

*Азизи Карам Хан
старший преподаватель
кафедра биологии
педагогический факультет
Панджшерский университет Афганистан
Афганистан, г. Панджшер
e-mail: azizikaramkhan11@gmail.com*

*Махбуб Махбубулла
старший преподаватель
кафедра биологии
педагогический факультет
Панджшерский университет Афганистан
Афганистан, г. Панджшер
e-mail: mahboobullah.mahboob2@gmail.com*

ПРОДУКЦИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МЕДИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНОЙ САКРОТРОФНОЙ БАКТЕРИЕЙ STENTROPHOMONAS SP

***Аннотация:** Наночастицы оксида меди используются в широком спектре биологических и небιологических наук благодаря своим уникальным физическим и химическим свойствам. Сегодня использование биологических систем для производства наночастиц привлекает внимание в связи с их экологичностью, токсичностью и меньшей стоимостью. В этом исследовании был проведен потенциал производства наночастиц оксида меди холодоустойчивым штаммом OSRP95. Наночастицы были охарактеризованы с помощью спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой областях (UV-vis), инфракрасного преобразования Фурье (FTIR), дифракции рентгеновских лучей (XRD) и динамического рассеяния света (DLS). Молекулярную идентификацию штамма проводили путем амплификации и секвенирования гена 16S рРНК, которые показали, что ближайший штамм имеет 100% сходство с *Stentrophomonas rhizophila*. Результаты ДРС показали, что средний размер наночастиц оксида меди составляет 52,41 нм. Согласно результатам, полученным в этом исследовании, холодоустойчивые бактерии обладают высоким потенциалом в производстве наночастиц оксида меди.*

Ключевые слова: *Stentrophomonas sp.*, НЧ CuO, психротрофные бактерии.

*Azizi Karam Khan
Senior Lecturer*

*Department of Biology
Faculty of Education
Panjshir University Afghanistan
Afghanistan, Panjshir*

*Mahbub Mahbubullah
Senior Lecturer
Department of Biology
Faculty of Education
Panjshir University Afghanistan
Afghanistan, Panjshir*

EVALUATION OF THE POTENTIAL OF COPPER OXIDE NPS PRODUCTION BY GRAM NEGATIVE PSYCHROTROPHIC STENTROPHOMONAS SP.

Abstract: *Due to their unique physical and chemical properties, copper oxide nanoparticles have been used in a wide range of biological and non-biological sciences. The use of bio-systems in the production of nanoparticles today has received increasing attention due to their environmental friendliness, low toxicity and low cost. In this study, the potential of producing copper oxide nanoparticles was investigated by the coldtolerant strain of OSRP95. The NPs were characterized by ultraviolet-visible (UV-vis), Fourier-infrared (FTIR), dynamic X-ray diffraction (XRD) and light scattering (DLS) techniques. Molecular characterization of the strain was performed by amplification and sequencing of 16S rRNA gene, which showed that the closest strain had 100% similarity to Stentrophomonas rhizophila. The DLS results showed that the average size of copper NPs were 52.41 nm, respectively.*

According to the results, cold tolerant bacteria have high potential to produce copper oxide NPs. Copper nanoparticles synthesized by Stentrophomonas sp.

Key words: *Stentrophomonas sp., CuO NPs, Psychrotrophic bacteria.*

Введение: Нанотехнология — это общий термин, который относится ко всем передовым технологиям в области наноразмерных работ.

Наночастицы могут быть синтезированы различными методами, в том числе физическими, химическими и биологическими методами, а также двумя способами: «сверху вниз» и «снизу вверх». Для химико-биологического синтеза наночастиц в основном используют восходящий метод, преимуществом которого является возможность получения наночастиц металлов с наименьшими дефектами и

наиболее однородными химическими соединениями. В соответствии с глобальными усилиями по разработке эффективных методов энергопотребления и сокращению производства опасных отходов большое значение приобрело использование зеленого синтеза для производства наночастиц металлов. В природе живые организмы могут производить неорганические материалы посредством биологических процессов, которые называются минерализацией. В процессах биоминерализации используются биомолекулярные шаблоны, во время которых они реагируют с небиологическими материалами, что приводит к контролируемому и эффективному производству наночастиц.

Синтез наночастиц металлов биологическим методом можно осуществить одним из следующих двух возможных способов:

Первый метод — это метод биологического восстановления, который называется биовосстановлением; В ходе него ионы металлов регенерируются и переходят в более устойчивые биологические формы. Многие организмы обладают способностью к диссимиляционной редукции металлов (dissimilatory metal recovery), в ходе которой ионы металлов восстанавливаются окисляющими ферментами и образуются нейтральные и стабильные наночастицы металлов. Второй метод — биосорбция, который предполагает получение наночастиц металлов из образцов воды и почвы на поверхности живых организмов, таких как клеточные стенки, и не требует затрат энергии. Некоторые бактерии, грибы и растения продуцируют пептиды или имеют модифицированную клеточную стенку, которая прикрепляется к ионам металлов и может образовывать стабильные комплексы в виде наночастиц.

Материалы и методы: В этом исследовании оценивался потенциал производства наночастиц оксида меди холодоустойчивой бактерией *Stentrophomonas rhizophila*. Это исследование было проведено в сотрудничестве с Лабораторией клеточных и тканевых культур кафедры клеточной и молекулярной

биологии факультета естественных наук Мешхедского университета Фирдоуси в Иране в 2018 году.

Приготовление раствора для хранения соли: В ходе этих исследований потребовались разные концентрации солей меди $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, которые были использованы для их приготовления из концентрированного раствора с определенным процентом чистоты и стандартом в один моль. Для приготовления 50 мл растворов сульфата меди и нитрата меди с концентрацией один моляр взвешивали 12,05 и 12,45 г порошка солей $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ и доводили до 50 мл деионизированной водой. После этого вышеуказанные растворы фильтровали под ламинарным колпаком с фильтром 0,22 мкм и выдерживали при температуре 4°C.

Исследуемые штаммы: В данном исследовании 44 штамма, в том числе морозостойкие штаммы, были впервые исследованы с точки зрения потенциала синтеза наночастиц оксида меди.

Исследование устойчивости штаммов к солям меди: Для определения максимальной летальной концентрации готовили по 200 мл твердой питательной среды (ТСБ) с различными концентрациями (2,5, 5, 10, 25 и 50 ммоль/л) указанных солей в отдельных сосудах. Содержимое колб переносили в планшет и выдерживали при 20°C в течение 24 часов. Чашки без соли считались контролем роста бактерий [2].

Остальные пластины были разделены на разные части. На каждое деление чашки высевали по 5 мкл 24-часовой суспензии микробных культур исследуемых штаммов. Планшеты помещали при 20°C на 48 часов. В качестве МТС была введена высокая концентрация металла, в которой не могут расти бактерии.

Изучение способности бактерий производить наночастицы: В этом исследовании использовались различные методы для получения наночастиц оксида меди.

Сначала выделенные штаммы холодоустойчивых бактерий нагревали в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл, содержащих 50 мл среды ТСБ без солей меди и цинка, при 20°C со скоростью 150 об/мин в течение 24 часов. Затем были выполнены следующие действия [4].

Производство наночастиц оксида меди с использованием целостности бактериальных клеток: Бактерии инокулировали в среду TSB без соли и инкубировали при 20°C и 120 об/мин в течение 48 часов. Из инокулированной смеси отбирали 50 мл и добавляли к инокулированной смеси такое же количество сульфата меди и 0,01 М нитрита меди, чтобы конечная концентрация соли меди в реакционной смеси достигала 0,005 М. Реакционную смесь выдерживали 7 дней при 120°C при 20°C. Если бактерии способны продуцировать наночастицы оксида меди, цвет реакционной смеси меняется со светло-голубого на темно-зеленый и, наконец, на коричневый.

Синтез наночастиц с использованием бактериальной биомассы: Отобранные штаммы инокулировали в среду TSB без соли и выдерживали в теплице в течение 96 часов при подходящей температуре 20°C при 120 об/мин. Затем для отделения бактериального осадка культуральную среду центрифугировали в течение 15 минут при 5000 об/мин. Полученный бактериальный осадок трижды промывали физиологической сывороткой и доводили до 100 мл физиологической сывороткой. К нему отдельно добавляли 100 мл 0,01 М раствора соли (5% сульфата меди и 3% нитрита меди). К 50 мл раствора надосадочной жидкости добавляли 1 мл раствора указанных солей с концентрацией 0,5 М. Указанные реакционные смеси выдерживали в термостате при определенной температуре в течение 24 часов. Наконец, растворы осветлителя были удалены из-за отсутствия образования осадка. Но смеси биомасс разделяли по предыдущему методу [5].

Синтез наночастиц с использованием осветлителя экстракта клеточного лизата (CLS): Инокуляцию отобранных штаммов в среду TSB без соли и оставляют на 48 часов при 200 об/мин при соответствующей температуре для каждого штамма

до их инкубации. Бактериальные клетки центрифугировали при 7500 об/мин в течение 20 минут для сбора биомассы. Полученный осадок промывали стерильной дистиллированной водой (7500 об/мин, 20 мин). 1 г полученной биомассы добавляли в колбу, содержащую 100 мл стерильной дистиллированной воды, и инкубировали в течение 24 часов при подходящей температуре [7].

Воздействие ультразвука на бактериальные клетки в течение 20 минут до их лучшего лизиса. Затем суспензию лизированных клеток центрифугировали (5000 об/мин, 20 минут). Добавляли 1 мл растворов сульфита меди и 1 М растворов нитрита меди к 100 мл клеточного экстракта (получающийся супернатант). При добавлении солей в растворе Эрленса появлялся белый осадок. Для завершения процесса биосинтеза эрлины выдерживали при комнатной температуре в течение 48 часов [6].

Результаты и обсуждение

Исследование устойчивости штаммов к солям меди: После очистки бактерий оценивали устойчивость 44 холодоустойчивых штаммов к соли сульфита меди и нитриту меди в концентрациях (2,5, 5, 10, 25 и 50 ммоль/л). Результаты показали, что более 20 штаммов обладают устойчивостью в концентрациях менее 5 мМ. Среди исследованных штаммов были отобраны два холодоустойчивых штамма OSR35 и OSRP95 и для получения наночастиц использовали концентрацию, при которой все штаммы были способны расти (5 ммоль/л сульфитной соли). Поэтому для продолжения анализа молекулярно идентифицировали два холодоустойчивых штамма [8].



Рисунок (1) Тест на устойчивость бактерий к исследуемым солям в концентрации 5 мМ

Молекулярная идентификация штаммов: Ген 16S рРНК использовали для молекулярной идентификации выбранных штаммов. Штамм OSRP95 имеет 100% сходство с *Stentrophomonas rhizophila* (CP007597), а штамм OSR35 имеет сходство 99/78 с *Pseudomonas cedrina* (AF064461). Филогенетическое дерево выбранных штаммов было построено с использованием программного обеспечения MEGA7 на основе модели Neighbor-joining [9].

Согласно предварительным анализам наночастиц, полученных из двух холодостойких штаммов и новизны штамма, OSRP95 *Stentrophomonas* sp. Его использовали для получения наночастиц [10].

Синтез наночастиц при освещении микробной культуры при нагревании в автоклаве: После добавления соли сульфата меди в осветитель микробных культур и помещения образцов в автоклав мы наблюдали усиление изменения цвета образца. Как упоминалось ранее, это изменение цвета является первым признаком образования наночастиц. Фактически, именно применение высокого давления и температуры вызывает большой доступ и реакционную способность ионов металлов с функциональными группами и вторичными метаболитами, присутствующими в осветителе микробной культуры. Реакция протекает постепенно в автоклавных условиях при температуре от 25 до 120 градусов Цельсия, что вызывает переход катионов металлов с низких энергетических уровней на высокие и их регенерацию вблизи функциональных групп в реакционном растворе. Также во многих исследованиях упоминается важная роль НАДН-зависимых ферментов в этих переносах электронов при биологическом производстве наночастиц. На рисунке (4) показано производство наночастиц оксида меди с помощью этого метода. Ганбари и др. (2017) удалось получить

наночастицы серебра, используя супернатант *Aspergillus fumigatus* в условиях автоклава.

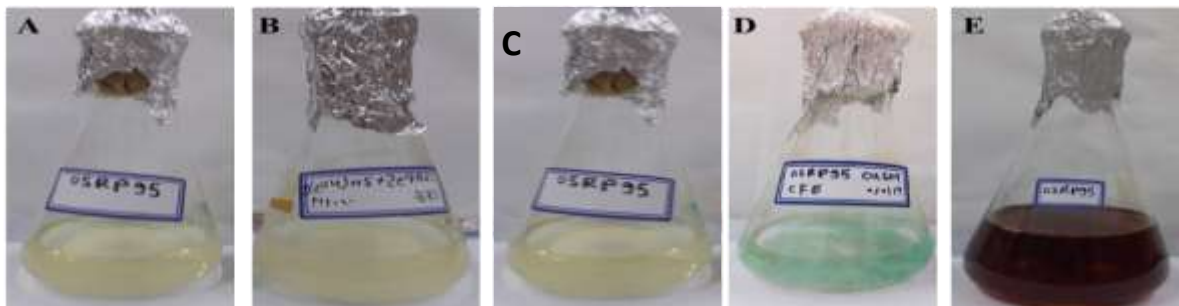
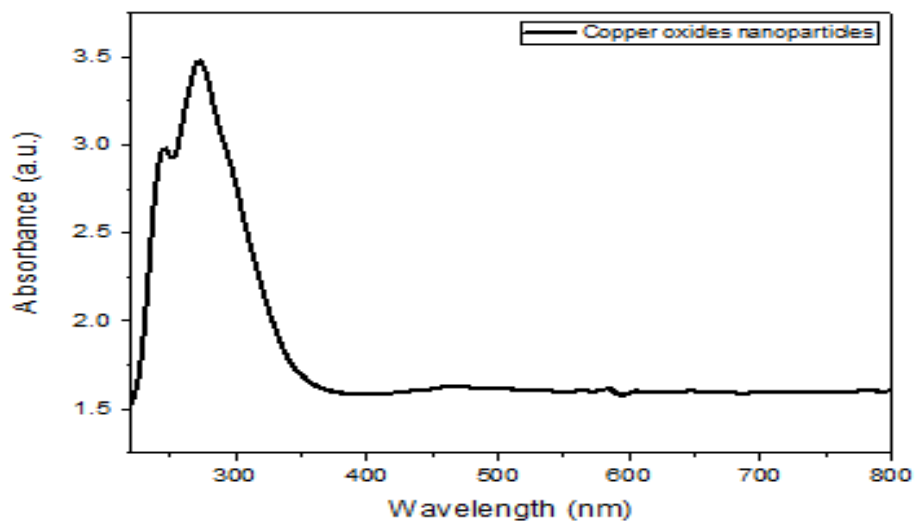


Рисунок (2) – получение наночастиц методом освещения микробной культуры с нагревом в автоклаве. А, освещение микробной культуры, В и С освещение солью сульфата меди перед

Характеристика наночастиц:- УФ-видимый спектроскопический анализ: Одним из простейших методов определения характеристик наночастиц и первым практическим шагом в подтверждении получения металлических наночастиц является использование УФ-видимой спектроскопии. Пик поглощения при длине волны от 250 до 350 нм указывает на образование наночастиц оксида меди [12].



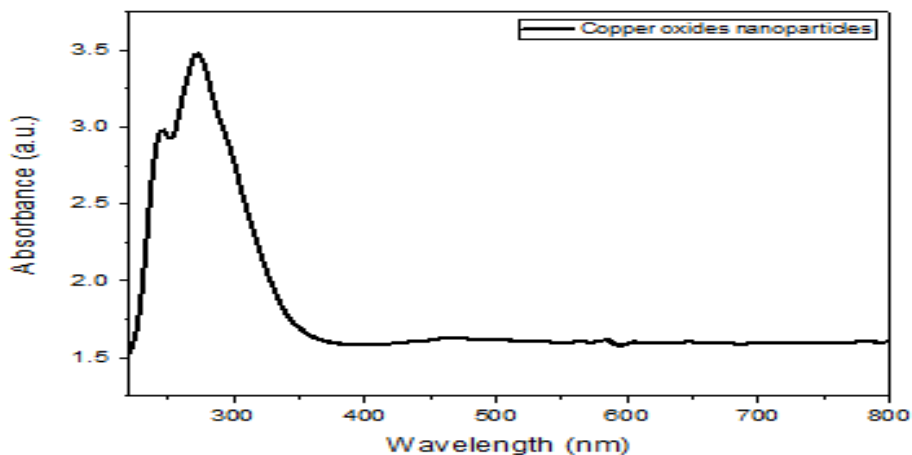


Рисунок (3) Диаграмма УФ-видимой спектроскопии для наночастиц оксида меди, продуцируемых OSRP95 *Stentrophomonas sp.*

ДЛС-анализ: Средний размер наночастиц, характер их распределения по размерам и индекс дисперсии частиц в образце раствора наночастиц оксида меди были исследованы с помощью DLS (рис. 6). Результаты диаграммы распределения по размерам показали, что средний размер наночастиц оксида меди, как сообщается, составляет 52,41 нм.

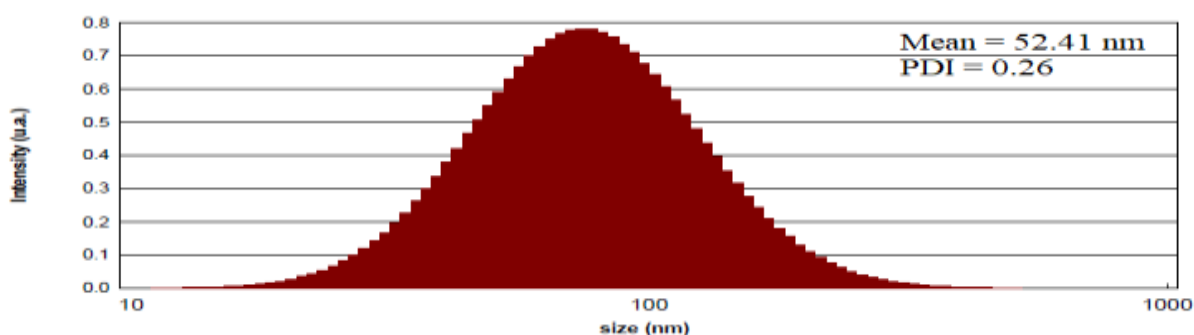


Рисунок (4) Распределение размеров наночастиц оксида меди, продуцируемых OSRP95 *Stentrophomonas sp.*

Рентгенофазовый анализ (рентгеновская дифракция): Понятно, что каждая металлическая наночастица имеет один или несколько нанокристаллов и, следовательно, имеет специфическую кристаллическую структуру. Тип этих структур наночастиц определяется рентгеноструктурным анализом образца

порошка родственных частиц. В данном исследовании был проведен рентгеноструктурный анализ высушенного порошка наночастиц оксидов цинка и меди, полученных под углом 2θ в диапазоне сканирования от 20 до 80 градусов, с целью определения типа решетки и подтверждения кристаллической структуры этих наночастиц. Все спектры XRD от Match! Ver 3.3.0 85 построено и сопоставлено с существующими базами данных [11].

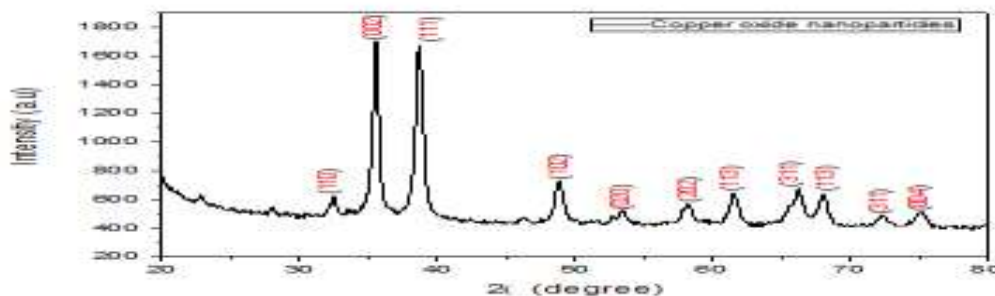


Рисунок (5) Рентгеноструктурный анализ наночастиц оксида меди, полученных OSRP95 *Stentrophomonas sp.*

ИК-Фурье-спектроскопический анализ: На рисунках (8) показан FTIR-спектр полученных наночастиц. Согласно достоверным источникам, пик поглощения в области 3200-3600 cm^{-1} связан с колебаниями N-H в аминах первого типа (в пептидных связях) или O-H в спиртовых и фенольных группах, пик поглощения в области 2840-3000 cm^{-1} относится к валентным связям Метил C-H в альдегидных соединениях, cm^{-1} от 1640 до 1690 соответствует валентным колебаниям карбонила C=O, cm^{-1} от 1020 до 1360 соответствует валентным колебаниям C-N в алифатических и ароматических аминах, cm^{-1} 1400 до 1600 соответствует валентным колебаниям C=C в ароматических кольцах или колебаниям N-H в аминах второго типа, cm^{-1} 1675-1000 относятся к связям C-H в ароматических соединениях [13].

Отчетливые пики в области менее 500 cm^{-1} свидетельствуют об образовании оксидов металлов. Наличие пиков в районе 435 указывает на образование наночастиц оксида меди. В своих исследованиях Падил и др. связали наличие пиков

525 и 580 с образованием структур оксида меди, что согласуется с результатами этого исследования.

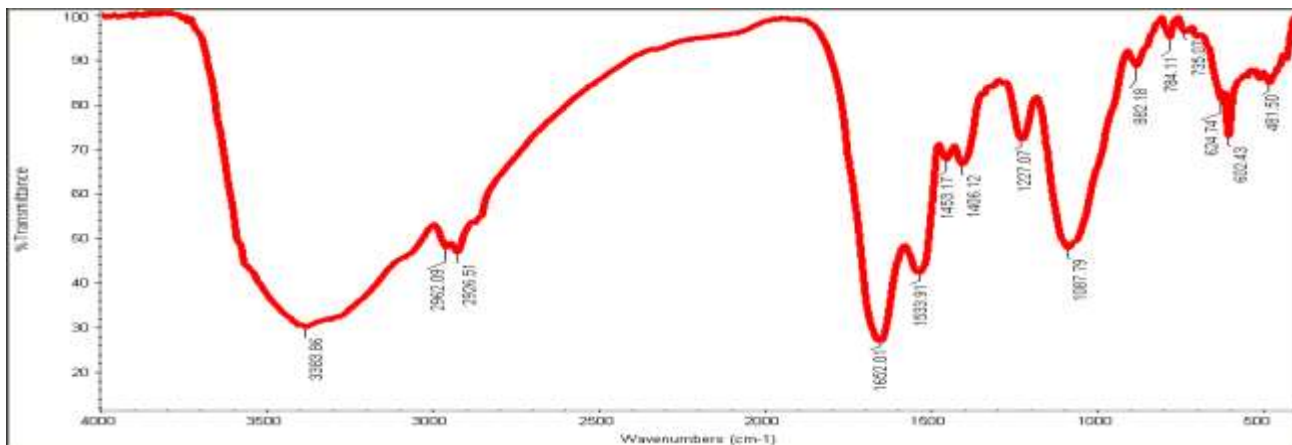


Рисунок 1. (б) Инфракрасный спектроскопический анализ с преобразованием Фурье для оксидных наночастиц.

Определение дзета-потенциала: Дзета-потенциал, представляющий собой электрический потенциал вокруг частиц в коллоидном растворе, является индикатором стабильности наночастиц [15].

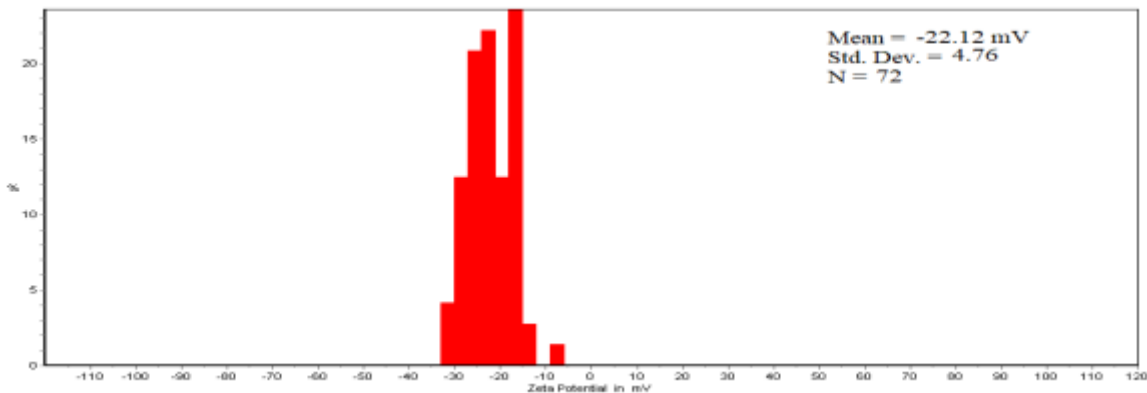


Рисунок (7) – гистограмма дзета-потенциала наночастиц оксида меди

Было обнаружено, что дзета-потенциал наночастиц оксида меди составляет -22,12 (рис. 9): Согласно проведенным исследованиям, средний дзета-потенциал выше +30 мВ и ниже -30 мВ свидетельствует о высокой стабильности наночастиц. Эта стабильность важна для предотвращения слипания наночастиц. Согласно

полученным результатам, полученные наночастицы обладают хорошей относительной стабильностью. Апарна и др. сообщили, что дзета-потенциал наночастиц оксида меди, полученных в их исследованиях, составляет -35 мВ, что немного отличается от настоящего исследования, что может быть связано с размещением различных функциональных групп на поверхности наночастиц в этих биологических методах [14].

АСМ анализ: На рисунке (10) показаны двумерные и трехмерные изображения, полученные в результате АСМ-анализа. Высота наночастиц оксида меди составляет 38,2 нм, что указывает на диаметр этих наночастиц. Результаты этого анализа немного отличаются от результатов анализа PSA, связано с разной производительностью этих двух устройств при регистрации изображений и измерении наночастиц [16].

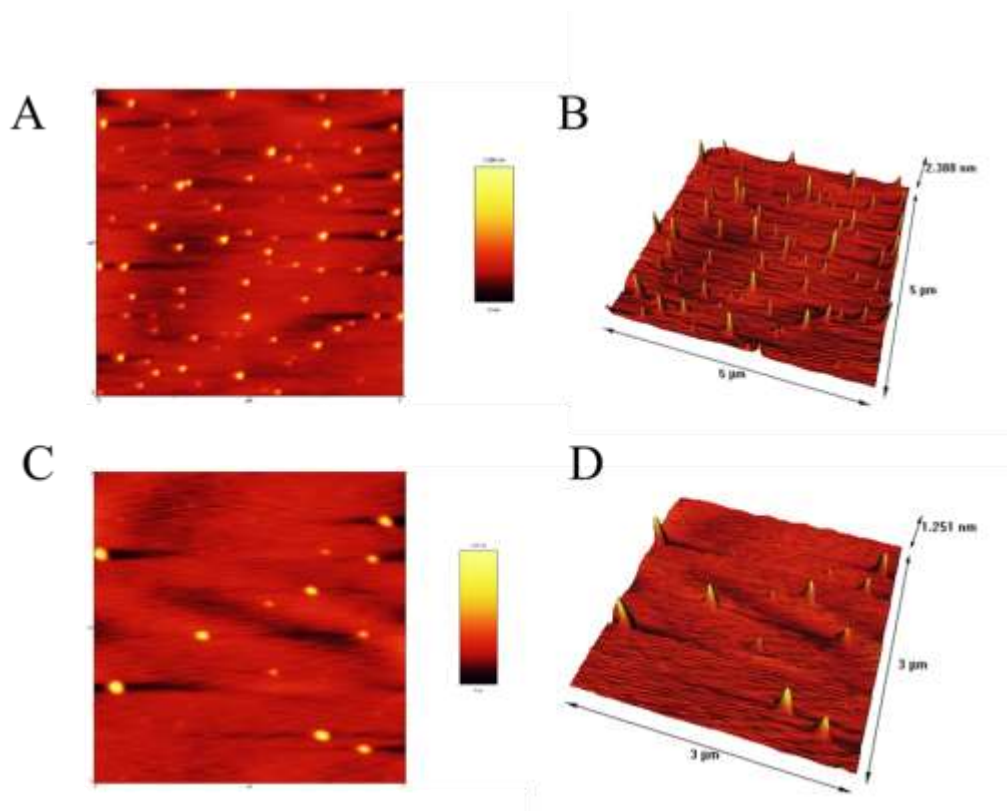


Рисунок (8) АСМ-изображения наночастиц оксида меди (A,B)). A и C — двумерные изображения, B и D — трехмерные изображения.

Вывод: В этом исследовании использовался недорогой, простой, быстрый и экологически безопасный метод биологического производства наночастиц оксида меди. После проверки устойчивости 44 выделенных штаммов к различным солям меди был выделен холодоустойчивый штамм *Stentrophomonas* sp. Был выбран OSRP95 и оценена его способность производить наночастицы. Среди различных методов использование метода клеточного лизированного экстракта вместе с нагреванием в условиях автоклава показало самую высокую эффективность производства и использовалось в качестве основного метода в этом исследовании для получения наночастиц. Полученные наночастицы анализировали с помощью УФ-видимого излучения, XRD, FTIR, DLS и дзета-потенциала. По результатам DLS-анализа наночастицы оксида меди имели средний размер 52,41 нм. Было определено, что дзета-потенциал наночастиц оксида меди составляет -22,12 мВ, что указывает на относительную стабильность этих наночастиц при физиологических значениях pH.

Список литературы:

1. Бахтиари Али Оценка противоракового действия наночастиц меди на холодоустойчивые бактерии, выделенные из высокогорья Загрос. 2017. 123 с.
2. Ашенграф Мурам. Представляем новый штамм дрожжей *Candida* sp. штамм MY2 с цитотоксической силой нанокристаллов оксида меди. Журнал клеточных и молекулярных исследований // Иранский журнал биологии. 2017. 27 с.
3. Ашенграф, Мурам. Выделение и идентификация нативного штамма грибов *Aspergillus niger* ZRS14 со способностью синтезировать наночастицы меди и его биологические свойства // Ежеквартальный научно-исследовательский журнал биологии микроорганизмов. 2013. С. 34-38.
4. V Singh A, Patil R, Anand A, Milani P, Gade WJCN. Biological synthesis of copper oxide nano particles using *Escherichia coli*. 2010. 112 p.

5. Shakya S, Pradhan B, Smith L, Shrestha J, Tuladhar S. Isolation and characterization of aerobic culturable arsenic-resistant bacteria from surfacewater and groundwater of Rautahat District, Nepal. *Journal of environmental management*. 2012. 66 p.
6. Thomas R, Janardhanan A, Varghese RT, Soniya E, Mathew J, Radhakrishnan E. Antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized by marine *Ochrobactrum* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014. Pp. 45-49.
7. Singh A, Patil R, Anand A, Milani P, Gade W. Biological synthesis of copper oxide nano particles using *Escherichia coli*. *Current Nanoscience*. 2010. 88 p.
8. Basavarajappa A, Neelagund SE. An Investigation on Antibacterial Efficacy of Biosynthesized Novel Copper nanoparticles using Silkworm fecal matter. 2015. 67 p.
9. Nakhaeepour Z, Mashreghi M, Matin MM, NakhaeiPour A, Housaindokht MRJLs. Multifunctional CuO nanoparticles with cytotoxic effects on KYSE30 esophageal cancer cells, antimicrobial and heavy metal sensing activities. 2019. 77 p.
10. Ghanbari S, Vaghari H, Sayyar Z, Adibpour M, Jafarizadeh-Malmiri HJGP, Synthesis. Autoclave-assisted green synthesis of silver nanoparticles using *A. fumigatus* mycelia extract and the evaluation of their physico-chemical properties and antibacterial activity. 2018. Pp. 24-34.
11. Shankar S, Rhim J-WJML. Effect of copper salts and reducing agents on characteristics and antimicrobial activity of copper nanoparticles. 2014. 132 p.
12. Honary S, Barabadi H, Gharaei-Fathabad E, Naghibi F. Green synthesis of silver nanoparticles induced by the fungus *Penicillium citrinum*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013. 11 p.
13. Mallick P, Sahu SJN, Nanotechnology. Structure, microstructure and optical absorption analysis of CuO nanoparticles synthesized by sol-gel route. 2012. 71 p.
14. Shatnawi M, Alsmadi A, Bsoul I, Salameh B, Mathai M, Alnawashi G, et al. Influence of Mn doping on the magnetic and optical properties of ZnO nanocrystalline particles. 2016. 79 p.

15. Das M, Biswas A, Chowdhury M, Saha JJIJoPR, Sciences H. Screening antimicrobial susceptibility of gentamicin, vancomycin, azithromycin, chloramphenicol and cefotaxime against selected gram positive and gram negative bacteria. 2014. 31 p.
16. Harne S, Sharma A, Dhaygude M, Joglekar S, Kodam K, Hudlikar MJC, et al. Novel route for rapid biosynthesis of copper nanoparticles using aqueous extract of *Calotropis procera* L. latex and their cytotoxicity on tumor cells. 2012. 95 p.
17. Aparna Y, Rao KV, Subbarao PS. Preparation and characterization of CuO Nanoparticles by novel sol-gel technique. 2012. 88 p.
18. Singh S, Vidyarthi AS, Nigam VK, Dev A. Extracellular facile biosynthesis, characterization and stability of gold nanoparticles by *Bacillus licheniformis*. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. 2014. 42 p.