



Research Paper
Biological Journal of Microorganism
11th Year, No. 42, Summer 2022
Received: July 19, 2021
Accepted: September 25, 2021

Synthesis of Gold Nanoparticles Using Exopolysaccharide from *Lactobacillus Paracasei* and Evaluation of their Antibacterial, Anti-biofilm, and Antioxidant Properties

Mahyar Zeinivand

Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran, mahyarzeinivand2019@gmail.com

Seyed Soheil Aghaei*

Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran, soheilaghae@yahoo.com

Mohsen Zargar

Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran, zmohsen2002@yahoo.com

Mohammad Ali Ghasemzadeh

Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran, qasemzade.a@gmail.com

Abstract

Introduction: Although there are different methods for the production of nanoparticles, today the synthesis of nanoparticles with biological methods has attracted the attention of researchers because it is an easy, environmentally friendly, and cost-effective method. The present study investigates the biosynthesis of gold nanoparticles using *Lactobacillus paracasei* (MN809528) exopolysaccharide and studies the antibacterial, anti-biofilm, and antioxidant properties.

Materials and Methods: For the synthesis of gold nanoparticles, 30 ml of 1% exopolysaccharide (0.1 g) solution was added to an equal volume of 1 mM aqueous HAuCl₄ solution and mixed well using stirred (180 rpm) for 48 h at room temperature. The characterization of synthesized gold nanoparticles was performed using UV-VIS, FT-IR, DLS, XRD, EDX, FE-SEM spectroscopic analysis. Antibacterial activity of produced gold nanoparticles by agar well diffusion method, anti-biofilm activity by 96 well microplate dilution


* Corresponding author

2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



 [10.22108/BJM.2021.129552.1404](https://doi.org/10.22108/BJM.2021.129552.1404)

 [20.1001.1.23225173.1401.11.42.3.2](https://doi.org/20.1001.1.23225173.1401.11.42.3.2)

method, and antioxidant activity of nanoparticles using DPPH radical adsorption capability were examined.

Results: Spectroscopic data showed the presence of a peak at 524 nm, which is specific to gold nanoparticles. Examination of the shape and size of nanoparticles with FE-SEM showed that the produced nanoparticles were spherical in shape and their average size is 20-50 nm. Antibacterial activity of gold nanoparticles at a concentration of 50 µg /ml was observed against all bacterial tests. However, the highest antibacterial activity was observed against *Acinetobacter baumannii* (ATCC 17978). In the present study, the gold nanoparticles produced acted as biofilm and DPPH radical inhibitors.

Discussion and Conclusion: The results of the study show that *Lactobacillus paracasei* (MN809528) is a good biological source for the synthesis of gold nanoparticles. The study is the first report on the production of gold nanoparticles by exopolysaccharides isolated from indigenous lactic acid bacteria.

Key words: Exopolysaccharide, Gold Nanoparticles, Antibacterial, Anti-biofilm, Antioxidant

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)

سال یازدهم، شماره ۴۲، تابستان ۱۴۰۱، صفحه ۸۳ - ۶۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۰۳

سنتز نانوذرات طلا با استفاده از آگزوپلی ساکارید لاکتوباسیلوس پاراکازئی و ارزیابی خصوصیات ضدباکتریایی، ضدبیوفیلمی و آنتی‌اکسیدانی آنها

مهیار زینی‌وند: دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران، mahyarzeinivand2019@gmail.com
سید سهیل آقایی*: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران، soheilaghae@yahoo.com
محسن زرگر: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران، zmohsen2002@yahoo.com
محمدعلی قاسم‌زاده: دانشیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران، qasemzade.a@gmail.com

چکیده

مقدمه: روش‌های مختلفی برای تولید نانوذرات وجود دارند؛ اما امروزه سنتز نانوذرات با روش‌های زیستی به دلیل آسان بودن، سازگاری با محیط زیست و مقرون به صرفه بودن، توجه محققان را به خود جلب کرده است. هدف از پژوهش اخیر سنتز زیستی نانوذرات طلا با استفاده از آگزوپلی ساکارید لاکتوباسیلوس پاراکازئی (MN809528) و بررسی فعالیت ضدباکتریایی، ضدبیوفیلمی و آنتی‌اکسیدانی است.

مواد و روش‌ها: برای سنتز نانوذرات طلا ۳۰ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد آگزوپلی ساکارید (۰/۱ گرم) به حجم مساوی از محلول آبی HAuCl_4 یک میلی‌مولار اضافه و با استفاده از استیرر (۱۸۰ rpm) به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق به خوبی مخلوط شد. ویژگی نانوذرات طلا سنتز شده با استفاده از آنالیزهای طیف‌سنجی UV-VIS، FT-IR، DLS، XRD، EDX، FE-SEM انجام شد. فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات طلا تولید شده با روش انتشار در چاهک، فعالیت ضدبیوفیلمی با روش رقت در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات با استفاده از قابلیت جذب رادیکال‌های DPPH بررسی شد.

نتایج: داده‌های طیف‌سنجی، وجود پیک در ۵۲۴ نانومتر را نشان دادند که ویژه نانوذرات طلا است. بررسی شکل و اندازه نانوذرات با FE-SEM نشان داد نانوذرات تولید شده کروی شکل‌اند و به طور متوسط اندازه آن‌ها ۵۰-۲۰ نانومتر است. فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات طلا با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در برابر همه باکتری‌های تست مشاهده شد؛ با این حال، بیشترین فعالیت ضدباکتریایی در برابر *اسیتوباکتر بومانی* (ATCC 17978) مشاهده شد. در این مطالعه نانوذرات طلا تولید شده به عنوان مهارکننده بیوفیلیم و رادیکال DPPH عمل کردند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهند لاکتوباسیلوس پاراکازئی (MN809528)، منبع زیستی خوبی برای سنتز نانوذرات طلا است. مطالعه حاضر، نخستین گزارش از تولید نانوذرات طلا توسط آگزوپلی ساکارید جدا شده از باکتری‌های اسید لاکتیک بومی است.

واژه‌های کلیدی: آگزوپلی ساکارید، نانوذرات طلا، ضدباکتریایی، ضدبیوفیلمی، آنتی‌اکسیدانی

* نویسنده مسئول مکاتبات



2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



10.22108/BJM.2021.129552.1404



https://bjm.ui.ac.ir/article_25982.html

مقدمه

در علم نانو تکنولوژی سنتز نانومواد مختلف در زمینه‌های مختلف از قبیل پزشکی (هدف‌گیری دارو، تصویربرداری و بیوسنسورها) علوم غذایی و علوم محیطی کاربرد دارد (۱ و ۲). با توجه به غلبه و افزایش میکروارگانیسم‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک و همچنین افزایش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی، بسیاری از محققان علاقمند به توسعه روش‌های ضد میکروبی مؤثر و جدید بدون مقاومت هزینه‌های بالا هستند (۳). نانوذرات فلزی به‌عنوان یک نسل جدید از عوامل ضد میکروبی و یک ابزار مقرون‌به‌صرفه برای غلبه بر مشکلات مقاومت دارویی به باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تقسیم شده‌اند (۴). در گذشته روش‌های شیمیایی و فیزیکی مختلف برای تولید نانوذرات استفاده شده‌اند. سنتز نانوذرات با استفاده از روش‌های شیمیایی و فیزیکی معمولی دارای عملکرد پایین و دشوار، به‌دما، فشار و زمان زیادی نیاز دارند و هزینه‌بر هستند و در این روش‌ها آماده کردن نانوذرات با یک اندازه مناسب دشوار است؛ بنابراین، امروزه برای تولید نانوذرات از روش‌های زیستی استفاده می‌شود. سنتز زیستی یک رویکرد سازگار با محیط زیست و مقرون‌به‌صرفه است که در آن از پلی‌مرهای تجزیه‌پذیر زیستی می‌توان برای احیای یون‌های فلزات، پایداری و تثبیت فلزات استفاده کرد (۵). باکتری‌ها، قارچ‌ها و عصاره گیاهی مختلف پتانسیل تولید و سنتز نانوذرات را دارند. تاکنون از میکروارگانیسم‌ها برای سنتز نانوذرات مختلف مانند طلا، نقره، آهن، پلاتین، سولفید کادمیوم و تیتانیوم استفاده شده است (۶). بین نانوذرات، نانوذرات طلا دارای کاربردهایی در زمینه زیست پزشکی به‌عنوان عوامل آنتی‌باکتریال،

آنتی‌HIV، آنتی‌بیوفیلیم، آنتی‌تومور و آنتی‌مالاریا هستند (۷). علاوه بر این، نانوذرات طلا به‌دلیل کم‌بودن سمیت، ثبات بالا و فعالیت کاتالیزوری توجه محققان را به خود جلب کرده‌اند (۸). پلی‌ساکاریدها یک گروه متنوع از ماکرومولکول‌های زیستی‌اند که در ارگانیسم‌های مختلف یافت می‌شوند؛ آنها طبیعی، غیرسمی و تجزیه‌پذیرند و در فرایندهای زیستی مختلف مانند پاسخ ایمنی، عفونت و انتقال سیگنال نقش دارند (۹). پلی‌ساکاریدها به‌طور فزاینده‌ای به‌عنوان عوامل کاهش‌دهنده و تثبیت‌کننده برای تولید نانوذرات به کار می‌روند؛ زیرا مزایای متعددی دارند. زنجیره ماکرومولکولی این پلی‌مرهای زیستی، گروه‌های هیدروکسیل بسیاری دارند که با یون‌های فلزی پیوند قوی برقرار می‌کنند و به احیای یون، کنترل شکل، اندازه و پراکندگی نانوذرات تشکیل شده منجر می‌شوند. علاوه بر این، پلی‌ساکاریدها دارای عملکرد با ارزشی از قبیل موکوده‌سین هستند و یک پوشش خنثی با انرژی سطح پایین را فراهم و تشخیص گیرنده‌های غیراختصاصی پروتئین را محدود می‌کنند. همچنین، آگروپلی‌ساکاریدها معمولاً شامل گروه‌های عملکردی مختلفی‌اند که نقش مهمی در پایداری نانوذرات فلزی دارند (۱۰ و ۱۱). باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده آگروپلی‌ساکارید متعلق به گونه‌های *استرپتوکوکوس*، *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوکوکوس*، *لوکونوستوک* و *پدیوکوکوس* هستند. مطالعات نشان دادند برخی از سویه‌های بیفید یوباکتر توانایی تولید این بیوپلی‌مرها را دارند (۱۲ و ۱۳). نانوذرات فلزی سنتز شده توسط آگروپلی‌ساکارید به‌دلیل خاصیت مغناطیسی، جذب، بی‌حرکتی و فعالیت‌های بیوکاتالستی، قابلیت حلال‌بودن و

تهیه شدند. لاکتوباسیلوس پاراکازنی (MN₈₀₉₅₂₈) قبلاً طی مطالعه‌ای توسط آقای دکتر آقایی و همکاران از محصولات لبنی در استان قم جداسازی و شناسایی شد. آماده‌سازی سوپه: لاکتوباسیلوس پاراکازنی (MN₈₀₉₅₂₈) روی محیط MRS (De Man, Rogosa and Sharpe)^۲ آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. سپس پلیت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون جار بی‌هوای گرمخانه گذاری شد.

استخراج و خالص‌سازی اگزوپلی ساکارید از

لاکتوباسیل پاراکازنی (MN₈₀₉₅₂₈): برای تولید اگزوپلی ساکارید، ابتدا باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازنی (MN₈₀₉₅₂₈) در ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS برات (مرک، آلمان) تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (در شرایط جار بی‌هوای) گرمخانه گذاری شد. بعد از گرمخانه گذاری کشت برات به منظور غیرفعال کردن آنزیم‌های تجزیه‌کننده اگزوپلی ساکارید و آزاد کردن اگزوپلی ساکارید به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت سوسپانسیون میکروبی درون فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری خالی شد و فالكون‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار با ۶۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس با جمع‌آوری سوپرناتانت توده‌های سلولی باکتریایی دور ریخته شدند. پس از آن، به سوپرناتانت، اسید تری کلرو استیک با غلظت نهایی ۱۴ درصد برای رسوب کردن پروتئین اضافه شد. برای اینکه پروتئین‌ها به‌طور کامل رسوب داده شوند، درون انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. بعد از ۳۰ دقیقه سوپرناتانت از انکوباتور خارج شد و

واکنش‌پذیری سطح می‌تواند در کاربردهای مختلف صنعتی، زیست پزشکی و بیوتکنولوژیکی استفاده شوند (۷). با ظهور نانوتکنولوژی و با توجه به خاصیت ضد میکروبی طلا، از آنها در مبارزه با پاتوژن‌های مختلف نیز می‌توان بهره برد. نانوذرات طلا، ذراتی با تأثیرگذاری بالا و عمل سریع، غیرسمی و بی‌ضرر برای انسان‌اند. این ذرات با از بین بردن قارچ‌ها و باکتری‌ها بر خلاف سایر آنتی‌بیوتیک‌ها هیچ‌گونه مقاومتی در برابر باکتری‌ها ایجاد نمی‌کنند (۱۰)؛ بنابراین، هدف اصلی از انجام این تحقیق، سنتز نانوذرات طلا با استفاده از اگزوپلی ساکارید لاکتوباسیلوس پاراکازنی (MN₈₀₉₅₂₈) و بررسی اثر ضدباکتریال، ضدیوفیلمی و آنتی‌اکسیدانی آنها است. تاکنون تحقیق جامعی درباره تولید اگزوپلی ساکاریدهای سوپه‌های بومی باکتری‌های پروبیوتیک از جمله لاکتوباسیلوس پاراکازنی و نیز استفاده از آنها به‌عنوان پلیمرهای حد واسط برای سنتز نانوذرات فلزی طلا با پایداری بیشتر و دارای اثرات ضدباکتریایی و ضدیوفیلمی و آنتی‌اکسیدانی علیه عوامل باکتریایی بیماری‌زا در داخل کشور انجام نشده است.

مواد و روش‌ها

معرف‌ها و سوپه‌ها: هیدروژن تتراکلرو آنورات^۱، اتانول، تری کلرو اسید استیک، اسید استیک و کلیه مواد شیمیایی از شرکت سیگما - آلدریج (Sigma-Aldrich) خریداری شدند. میکروارگانیزم‌های پاتوژن از قبیل *اشریشیا کلی* (ATCC 25922)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853)، *اسیتوباکتر بومانی* (ATCC 17978) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) از کلکسیون میکروبی انستیتو پاستور

آنالیز FT-IR^۴ مدل FTIR-4200, Jasco, japan با محدوده طول موج $4200-600\text{cm}^{-1}$ برای تعیین ساختار نانوذرات طلا و همچنین بررسی گروه‌های عملکردی استفاده شد. برای این منظور نانوذرات خشک شده و پودر شده طلا برای تولید قرص با برمید پتاسیم مخلوط شدند. توزیع و پراکندگی نانوذرات طلا سنتز شده در محلول توسط آنالیز دستگاهی DLD^۵ بررسی شدند. اسپکتروفتومتری XRD^۶ مدل Ultima IV XRD, BRUKER flash و EDX^۷ مدل Rigaku, Japan به ترتیب برای بررسی ساختار نانوذرات و تأیید حضور نانوذرات طلا در محلول استفاده شد. با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (FE-SEM)^۸ مورفولوژی سطح و سایز نانوذرات طلا بررسی شدند (۱۷).

بررسی مهار رشد باکتری‌های پاتوژن: فعالیت ضدباکتریایی در مقابل باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت با استفاده از روش انتشار در چاهک بررسی شد (۱۸). باکتری‌های پاتوژن استاندارد *اشریشیا کلی* (ATCC 25922) *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853)، *اسیتوباکتریومانی* (ATCC 17978)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) در محیط نوترینت برات^۹ (مرک، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سپس از کشت تازه باکتری‌ها نیم مک فارلند (10^8CFU/mL) $1.5\times$ تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به صورت متراکم روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده و بعد از ایجاد چاهک (۶ میلی‌متر) در سطح محیط از نانوذرات طلا تهیه شده غلظت‌های مختلف ($25, 12/5, 6/25, 3/125\text{ }\mu\text{g/mL}$)، ۲۵، ۵۰ در چاهک‌ها ریخته شد. پلیت باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و

مجدد درون فالكون‌ها ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ و در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. به این صورت، سوپرناتانت حاوی اگزوپلی‌ساکارید، جمع‌آوری و رسوب پروتئینی دور ریخته شد. برای استخراج اگزوپلی‌ساکارید از روش ترسیب با اتانول سرد استفاده شد؛ به این صورت که ۲ برابر سوپرناتانت اتانول ۹۶ درصد سرد، اضافه و به مدت ۱ شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد. بعد از ۲۴ ساعت ارلن حاوی سوپرناتانت و اتانول به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. به این ترتیب، اگزوپلی‌ساکارید رسوب کرد و رسوب آن دوبار با آب مقطر شسته شد (۱۴ و ۱۵).

سنتز نانوذرات طلا با استفاده از اگزوپلی‌ساکارید:

سنتز نانوذرة طلا با استفاده از اگزوپلی‌ساکارید طبق روش کیم و همکارانش با تغییرات جزئی انجام شد. ۳۰ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد اگزوپلی‌ساکارید (۰/۱ گرم) در آب دیونیزه تهیه و سپس به حجم مساوی از محلول آبی HAuCl_4 ۱ میلی‌مولار اضافه شد. مخلوط اگزوپلی‌ساکارید و HAuCl_4 درون یک ارلن ریخته شد که کاملاً با آلومینیوم پوشانده شده بود. سپس ارلن به مدت ۴۸ ساعت روی استیر (۱۸۰ دور در دقیقه) در دمای اتاق قرار گرفت. در نهایت، برای جدا کردن ذرات نانو از باقی‌مانده اگزوپلی‌ساکارید، ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ انجام شد (۱۶).

بررسی ویژگی‌های نانوذرات طلا سنتز شده: برای

تأیید حضور نانوذرات طلا، جذب نوری محلول با اسپکتروفتومتر UV-Vis^{۱۰} مدل CARY-100, Varian, Australia از طیف ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر بررسی شد. از

سانتی گراد نگهداری شدند. میزان حداقل غلظت کشندگی براساس حداقل غلظتی از ماده ضد میکروبی تعیین می شود که از رشد باکتری در سطح پلیت جلوگیری می کند (۲۰).

بررسی فعالیت ضدبیوفیلمی نانوذرات طلا

سنتر شده: تعیین فعالیت ضدبیوفیلمی نانوذرات طلا در برابر باکتری های گرم منفی (*اشریشیا کلی*)، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اسینتوباکتر بومانی* و گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) با استفاده از روش میکرو تیر پلیت سنجیده شد. ابتدا یک کشت ۲۴ ساعته از میکروارگانیسم های مدنظر تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از میکروارگانیسم های مورد آزمایش با OD=0.1 (در طول موج ۶۰۰ نانومتر) و ۵۰ میکرولیتر از نانوذرات طلای سنتر شده با غلظت کمتر از حداقل غلظت بازدارنده به میکروپلیت ۹۶ خانه ای تلقیح شدند (یک چاهک به عنوان کنترل در نظر گرفته شد). سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. بعد از مدت زمان گرمخانه گذاری محلول رویی میکروپلیت دور ریخته و با سرم فیزیولوژی سه بار شست و شو داده شد. سپس میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه خشک شد. ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱ درصد به مدت ۲۰ دقیقه روی چاهک ها اضافه شد، بعد از ۲۰ دقیقه کریستال ویوله دور ریخته شد و با آب مقطر سه بار شستشو داده و رنگ اضافه خارج شد. برای تثبیت ساختار بیوفیلمی ۲۲۰ میکرولیتر اسید استیک به مدت ۱۵ دقیقه به چاهک ها اضافه شد. سپس جذب نوری هر چاهک با دستگاه الیزاریدر (Bio Tek, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر تعیین شد. درصد مهار تشکیل بیوفیلیم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۲۱).

هاله عدم رشد باکتری ها بعد از مدت زمان گرمخانه گذاری بررسی شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC):^{۱۰} تعیین

حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات طلا سنتر شده با استفاده از روش میکرو دیالوشن با پروتکل استاندارد انجام شد (۱۹). در این روش از میکروپلیت های ۹۶ خانه ای استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون برات (مرک، آلمان) درون ۹۶ چاهک میکروپلیت تلقیح شد، سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر نانوذرات طلا سنتر شده با غلظت های مختلف (۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰) اضافه شد و از چاهک دوم به سوم به همین ترتیب تا چاهک دهم نانوذرات تلقیح شده رقیق شد. در آخر به همه چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی رقیق شده معادل نیم مک فارلند اضافه گردید (یک چاهک به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد که شامل ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون برات و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی رقیق شده معادل نیم مک فارلند بود. یک چاهک به عنوان کنترل منفی که فقط حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون برات بود). سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد بعد از مدت زمان گرمخانه گذاری، غلظت آخرین چاهکی که هیچ کدورتی در آن مشاهده نشده معادل حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد.

حداقل غلظت کشندگی نانوذرات طلا سنتر شده

(MBC)^{۱۱}: برای تعیین حداقل غلظت کشندگی نانوذرات طلا، ۱۰ میکرولیتر از چاهک های فاقد کدورت به محیط مولر هینتون آگار تلقیح شد. سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه

تعیین ویژگی نانوذرات طلای سنتز شده: ستر

نانوذرات طلا با مشاهدات چشمی با تغییر رنگ محلول از بی‌رنگ به قرمز یا قوتی تأیید شد (شکل ۱، a). نتایج حاصل از آنالیز اسپکتروفتومتری با نور ماورای بنفش، یک پیک جذب قوی را در ۵۲۴ نانومتر نشان داد که سنتز نانوذرات طلا را تأیید می‌کند (شکل ۱، b). سپس نانوذرات طلای سنتز شده برای آنالیزهای بعدی خشک شدند (شکل ۱، c). آنالیز FT-IR برای شناسایی ارتباط احتمالی بین یون‌های طلا و آگروپلی ساکارید انجام شد؛ به طوری که آگروپلی ساکارید می‌تواند برای کاهش یون‌های طلا و پایداری نانوذرات طلا استفاده شود. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، پیک‌های جذبی 3433 cm^{-1} ، 2931 cm^{-1} ، 1689 cm^{-1} و 1535 cm^{-1} شناسایی شدند.

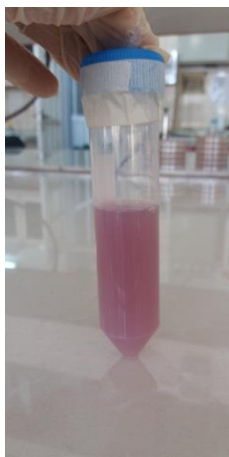
$$\text{درصد مهار بیوفیلم} = [1 - (\text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{control}})] \times 100$$

فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات طلا با استفاده از

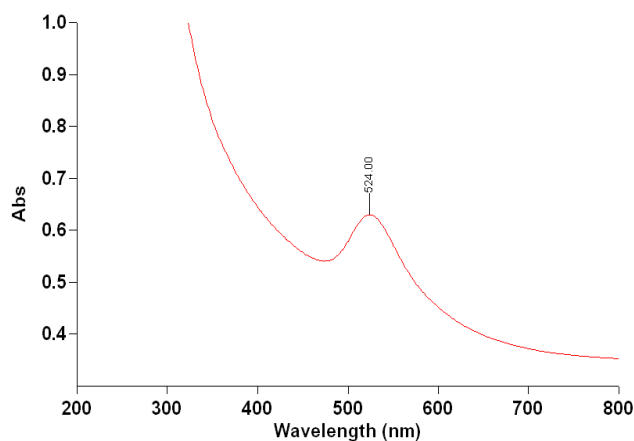
تست DPPH^۲: فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات طلای سنتز شده با روش پتانسیل مهار رادیکال آزاد DPPH بررسی شد (۲۲). به طور خلاصه یک محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH در متانول به عنوان استوک تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH ۰/۱ میلی‌مولار (در متانول) به غلظت‌های مختلف نانوذرات طلای (۵۰-۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) سنتز شده، اضافه و بعد از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در تاریکی و در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. اسید آسکوربیک به عنوان استاندارد استفاده شد. درصد فعالیت رادیکال آزاد از طریق فرمول زیر محاسبه شد.

$$100 \times \text{جذب کنترل} / (\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}) = \text{درصد جذب رادیکال}$$

نتایج



a

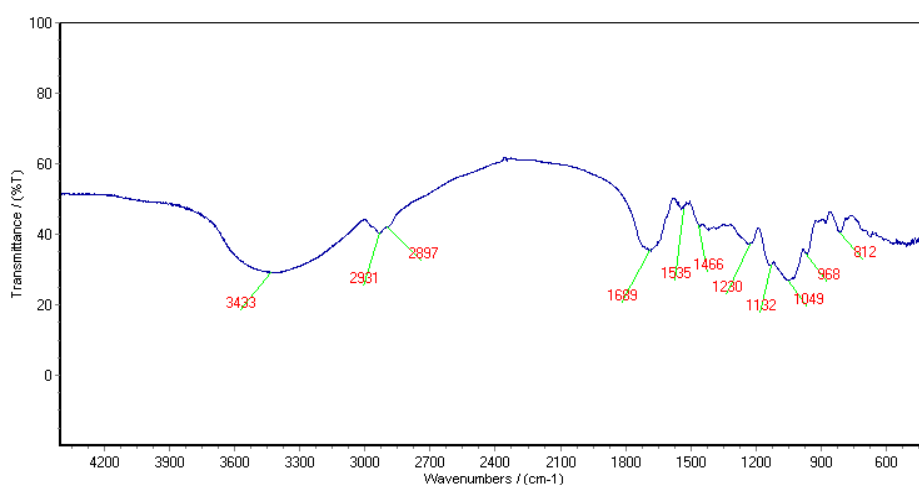


b



c

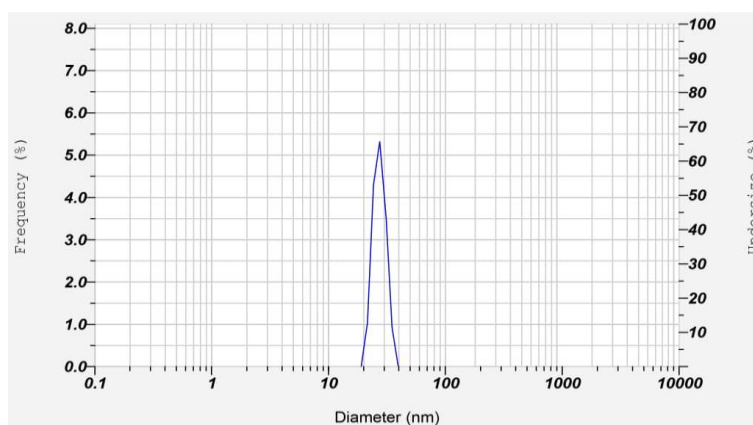
شکل ۱- نانوذرات طلای سنتز شده (a) طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی نانوذرات طلا (b)، نمونه خشک شده نانوذرات طلای سنتز شده (c)



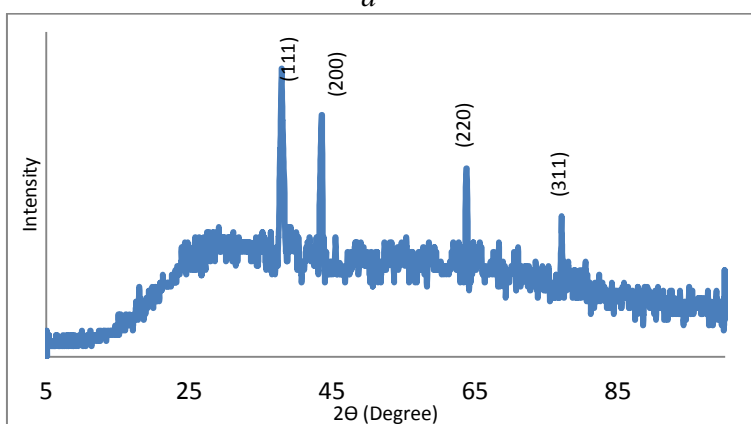
شکل ۲- طیف FTIR نانوذرات طلای سنتز شده با استفاده از آگزوپلی ساکارید لاکتوباسیلوس پاراکازنی

ساختاری نشان داد نانوذرات طلا دارای ساختار بلوری با شاخص‌های میلر ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰ و ۳۱۱ در شبکه مکعبی است. پیک ۱۱۱ در مقایسه با سایر پیک‌ها شدیدتر است؛ در نتیجه، صفحات بلوری نانوذرات طلا بیشتر در این جهت تشکیل شده‌اند. آنالیز EDX حضور عنصر طلا را در نانوذرات سنتز شده به روش زیستی نشان داد (شکل ۳، c).

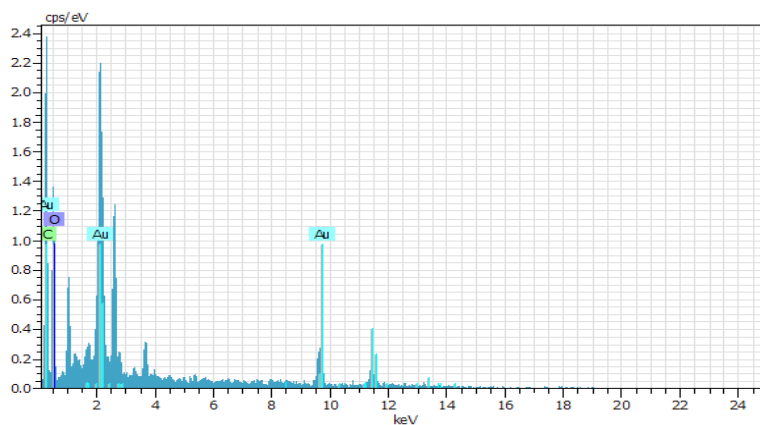
با استفاده از گراف پراکندگی نور دینامیکی نشان داده شد که نانوذرات طلای سنتز شده به طور متوسط سایزی حدود ۲۵/۸ داشتند (شکل ۳، a). الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) برای ماهیت کریستالی نانوذرات استفاده می‌شود. الگوی XRD نانوذرات طلا (شکل ۳، b) پیک‌های شارپی در نواحی ۳۷/۹، ۴۳/۶، ۶۳/۶ و ۷۷/۱ نشان داد که سنتر نانوذرات طلا را تأیید می‌کند. آنالیز



a



b



c

شکل ۳- گراف پراکندگی نور دینامیکی (a)، پراش پرتو ایکس نانوذرات طلای سنتز شده (b)، طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس نانوذرات طلای سنتز شده با استفاده از آگزوپلی ساکارید (c)

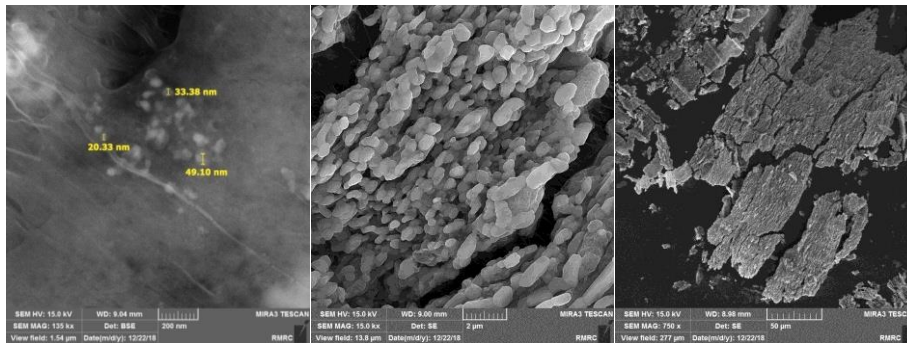
به شکل کروی و به طور متوسط سایزی حدود ۲۰ تا ۵۰ نانومتر دارند.

نتایج مهار رشد باکتری‌های پاتوژن با استفاده از نانوذرات طلا: نتایج بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوذرات طلا نشان داد نانوذرات طلای سنتز شده اثر

علاوه بر پیک‌های جذبی قوی عناصر طلا، سیگنال‌های ضعیفی از اتم‌های کربن و اکسیژن در مقایسه با عناصر طلا گزارش شدند. نتایج به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی (FE-SEM) در شکل ۴ نشان دادند نانوذرات طلای سنتز شده توسط آگزوپلی ساکارید

بازدارندگی را علیه باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری گرم مثبت دارد. در میان باکتری‌های گرم منفی *اسیتوباکتر بومانی* (قطر هاله ۲۰ میلی متر) و *سودوموناس آئروژینوزا* (قطر هاله ۱۷ میلی متر) بیشترین مهار رشد را داشته‌اند. نتایج حاصل از مهار رشد باکتری‌های پاتوژن در شکل ۵ نشان داده شدند.

مهارکنندگی قابل قبولی بر همه باکتری‌های مدنظر دارد؛ به طوری که با افزایش غلظت نانوذرات، این اثر مهارکنندگی، بیشتر و قطر هاله عدم رشد نیز بیشتر می‌شود. نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات طلای سنتز شده در جدول ۱ نشان داده شدند. نتایج نشان می‌دهند نانوذرات طلای سنتز شده بیشترین اثر



شکل ۴- تصویر میکروسکوپ الکترونی FE-SEM نانوذرات طلای سنتز شده

جدول ۱- نتایج بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوذرات طلای سنتز شده در مقایسه با آنتی‌بیوتیک سفکسیم / سفتریاکسون و نانوذرات طلای سنتز شده به روش شیمیایی

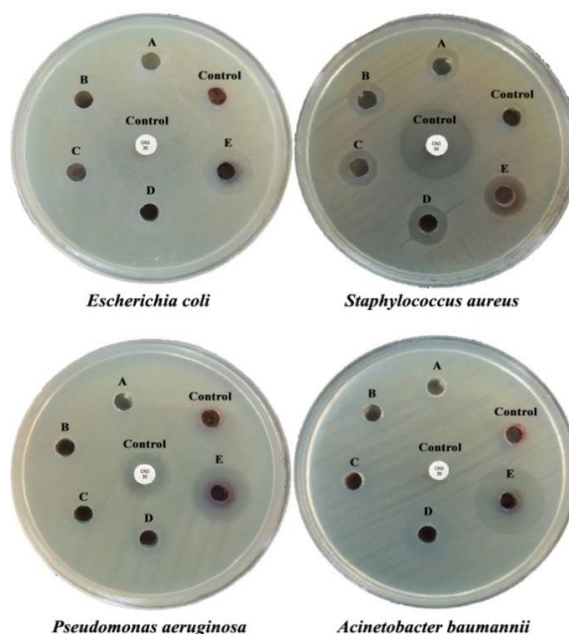
کنترل	غلظت نانوذرات طلای سنتز شده به روش شیمیایی	غلظت‌های نانوذرات طلای سنتز شده (میکروگرم در میلی لیتر)					باکتری‌های تست
		۵۰ μg. mL	۲۵ μg. mL	۱۲/۵ μg. mL	۶/۲۵ μg. mL	۳/۱۲۵ μg. mL	
سفکسیم / سفتریاکسون ۳۰ μg. mL	۵۰ μg. mL	۵۰ μg. mL	۲۵ μg. mL	۱۲/۵ μg. mL	۶/۲۵ μg. mL	۳/۱۲۵ μg. mL	
مقاوم	-	۲۰	۱۳	۱۰	-	-	<i>اسیتوباکتر بومانی</i> (ATCC 17978)
۱۳	-	۱۷	۱۱	-	-	-	<i>سودوموناس آئروژینوزا</i> (ATCC 27853)
۲۵	-	۱۵	۱۳	۱۲	۱۱	۱۰	<i>اشریشیا کلی</i> (ATCC 25922)
۲۳	-	۱۴	۱۳	۱۲	۱۱	۱۰	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> (ATCC 25923)

سودوموناس آئروژینوزا و اسیتوباکتر بومانی به مدت ۲۴ ساعت با غلظت کمتر از حداقل غلظت بازدارنده نانوذرات طلای سنتز شده به ترتیب باعث کاهش تشکیل بیوفیلم ۴۶ درصد، ۶۵ درصد و ۷۸ درصد شد. بیوفیلم باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس ۵۶ درصد مهار شد. نتایج حاصل از مهار بیوفیلم باکتری‌های پاتوژن در شکل ۶ گزارش شده‌اند.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: در این مطالعه، فعالیت جذب رادیکال‌های DPPH نانوذرات طلای سنتز شده با آگزوپلی‌ساکارید بررسی شد. نتایج نشان دادند حذف رادیکال‌های DPPH با افزایش غلظت نانوذرات طلا افزایش یافت؛ بنابراین، یک فعالیت وابسته به غلظت است. درصد فعالیت مهار رادیکال آزاد در شکل ۷ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود نانوذرات طلا در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حداکثر درصد مهار (۸۱ درصد) را در مقایسه با نمونه استاندارد (اسید آسکوربیک ۹۸ درصد) نشان می‌دهند.

جدول ۲- MIC و MBC نانوذرات طلای سنتز شده توسط آگزوپلی‌ساکارید لاکتوباسیلوس پاراکازنی (MN₈₀₉₅₂₈) برای باکتری‌های تست

MBC	MIC	باکتری‌های تست
۶/۲۵	۳/۱۲۵	اسیتوباکتر بومانی (ATCC 17978)
۶/۲۵	۶/۲۵	سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)
۱۲/۵	۱۲/۵	اشریشیا کلی (ATCC 25922)
۲۵	۲۵	استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923)

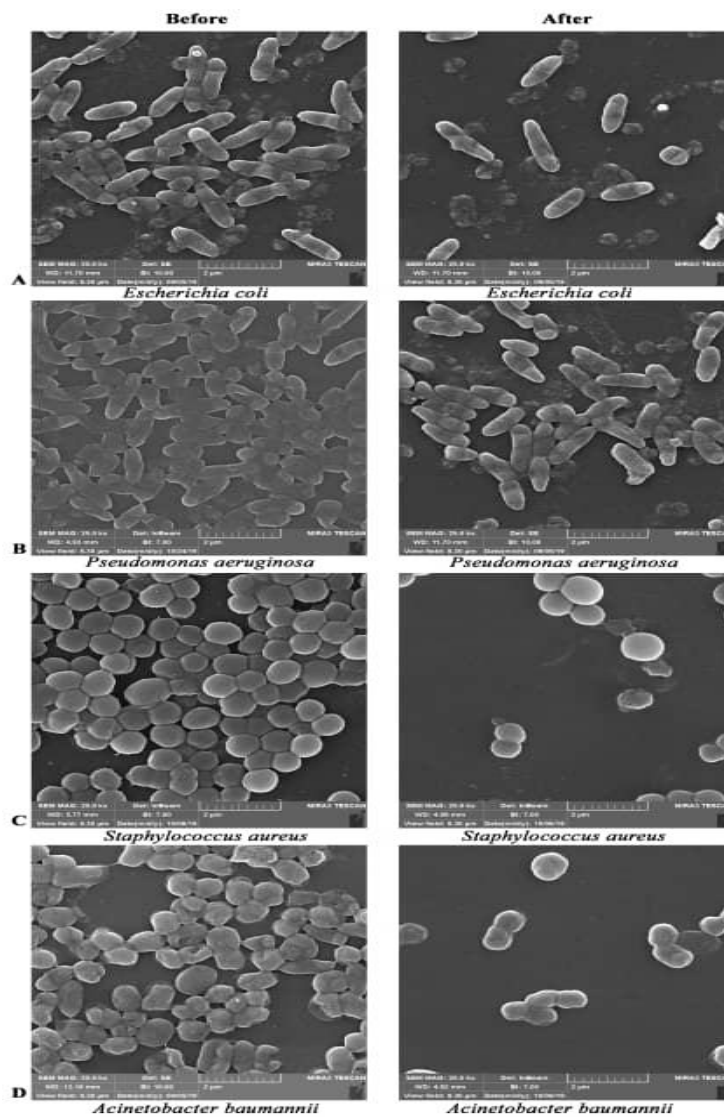


شکل ۵- فعالیت آنتی‌باکتریال نانوذرات طلای سنتز شده با غلظت‌های مختلف (۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کنترل (نانوذرات طلای سنتز شده به روش شیمیایی، آنتی‌بوتیک سفکسیم / سفتریاکسون)

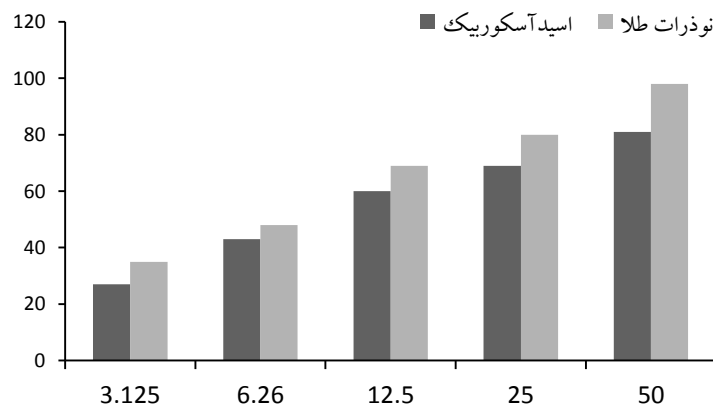
نتایج بررسی MIC و MBC نانوذرات سنتز شده روی

سویه‌های گرم منفی و گرم مثبت: نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانوذرات طلای سنتز شده علیه باکتری‌های منتخب در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. بیشترین حساسیت بین باکتری‌های مورد آزمایش را باکتری اسیتوباکتر بومانی (MIC ۳/۱۲۵) و کمترین حساسیت به نانوذرات طلای سنتز شده را باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (MIC ۲۵) دارد.

بررسی مهار بیوفیلم باکتری‌های پاتوژن با استفاده از نانوذرات سنتز شده: در تحقیق انجام شده بیوفیلم همه باکتری‌های پاتوژن توسط نانوذرات طلای سنتز شده مهار شد. تیمار باکتری‌های گرم منفی اشریشیا کلی،



شکل ۶- عکس SEM پاتوزن های مختلف اشریشیا کلی (A)، سودوموناس آئرورژینوزا (B)، استافیلوکوکوس اورئوس (C)، اسیتوباکتر بومانی (D) قبل و بعد از تیمار شدن با نانوذرات طلای سنتز شده توسط EPS



شکل ۷- فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات طلای سنتز شده توسط آگزوپلی ساکارید

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه توجه زیادی به نانوذرات ضدباکتریایی به‌عنوان وسیله‌ای برای غلبه بر مشکلات مقاومت دارویی در میکروارگانیسم‌های مختلف بیماری‌زا وجود دارد. در میان نانوذرات فلزی، نانوذرات طلا به‌دلیل شکل و اندازه خود، خصوصیات منحصر به فردی دارند؛ به همین علت در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی از جمله پزشکی، تکنولوژی و بیوشیمی کاربرد دارند (۲۳). آگزوپلی‌ساکارید پروبیوتیک‌ها نقش مهمی در چسبندگی به سلول و اتصال به اپی‌تلیال دارند (۲۴)؛ به همین دلیل می‌توانند اتصال باکتری‌های بیماری‌زا را به حداقل برسانند و به بهبود سیستم ایمنی کمک کنند. به‌طور کلی، کربوهیدرات‌ها به اندازه کافی قوی‌اند که کلرید طلا را کاهش دهند و به‌عنوان یک عامل پایدارکننده عمل کنند و در نهایت، تعامل سطح به سطح نانوذرات طلا را کاهش دهند. حضور چندین گروه کربوکسیل و انتهای کاهش‌دهنده همی‌استیل در بیوپلی‌مرها منجر به پایداری نانوذرات سنتز شده می‌شود (۲۵ و ۲۶)؛ بنابراین، در این تحقیق از اثرات سودمند آگزوپلی‌ساکارید سنتز شده توسط لاکتوباسیلوس پاراکازئی برای سنتز نانوذرات طلا استفاده شد. تحلیل نمونه‌ها با اسپکتوفتومتری نور ماورای بنفش، یک پیک جذب‌ی مشخص را در طول موج ۵۲۴ نانومتر نشان داد؛ ظهور رزونانس پلاسمون سطحی در این منطقه بیان‌کننده وجود نانوذرات طلا است (۲۷ و ۲۸). در تحقیق انجام شده، نانوذرات سنتز شده سبب تغییر رنگ محلول از بی‌رنگ به قرمز ارغوانی شد و باند رزونانس پلاسمون سطحی قوی در ۵۲۴ نانومتر نشان داد که وجود نانوذرات طلا را تأیید می‌کند. رنگ محلول نانوذرات طلای سنتز شده به‌دلیل نوسانات جمعی

الکترون‌های آزاد القاشده به‌وسیله تعامل با میدان الکترومغناطیسی است که برای هر نوع ذره با هر اندازه‌ای مخصوص به خود آن ذره است (۲۹). در مطالعه نارایانان^۳ و همکاران (۲۰۱۰)، نانوذرات طلای سنتز شده طیف جذبی را در ناحیه ۵۳۶ نانومتر نشان دادند (۳۰). آنالیز طیف‌سنجی *FT-IR* برای شناسایی گروه‌های فعال و احیاکننده یون‌های طلا انجام شد. در این مطالعه با استفاده از آنالیز *FTIR* پیک‌های جذبی 3433 cm^{-1} ارتعاشات کششی کربوکسیل در الکل‌ها و ترکیبات فلی را نشان می‌دهند که قدرت قوی برای توانایی تعامل با نانوذرات دارند (۳۱). باند جذبی 2931 cm^{-1} ارتعاشات کششی *C-H* (غیرمقارن) را نشان می‌دهد که مربوط به قله‌های کششی گروه آلکان‌ها است و باند جذبی 2897 cm^{-1} ارتعاشات کششی *C-H* (مقارن) را نشان می‌دهد که مربوط به گروه CH_3 است (۳۲). طیف‌های جذبی 1689 cm^{-1} و 1535 cm^{-1} به ترتیب مربوط به باندهای آمیدی و باندهای خموشی از گروه *C-O-C* هستند (۳۳). در مطالعه ساتیانارایانان^۴ و همکاران (۲۰۱۴)، باندهای جذبی 3432 cm^{-1} ، 2919 cm^{-1} ، 2846 و 1578 توسط اسپکتوفتومتری *FTIR* شناسایی شدند (۳۴). *DLS* یک تکنیک ارزشمند است که سایز ذرات و توزیع ذرات در محلول را بررسی می‌کند (۳۵). در مطالعه حاضر، الگوی *DLS* نشان داد سایز نانوذرات طلای سنتز شده ۲۵/۸ نانومتر بود که نشان می‌دهد آگزوپلی‌ساکارید سنتز شده توانایی سنتز نانوذرات طلا با اندازه متوسط را دارد. اسپکتوفتومتری *XRD* یک ابزار اصلی و اولیه برای تعیین خصوصیات بلوری مانند اندازه کریستال نانوذرات طلا است (۳۶). الگوی *XRD* پیک‌های مشخصی از کریستال‌های طلا را نشان می‌دهد که سنتز نانوذرات طلا را تأیید می‌کند (۳۷). طبق نتایج

نانوذرات طلا را با استفاده از روش‌های ترانسکترومیک و پروتئومیک بررسی کردند. آنها دریافتند نانوذرات طلا فعالیت‌های ضدباکتریایی را با جلوگیری از ترکیب زیرواحد کوچک (۳۰S) ریبوزومی با *tRNA* و فروپاشی پتانسیل غشایی انجام می‌دهند (۴۴).

در تحقیقی آروگوئتا^{۱۶} و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند نانوذرات طلا دارای خواص ضد میکروبی اند (۴۵). موتوکومار^{۱۷} و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند نانوذرات طلا فعالیت ضدباکتریایی بیشتری در برابر باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت دارند (۴۶). در مطالعه‌ای مشابه توسط ساتیاناریانان و همکاران (۲۰۱۴)، نانوذرات طلا با استفاده از اگزوپلی ساکارید سنتز شدند و فعالیت ضدباکتریایی آنها در برابر *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلسیلا پنومونیه*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بررسی شد (۳۴). مهار بیوفیلم توسط نانوذرات طلا با استفاده از روش میکروتیتر پلیت انجام شد. با توجه به اینکه نانوذرات طلا اندازه کوچکی دارند، به راحتی می‌توانند وارد ماتریکس بیوفیلم شوند. بیشتر مطالعات نشان می‌دهند نانوذرات طلا می‌توانند باعث مهار بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* شوند (۴۷). بررسی‌ها نشان دادند نانوذرات طلا باعث کاهش چشمگیر در شکل‌گیری بیوفیلم توسط *سودوموناس آئروژینوزا* می‌شوند. این موضوع ممکن است به دلیل سمیت نانوذرات طلا برای سلول باکتریایی باشد (۴۸). آنتی‌اکسیدان‌ها ماکرومولکول‌هایی اند که رادیکال آزاد گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر از قبیل یون‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، یون‌های هیدرواکسید آزاد و اکسیژن منفرد را از بین می‌برند که با انتقال یک الکترون تولید می‌شوند و به این ترتیب از

به‌دست آمده، سنتز نانوذرات طلا با استفاده از اگزوپلی ساکارید لاکتوباسیلوس پاراکازئی تأیید می‌شود و با سایر تحقیقات درباره سنتز نانوذرات طلا مشابه است (۳۸). حضور عنصر طلا در محلول نانوذرات سنتز شده با استفاده از *EDX* تأیید شد. گراف *EDX*، پیک‌های قوی اطراف 2 KeV و 10 KeV نشان داد که حضور نانوذرات طلا را تأیید می‌کند (۳۹). ساختار و شکل نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی *FE-SEM* تعیین شد (۴۰). در مطالعه حاضر اندازه نانوذرات طلای سنتز شده کروی، ۵۰-۲۰ نانومتر بود. در تحقیقی مشابه، از کیتوزان برای سنتز نانوذرات طلا استفاده کردند که نتایج نشان دادند نانوذرات طلای سنتز شده اندازه ۱۰ تا ۵۰ نانومتر دارند (۴۱). مطالعات نشان داده‌اند به تازگی از نانوذرات طلا به‌عنوان یک ترکیب ضدباکتریایی قوی استفاده می‌شود و همچنین بررسی‌ها نشان دادند نانوذرات طلا نقش مهمی در حذف باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک دارند (۴۲). مطالعه حاضر نشان داد نانوذرات طلای سنتز شده با استفاده از اگزوپلی ساکارید باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی با روش انتشار در چاهک روی ۴ باکتری مؤثرند و فعالیت ضد میکروبی بیشتری روی باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان می‌دهند. فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات طلا در برابر باکتری‌های گرم منفی مربوط به دیواره سلولی نازک آنهاست که آنها را نسبت به عملکرد نانوذرات طلا حساس‌تر کرده است. مکانیسم دیگر فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات طلا به دلیل تولید گونه‌های واکنش‌دهنده اکسیژن در داخل سلول‌های باکتریایی است که باعث افزایش استرس اکسیداتیو سلول‌های میکروبی می‌شود (۴۳). وانگ^{۱۵} و همکاران در سال ۲۰۱۹، مکانیسم ضدباکتریایی

- bacteria. *Nanomedicine*. 2010; 6 (1): 103-109.
- (4) Abdel- Mohsen AM, Hrdina R, Burgert L, Abdel – Rahman RM, Hasova M, Smejkalova D, et al. Antibacterial activity and cell viability of hyaluronan fiber with silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 2013; 92 (2): 1177-1187.
- (5) Ghabooli A, Mirzaei S. Biosynthesis of Silver Nanoparticles using *Aspergillus Flavus* and Investigation of some Effective Factors in its production. *Biological Journal of Microorganism*. 2018; 7 (27): 81-94.
- (6) Kumar KM, Mandal B, Sinha M, Varadhan K. Terminalia chebula mediated green and rapid synthesis of gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2012; 86: 490-494.
- (7) Jeyarani S, Vinita NM, Puja P, Senthamilselvi S, Devan U, Velangani AJ, et al. Biomimetic gold nanoparticles for its cytotoxicity and biocompatibility evidenced by fluorescence-cancerous (HEK-293) cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2020; 202: 111715.
- (8) Badeggi UM, Ismail E, Adeloye AO, Botha S, Badmus JA, Marnewik JL, et al. Green synthesis of gold nanoparticles capped with procyanidins from *Leucosidea sericea* as potential antidiabetic and antioxidant agents. *Biomolecules*. 2020; 10: 452.
- (9) Kumar AS, Mody K, Jha B. Bacterial exopolysaccharides, a perception. *Journal of Basic Microbiology*. 2007; 47 (2): 103-117.
- (10) Hwang IS, Hwang JH, Choi H, Kim KJ, Lee DG. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *Journal of Medical Microbiology*. 2012; 61 (12): 1719-1726.
- (11) Madiedo P, Gavilan CG. Methods for the screening. Isolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy science*. 2005; 88 (3): 843-856.

اکسیدشدن ماکرومولکول‌های زیستی جلوگیری می‌کنند (۴۸). فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات طلائی سنتز شده با استفاده از روش سنجش رادیکال آزاد DPPH انجام شد. نتایج نشان دادند نانوذرات طلائی سنتز شده با انتقال یک الکترون یا هیدروژن به رادیکال آزاد، آن را تبدیل به DPPH-H پایدار می‌کنند که با نتایج سایر مطالعات مشابه است (۴۹). کیم^{۱۸} و همکاران در سال ۲۰۰۷ فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات طلائی سنتز شده را بررسی کردند و نتیجه گرفتند نانوذرات طلائی سنتز شده فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها با افزایش غلظت نانوذرات افزایش می‌یابد (۱۶). آگروپلی ساکارید تولید شده توسط لاکتوباسیلوس پاراکازئی (*MN₈₀₉₅₂₈*) به عنوان منبع بسیار مناسبی برای سنتز و تولید زیستی نانوذرات طلا با اثرات ضد میکروبی، ضدیوفیلی و آنتی‌اکسیدانی است؛ از این رو، مطالعات بیشتر در خصوص بهینه‌سازی شرایط تولید آگروپلی ساکاریدهای سویه‌های بومی باکتری‌های لاکتیک‌اسید می‌توانند کاربرد مهم و گسترده‌ای در تولید انواع نانوذرات فلزی با کاربردهای زیست فناوری دارویی باشند.

References

- (1) Sanguansri P, Augustin MA. Nanoscale materials development-food Industry perspective. *Trends in Food Science and Technology*. 2006; 17 (10): 547-556.
- (2) Liu WT. Nanoparticles and their biological and environmental applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006; 102 (1): 1-7.
- (3) Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against Gram-positive and Gram-negative

- (12) Liu W, Bao Q, Qing M, Chen X, Sun T, Li M, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. *Microbiological Research*. 2012; 167 (2): 110-115.
- (13) Kavitha P, Sindhuja D, Banumathi M. Isolation and Characterization of Lactobacillus species Isolated from Dahi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2016; 5 (4): 1042-1049.
- (14) Bachtarzi N, Kharroub K, Ruas-Madiedo P. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolated from traditional Algerian dairy products and their application for skim-milk fermentations. *LWT*. 2019; 107: 117-124.
- (15) Kanmani P, Kumar RS, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Arul V. Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresource Technology*. 2011; 102 (7): 4827-4860.
- (16) Kim D, Park S, Lee JH, Jeong YY, Jon S. Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging. *Journal of the American Chemical Society*. 2007; 129(24): 7661-7665.
- (17) Binupriya AR, Sathishkumar M, Yun SI. Biocrystallization of silver and gold ions by inactive cell filtrate of *Rhizopus stolonifer*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010; 79 (2): 531-535.
- (18) Mahendran S, Saravanan, Pandian V, Kasirajan A. Antibacterial potential of microbial exopolysaccharide from *Ganoder malucidum* and lysine *Bacillus fusiformis*. *International Journal of Recent Scientific Research*. 2013; 4 (5): 501-505.
- (19) Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001; 48 (1): 5-16.
- (20) Rigi M. Antimicrobial activities of gold nanoparticles against *E. coli*. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. 2016; 4 (1): 100-103.
- (21) Wei GX, Campagna AN, Bobek LA. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacterial and on *Streptococcus mutans* biofilm. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2006; 57 (6): 1100-1109.
- (22) Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 1995; 28 (1): 25-30.
- (23) Fan J, Cheng Y, Sun M. Function Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Biomedical Application. *The Chemical Record*. 2020; 20 (12): 1447-1504.
- (24) Deepika G, Green RJ, Frazier RA, Charalampopoulos D. Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal Applied Microbiology*. 2009; 107 (4): 1230-1240.
- (25) Huang H, Yang X. Synthesis of Polysaccharide-Stabilized Gold and Silver Nanoparticles: A Green Method. *Carbohydrate Research*. 2004; 339: 2627-2631.
- (26) Sathiyarayanan G, Kiran GS, Selvin J, Saibaba G. Optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus megaterium* MSBNO4 under solid state culture. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013; 60: 253-261.
- (27) Moreno-Trejo MB, Sánchez-Domínguez M. Mesquite gum as a novel reducing and stabilizing agent for modified Tollens synthesis of highly concentrated Ag nanoparticles. *Materials*. 2016; 9 (10): 817.
- (28) Majzika A, Fülöp L, Csapó E, Bogár F, Martinek T, et al. Functionalization of gold nanoparticles with amino acid, amyloid peptides and fragment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010; 81 (1): 235-241.

- (29) Philip D, Unni C. Extracellular biosynthesis of gold and silver nanoparticles using Krishna tulsi (*Ocimum sanctum*) leaf. *Physica E: Low – dimensional System and Nanostructures*. 2011; 43 (7): 1318-1322.
- (30) Narayanan KB, Sakthivel N. Phytosynthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *coleus amboinicus* lur. *Materials Characterization*. 2010; 61 (11): 1232-1238.
- (31) Talat M, Singh AK, Srivastava O. Optimization of process variables by central composite design for the immobilization of urease enzyme on functionalized gold nanoparticles for various applications. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2011; 34 (6): 647-657.
- (32) Lin Z, Zhang H. Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2004; 25 (11): 1387-1395.
- (33) Li S, Shen Y, Xie A, Yu X, Qiu L, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *capsicum annum* L. extract. *Green Chemistry*. 2007; 9 (8): 852-858.
- (34) Sathiyarayanan G, Vignesh V, Saibaba G, Vinothkanna A, Dineshkumar K, et al. Synthesis of carbohydrate polymer encrusted gold nanoparticles using bacterial exopolysaccharide: A novel and greener approach. *RSC Advances*. 2014; 4 (43): 22817-22827.
- (35) Sanyasi S, Majhi R, Kumar S, Mishra M, Ghosh A, Suar M, et al. Polysaccharide-capped silver Nanoparticles inhibit biofilm formation and eliminate multi-drug-resistant bacteria by disrupting bacterial cytoskeleton with reduced cytotoxicity towards mammalian cells. *Scientific Reports*. 2016; 6: 24929.
- (36) Khorsand Zak A, Abd Majid WH, Abrishami ME, Yousefi R. X-ray analysis of ZnO nanoparticles by Williamson-Hall and size-strain plot methods. *Solid State Sciences*. 2011; 13(1): 251-256.
- (37) Leff DV, Brandt L, Heath JR. Synthesis and characterization of hydrophobic, organicallysoluble gold nanocrystals functionalized with primary amines. *Langmuir*. 1996; 12 (20): 4723-4730.
- (38) Bindhu M, Umadevi M. Antibacterial activities of green synthesized gold nanoparticles. *Materials Letters*. 2014; 120: 122-125.
- (39) Chandran SP, Chaudhary M, Pasricha R, Ahmad A, Sastry M. Synthesis of Gold Nano Triangles and Silver Nanoparticles Using Aloe Vera Plant Extract. *Biotechnology Progress*. 2006; 22 (2): 577-583.
- (40) Wang ZL. Transmission Electron Microscopy of Shape-Controlled Nanocrystals and Their Assemblies. *The Journal of Physical Chemistry*. 2000; 104 (6): 1153-1175.
- (41) Sun C, Qu R, Chen H, Ji C, Wang C, Sun Y, et al. Degradation behavior of chitosan chains in the 'green' synthesis of gold nanoparticles. *Carbohydrate Research*. 2008; 343 (15): 2595-2599.
- (42) Grace AN, Pandian K. Quinolone Antibiotic-Capped Gold Nanoparticles and Their Antibacterial Efficacy against Gram Positive And Gram Negative Organisms. *Journal of Bionanoscience*. 2007; 1 (2): 96-105.
- (43) Zada S, Ahmad A, Khan S, Iqbal A, AhmadS, Ali H, et al. Biofabrication of gold nanoparticles by *Lyptolyngbya* JSC-1 extract as super reducing and stabilizing agents: Synthesis, Characterization and antibacterial activity. *Microbial Pathogenesis*. 2018; 114: 116-123.
- (44) Wang Z, Huang X, Jin S, Wang H, Yuan L, Brash JL. Rapid antibacterial effect of sunlight-exposed silicon nanowire arrays modified with Au/Ag alloy nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*. 2019; 7 (40): 6202-6209.
- (45) Aruguete DM, Hochella MF. Bacteria-nanoparticle interactions and their

environmental implications. *Environmental Chemistry*. 2010; 7 (1): 3-9.

- (46) Muthukumar T, Sudhakumari , Sambandam B, Aravinthan A, Sastry TP, Kim JH. Green synthesis of gold nanoparticles and their enhanced synergistic antitumor activity using HepG2 and MCF7 cells and its antibacterial effects. *Process Biochemistry*. 2016; 51 (3): 384 - 391.
- (47) Aswathanarayan JB, Vittal RR. Antimicrobial, biofilm inhibitory and anti-infective activity of metallic nanoparticles against pathogens MRSA and *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Pharmaceutical Nanotechnology*. 2017; 5 (2): 148-153.
- (48) Rajput N, Bankar A. Bio-inspired gold nanoparticles synthesis and their anti-biofilm efficacy. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2017; 47 (6): 521-530.
- (49) Sirajunnisa AR, Surendhiran D. Nanosilver Fabrication Mediated by Exopolysaccharides from *Pseudomonas fluorescens* and Its Biological Activities. *American Journal of Pharmtech Reserch*. 2014; 4 (1): 2249-3387.

¹- H₂AuCl₄

²- DeMan, Rogosa, and Sharpe

³- Ultraviolet-Visible Spectroscopy

⁴- Fourier – Transform Infrared Spectroscopy

⁵- Dynamic light scattering

⁶- X-ray diffraction

⁷- Energy Dispersive X-ray

⁸- Field Emission Scanning ElectronMicroscopy

⁹- Nutrient Broth

¹⁰- Determination of minimum inhibitory concentration

¹¹- Determination of minimal bactericidal concentration

¹²- 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

¹³- Narayanan

¹⁴- Sathiyarayanan

¹⁵- Wang

¹⁶- Arugueta

¹⁷- Muthukumar

¹⁸- Kim