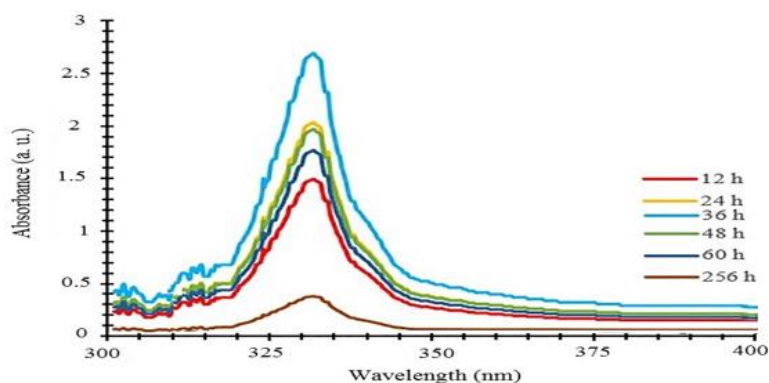
در ادامه اثر غلظت اولیه توده زیستی بر تولید نانوذرات سولفید نقره در مخلوط واکنش زیست تبدیلی مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۸). براساس نتایج بدست آمده، با افزایش غلظت بیومس سلول باکتری از ۵ تا ۱۵ گرم در لیتر، یک افزایش تدریجی در طیف جذبی مرتبط با نانوذرات سولفید نقره در مخلوط واکنش، بعد از ۴۸ ساعت گرماگذاری، تحت شرایط غلظت بهینه ۱ میلی مولار از سولفات نقره و در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی گراد، pH برابر ۷ و دور شیکر ۲۰۰ rpm مشاهده شد. با این حال، حداکثر تولید نانوذرات سولفید نقره مربوط به وزن ۱۵ گرم در لیتر بیومس باکتری است که همان وزن بیومس بهینه است (شکل ۸).



شکل ۸: نمودار اثر غلظت‌های مختلف زیست توده باکتری *B. safensis* strain GMS10 بر سنتز نانوذرات سولفید نقره

Figure 8. The effect of different biomass concentrations of *B. safensis* strain GMS10 on the synthesis of silver sulfide nanoparticles

در نهایت و با هدف بهبود واکنش احیای زیستی سولفات نقره به نانوذرات سولفید نقره، اثرات دوره‌ی انکوباسیون تحت شرایط بهینه شده (غلظت ۱ میلی مولار سولفات نقره و غلظت زیست توده ۱۵ گرم در لیتر) در مخلوط واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۹). یک افزایش تدریجی در طیف جذبی نانوذرات سلنیوم از ساعت ۱۲ تا ۳۶ وجود دارد که حداکثر جذب در ساعت ۳۶ مشاهده گردید. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، طیف جذبی نانوذرات تشکیل شده در مخلوط واکنش تحت سلول در حال استراحت پس از طی زمان انکوباسیون ۲۵۶ همچنان مشاهده شد که حکایت از پایداری نانوذرات سنتز شده در این واکنش دارد.

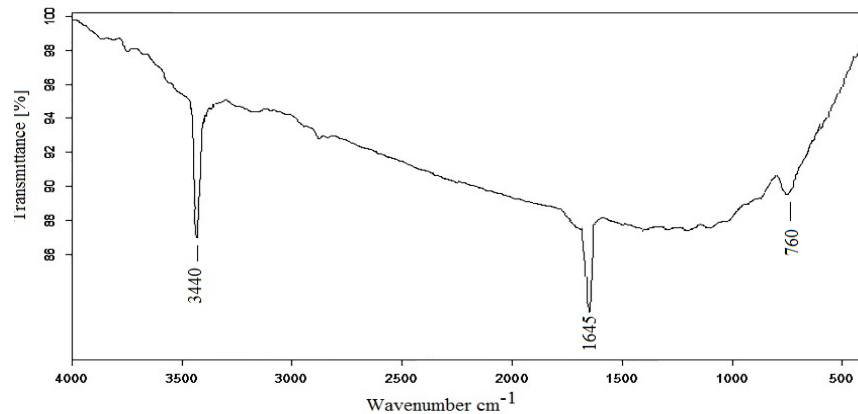


شکل ۹: نمودار اثر دوره‌ی انکوباسیون بر بیوسنتز نانوذرات سولفید نقره توسط سلول در حال استراحت باکتری *B. safensis* strain

B. safensis GMS10

Figure 9. The effect of time incubation on the synthesis of silver sulfide nanoparticles by resting cells of *B. safensis* strain GMS10.

با هدف بررسی گروه‌های عاملی دخیل در احیای زیستی سولفات نقره به سولفید نقره و پایداری نانوذرات سولفید نقره‌ی بیوسنتز شده در مخلوط واکنش تحت استراتژی سلول در حال استراحت، آنالیز FTIR انجام شد (شکل ۱۰).



شکل ۱۰: نتایج FTIR نانوذرات سولفید نقره بیوسنتز شده توسط سلول در حال استراحت *B. safensis* strain GMS10

Figure 10. FTIR results of silver sulfide nanoparticles biosynthesized by resting cells of *B. safensis* strain GMS10

بر طبق مشخصه یابی طیف سنجی FTIR، پیک‌هایی در محدوده‌های 3440 ، 1645 ، و 760 cm^{-1} مشاهده شده است. ظاهر شدن پیک در عدد موجی 3440 مربوط به حضور احتمالی گروه‌های -OH الکی/فنلی و یا گروه کششی N-H آمینی است. پیک مرتبط با عدد موجی 1645 مربوط به NH خمشی آمین‌ها و C=C کششی آلکن‌ها است. ظاهر شدن پیک در عدد موجی 760 مربوط به گروه‌های عاملی O=C=O در کربوکسیلیک اسیدها، N=C=O و C-N-C خمشی آمین‌ها است (Awwad et al., 2020).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که سنتز نانوذرات دارای اندازه یکنواخت، همگن و پایدار از طریق بهینه‌سازی شرایط از جمله غلظت‌های اولیه سوبسترای پیش‌ساز، غلظت اولیه زیست توده سلول و زمان انکوباسیون قادر خواهد بود امکان استفاده از روش‌های زیستی را برای سنتز نانوذرات در مقیاس بزرگ و کاربردهای صنعتی فراهم نماید. در این پژوهش پس از غربال‌گری جدایه‌های باکتری مقاوم به سولفات نقره، مشخصه یابی و بهینه‌سازی فرآیند زیست‌تبدیلی، گونه باکتری *B. safensis* به‌عنوان گزینه‌ی مناسب برای سنتز نانوذرات سولفید نقره معرفی شد که با توجه به اهمیت و کاربرد نانوذرات مذکور در صنایع مختلف، امکان استفاده از یافته‌های پژوهش حاضر برای مطالعات بعدی وجود دارد.

سیاسگزاری

این مقاله پژوهشی مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای سینا داج دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی تحت راهنمایی دکتر مراسم آشنگرف و با حمایت مالی و معنوی دانشگاه کردستان اجرا شده است که بدینوسیله، نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

اعلام تعارض منافع

نگارندگان مقاله اعلام می‌دارند که در رابطه با انتشار مقاله ارائه شده هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

منابع

- Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H. and Momenbeik, F. (2012). Conversion of isoeugenol to vanillin by *Psychrobacter* sp. strain CSW4. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166: 1–12
- Ashengroph, M. (2014). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by *Ralstonia* sp. SM8 isolated from the sarcheshmeh copper mine. *Biological Journal of Microorganisms*, 3: 53-64 [Article in Persian]
- Ashengroph, M. and Arjmand, R. (2016) Potential of *Candida tropicalis* strain se29w isolated from waste rubber plant for the bioremediation of the toxic selenite (SeO_3^{2-}). *Research Bulletin of Medical Sciences (Pejouhandeh)*, 21: 40-51 [Article in Persian]
- Ashengroph, M. and Hosseini, S. R. (2021) A newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SRB04 for the synthesis of selenium nanoparticles with potential antibacterial properties. *International Microbiology*, 24: 103–114.
- Ashengroph, M. and Muhtasam Zorab, M. (2022) Investigating green synthesis of copper nanoparticles using the bacterium *Pseudomonas grimontii*, their characterization, and antibacterial activity. *Biological Journal of Microorganism*, 11: 61-79 [Article in Persian]
- Awwad, A. M., Salem, N. M., Aqarbeh, M. M. and Abdulaziz, F. M. (2020). Green synthesis, characterization of silver sulfide nanoparticles and antibacterial activity evaluation. *Chemistry International*, 6: 42-48
- Bansal, P., Kaur, P., Kumar, P., Surekha, A. and Duhan, J. S. (2017). Biogenesis of silver nanoparticles using *Aspergillus terreus*, its cytotoxicity and potential as therapeutic against human pathogens. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 8: 898-906
- Bereswill, S., Bugert, P., Bruchmüller, I. and Geider, K. (1995). Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2636-2642
- Bolbanabad, E. M., Ashengroph, M. and Darvishi, F. (2020). Development and evaluation of different strategies for the clean synthesis of silver nanoparticles using *Yarrowia lipolytica* and their antibacterial activity. *Process Biochemistry*, 94: 319-328
- Chen, M. and Gao, L. (2006). Synthesis of leaf-like Ag_2S nanosheets by hydrothermal method in water–alcohol homogenous medium. *Materials Letters*, 60: 1059-1062
- Debabov, V. G., Voeikova, T. A., Shebanova, A. S., Shaitan, K. V., Emel'yanova, L. K., Novikova, L. M. and Kirpichnikov, M. P. (2013). Bacterial synthesis of silver sulfide nanoparticles. *Nanotechnologies in Russia*, 8: 269-276
- Delgado-Beleño, Y., Martínez-Núñez, C. E., Cortez-Valadez, M., Flores-López, N. S. and Flores-Acosta, M. (2018). Optical properties of silver, silver sulfide and silver selenide nanoparticles and antibacterial applications. *Materials Research Bulletin*, 99: 385-392

- Ghotekar, S., Pagar, K., Pansambal, S., Murthy, H. A. and Oza, R. (2021). Biosynthesis of silver sulfide nanoparticle and its applications,” In *Handbook of Greener Synthesis of Nanomaterials and Compounds* (pp. 191-200). Elsevier
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S.T. (1994). “Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins
- Jayanta Kumar, P. and Kwang-Hyun, B. (2014). Green nanobiotechnology: factors affecting synthesis and characterization techniques. *Journal of Nanomaterials*, 2014: 1-12
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A. and Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 18: 1050-1074
- Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E. and Granqvist, C. G. (1999). Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 13611-13614
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870– 1874
- Kumar, S., Bhushan, P. and Bhattacharya, S. (2018). Fabrication of Nanostructures with Bottom-up Approach and Their Utility in Diagnostics, Therapeutics, and Others,” In: Bhattacharya S., Agarwal A., Chanda N., Pandey A., Sen A. (eds) *Environmental, Chemical and Medical Sensors. Energy, Environment, and Sustainability*. Springer, Singapore
- Liu, S. H., Qian, X. F., Yin, J., Hong, L., Wang, X. L. and Zhu, Z. K. (2002). Synthesis and characterization of Ag₂S nanocrystals in hyperbranched polyurethane at room temperature. *Journal of Solid-State Chemistry*, 168, 259–262
- Mansee, T., Smital, P. and Niharika, S. (2021). Green synthesis of iron oxide nanoparticles and its biomedical applications. *Nanotechnology Applications in Health and Environmental Sciences*, 83:109
- Sadovnikov, S. I. and Gusev, A. I. (2014). Chemical deposition of nanocrystalline lead sulfide powders with controllable particle size. *Journal of Alloys and Compounds*, 586: 105–112
- Satomi, M., Myron, T., Duc, L. and Venkateswaran, K. (2006). *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 1735–1740
- Soosani, N., Ashengroph, M. and Chehri, Kh. (2021). Extracellular green synthesis of zinc oxide nanoparticle by using the cell-free extract *Rhodotorula pacifica* NS02 and investigation of their antimicrobial activities. *Nova Biologica Reperta*, 8: 195-205 [Article in Persian]
- Suresh, A. K., Doktycz, M. J., Wang, W., Moon, J. W., Gu, B., Meyer, H. M. and Pelletier, D. A. (2011). Monodispersed biocompatible silver sulfide nanoparticles: facile extracellular biosynthesis using the *γ-proteobacterium*, *Shewanella oneidensis*. *Acta biomaterialia*, 7: 4253-4258
- Tijjani, M., Norashiqin, M., Nur Raihana, I., Abdullahi, M. D. and Ngah, Z. U. (2022). A Review on plants and microorganisms mediated synthesis of silver nanoparticles, role of plants metabolites and applications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19: 674
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173:697–703
- Zhang, C., Zhang, S., Yu, L., Zhang, Z., Zhang, P. and Wu, Z. (2012). Size-controlled synthesis of monodisperse Ag₂S nanoparticles by a solvent less thermolytic method. *Materials Letters*, 85: 77-80

Green synthesis and characterization of silver sulfide nanoparticles using *Bacillus safensis* strain GMS10 isolated from contaminated soil of gold mine

M. Ashengroph*¹, S. Daj²

Received:2022.2.16

Accepted: 2022.6.25

Abstract

Introduction: This study aimed to isolate and identify the *silver-resistant bacteria and investigate on their potential in the biological synthesis of silver sulfide nanoparticles (Ag₂SNPs)*. **Methods:** Preliminary characterization of the Ag₂SNPs was carried out using visual observations and UV-Visible spectroscopy. Scanning Electron Microscopy (SEM) with Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDX) was used to determine size, morphology and elemental analysis of the nanoparticles. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis was performed to determine the functional groups involved in the bioreduction of silver sulfate into Ag₂SNPs. **Results and discussions:** Based on the results, *Bacillus safensis* strain GMS10 with highest tolerance to silver sulfate (50 mM) was able to synthesize spherical shape of Ag₂SNPs with an average size diameter of 22.2 nm under optimized conditions (1 mM silver sulfate, 15 g/L biomass) after 36 h incubation. This study is the first report on the synthesis of Ag₂SNPs using *B. safensis*.

Keywords: *B. safensis, Biosynthesis, Characterization, Silver sulfide nanoparticle, Soil*

1. Associate Professor in Industrial Microbiology, Dept. of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Kurdistan, Sanandaj, Iran (*Corresponding authorEmail: m.ashengroph@uok.ac.ir)

2.MSc Student in Biochemistry, Dept. of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Kurdistan, Sanandaj, Iran