

تولید بیونانو ذرات طلا در سطح باکتری فلز دوست *Cupriavidus necator*

بهارک حسین خانی*، گیتی امتیازی^۲

خلاصه

مقدمه: نانوذرات طلا کاربردهای فراوانی در علوم پزشکی، دارورسانی هدفمند، تشخیص و درمان هدفمند سرطان و ... دارد. به تازگی روش های زیستی به عنوان روش های دوست دار طبیعت مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. روش: با توجه به اهمیت جایگزینی روش های زیستی، در این تحقیق برای اولین بار تولید بیونانو ذرات طلا توسط باکتری فلز دوست *Cupriavidus necator* مورد مطالعه قرار گرفت. نانومتری بودن و ویژگی های این ذرات با روش های اسپکتروفتومتر UV-Vis، میکروسکوپ الکترونی عبوری، طیف سنج پراش انرژی و نرم افزار ImageJ بررسی شد.

یافته ها: در این مطالعه موفق به سنتز بیوذرات نانومتری در سطح باکتری فلز دوست *C. necator* با پایداری بالا شدیم. بیشترین یکنواختی در شکل و اندازه نانوذرات در حضور ۱/۵۵ میلی گرم بر میلی لیتر بیوماس، ۱ میلی مولار هیدروژن تتراکلروآورات و ۲۵ میلی مولار فرمات مشاهده شد.

نتیجه گیری: تولید ذرات طلا در مقیاس نانو توسط باکتری *C. necator* امکان پذیر است. نانوذرات حاصل از پایداری خوبی برخوردار بود.

واژه های کلیدی: بیونانو ذرات، طلا، باکتری، پزشکی

۱- دانشجوی دکتری، بخش میکروب شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان ۲- استاد، بخش میکروب شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

* نویسنده مسؤول، آدرس: بخش میکروب شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان • آدرس پست الکترونیک: bahar_hosseinkhani@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۰/۱۲ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۰/۵/۱ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۵/۲۳

مقدمه

به ذرات جامد کلوئیدی، که اندازه‌ای در محدوده ۱۰۰-۱ نانومتر دارند، نانوذره اطلاق می‌شود (۱). خواص ذرات بستگی به اندازه ذرات دارد. در اندازه‌های نانومتری، ذرات خواص الکترونیکی، مغناطیسی، نوری و کاتالیستی منحصر به فرد به خود می‌گیرند و نسبت سطح به حجم نیز افزایش می‌یابد (۲، ۳).

از مهم‌ترین نانوذرات می‌توان به نانوذرات فلزی اشاره نمود و از پرکاربردترین نانوذرات می‌توان نانوذرات طلا را نام برد. نانوذرات طلا دارای خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و نوری شگفت‌آوری می‌باشد که سبب کاربردهای متعدد این نانوذرات در علوم زیستی، بیوسنسورها، پزشکی، کاتالیست‌ها و الکترونیک شده است. نانوذرات طلا توانایی بالایی در جذب و پراکنده کردن نور و همچنین سازگاری بالایی با بدن موجودات زنده دارند. این ویژگی‌های نانوذرات طلا دانشمندان علوم نانو مواد را در صدد برآورده است که از این ذرات برای تشخیص سریع و آسان سلول سرطانی، دارورسانی هدفمند و گرما درمانی استفاده کنند (۴-۶).

در دهه‌های اخیر تلاش‌های زیادی در زمینه ساخت نانوذرات طلا صورت پذیرفته است (۴). به طور کلی دو روش عمده برای ساخت نانوذرات طلا وجود دارد: ساخت نانوذرات به روش فیزیکوشیمیایی و ساخت نانوذرات به روش‌های زیستی. روش‌های فیزیکوشیمیایی شامل روش چگالش بخار، احیای شیمیایی، فرآیندهای الکتروشیمیایی، استفاده از سیالات فوق بحرانی و استفاده از امواج مافوق صوت است. این روش‌ها دارای معایبی نظیر میزان بالای آلودگی، هزینه‌های گزاف، غیر یکنواختی در اندازه ذرات، ناپایداری نانوذرات، عدم کنترل رشد نانو کریستال‌ها و تجمع نانوذرات حین ساخت می‌باشد (۴).

در روش زیستی تولید نانوذرات با استفاده از موجودات زنده تک‌سلولی و پرسلولی صورت می‌گیرد (۷). در میان

روش‌های مختلف موجود در بیوسنتز نانوذرات، استفاده از باکتری‌ها توجه بیشتری را به خود جلب است. باکتری‌ها همواره در معرض محیط‌های پر از استرس، نظیر حضور غلظت بالای فلزات سنگین، قرار دارند و توانایی مقاومت به این استرس‌ها در بقای آن‌ها ضروری است. در پژوهش‌های اخیر مشخص شده است که میکروارگانیزم‌ها علاوه بر این که توسط مکانیسم‌هایی در برابر فلزات مقاومت می‌کنند، قادر هستند ذرات فلزی را به مقیاس نانو تبدیل نمایند؛ ساخت نانوذرات مغناطیسی توسط مگنتیک باکتری‌ها و ساخت نانوذرات طلا توسط باکتری *Bacillus subtilis 168 Shewanella algae* (سویه‌های *Thermomonospora sp* و *Rhodococcus sp*) مثال‌هایی در این زمینه است. قارچ‌های رشته‌ای، مانند *Verticillium sp*، *Aspergillus fumigatus* *Fusarium oxysporum* و همچنین *Aspergillus flavus* نیز اغلب قادرند به صورت خارج سلولی تولید نانوذرات نقره و طلا را انجام دهند (۹-۶).

روش‌های زیستی معایب روش‌های فیزیکوشیمیایی را ندارد. با توجه به کاربردهای فراوان نانوذرات طلا در علوم پزشکی، صنایع غذایی، ساخت ابزارهای نوری، الکترونیک و ... در این تحقیق برای اولین بار در ایران با هدف تولید زیستی به عنوان یک روش پاک در تولید نانوذرات طلا، از باکتری فلزدوست *C. necator* استفاده شد و اثبات نانومتری بودن و بررسی شرایط مؤثر در تولید این نانوذرات مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

تهیه سویه و کشت باکتری

باکتری *C. necator H16 (DSM428)* از کلکسیون کشت میکروبی و سلولی آلمان (DSMZ) (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) تهیه شد. باکتری مورد نظر در محیط Nutrient broth تلقیح در

بررسی مورفولوژی و ترکیب شیمیایی بیونانوذرات

میزان ۱ میلی لیتر از نمونه های ۲۴ ساعته، پس از سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ pm و شستشو با آب، در محلول ۴ درصد گلو تار آلدهید به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت شد. برای حذف گلو تار آلدهید، نمونه ها ۳ مرتبه با آب مقطر دیونیزه شستشو داده شد. میزان ۱۰ ماکرولیترا از نمونه تثبیت شده بر روی صفحات مشبک از جنس نیکل در دمای اتاق خشک گردید و مورفولوژی نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری CM Philid 20 (Transmission Electron microscopy یا TEM) مورد بررسی قرار گرفت. پراکندگی اندازه نانوذرات با استفاده از نرم افزار ImageJ اندازه گیری شد. هم زمان با تهیه عکس میکروسکوپ الکترونی از نمونه های تثبیت شده، با استفاده از دستگاه طیف سنج پراش انرژی (Energy Dispersive Spectra یا EDS) نصب شده بر روی میکروسکوپ الکترونی، ترکیب شیمیایی نانوذرات مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که کلیه دستگاه ها قبل از استفاده کالیبره شد.

بررسی عوامل مؤثر بر تولید و اندازه نانوذرات

سانتر نانوذرات توسط باکتری در غلظت های متفاوت بیوماس سلولی (۱/۵۵، ۱/۲ و ۰/۶ میلی گرم بر میلی لیتر)، غلظت های متفاوت فرمات (۱۰، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۲۵ میلی مولار) و غلظت های متفاوت هیدروژن تتراکلوآتورات (۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میلی مولار) و همچنین توانایی باکتری در احیا و سنتز نانو ذرات از نمک ۱ میلی مولار مونو کلرید طلا مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج

محلول زرد رنگ هیدروژن تتراکلوآتورات در حضور باکتری *C. necator* و فرمات کاهش پیدا کرد و منجر به ایجاد رنگ قرمز در محلول مورد نظر گردید؛ در حالی که هیچ گونه تغییر رنگی در نمونه های شاهد مشاهده نشد

دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور ۱۲۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت گرماخانه گذاری شد.

سنتز بیونانوذرات طلا

سلول های باکتری مورد نظر به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۴۲۰ g سانتریفیوژ گردید و مایع رویی دور ریخته شد و سپس بیوماس سلولی حاصل ۳ مرتبه با بافر MOPS_NaOH در pH = ۷ شستشو داده شد. سپس بیوماس سلولی در محلول ۰/۰۱ مولار اسیدنیتریک pH = ۲ مخلوط و کدورت سوسپانسیون مورد نظر در $OD_{600} = 1/3$ معادل ۱/۵۵ میلی گرم بر میلی لیتر تنظیم و به لوله های بی هوای هانگیت استریل منتقل گردید. سوسپانسیون تهیه شده به مدت ۱۰ دقیقه توسط گاز نیتروژن بی هوای شد.

به سوسپانسیون بی هوای به دست آمده محلول هیدروژن تتراکلوآتورات (HAuCl₄) با غلظت نهایی ۱ میلی مولار و فرمات، به عنوان الکترون دهنده، با غلظت نهایی ۲۵ میلی مولار افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۹ درجه سانتی گراد گرماخانه گذاری گردید.

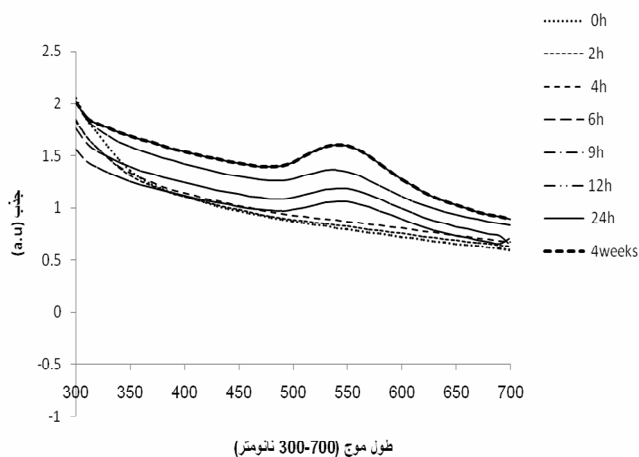
نمونه های شاهد شامل ۱- سوسپانسیون باکتریای و فرمات، ۲- سوسپانسیون باکتریای، هیدروژن تتراکلوآتورات و ۳- فرمات و هیدروژن تتراکلوآتورات بود. تمامی نمونه های مورد نظر در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور ۱۲۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت گرماخانه گذاری شد. لازم به ذکر است که برای هر کدام از نمونه ها حداقل ۳ تکرار صورت پذیرفت.

تعیین ویژگی های بیونانوذرات

بررسی طیف جذبی بیونانوذرات

در زمان های متعدد، جذب UV نمونه های مورد نظر در طیف ۷۰۰-۳۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis (BioTek, Power wave XS, US.) مورد اندازه گیری قرار گرفت.

مشاهده نشد که نشان‌دهنده پایداری به مدت طولانی، یکنواختی و عدم تجمع نانوذرات می‌باشد.

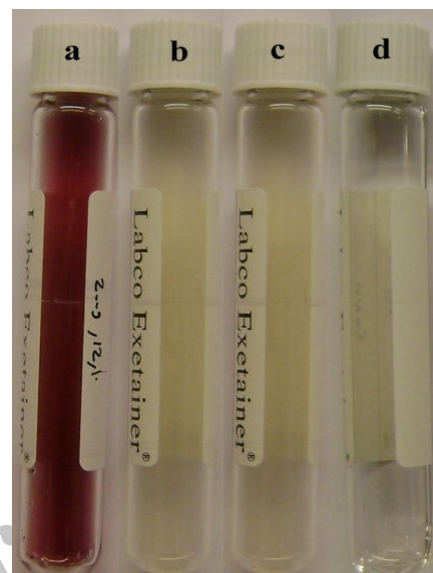


نمودار ۱. طیف جذب UV-Vis محلول حاوی باکتری *C. necator* و ۲۵ میلی‌مولار فرمات و ۱ میلی‌مولار هیدروژن تتراکلروآئورات.

باکتری توانایی احیا و تشکیل نانوذرات از هر دو ماده طلا (I) و طلا (III) را دارا می‌باشد؛ شکل ۲ نشان‌دهنده تصویر میکروسکوپ الکترونی از نمونه‌های تثبیت شده است که تشکیل و نانومتری بودن ذرات را اثبات می‌کند. در نمونه‌های شاهد (شکل ۲ قسمت a و c) نانوذره‌ای مشاهده نشد.

توزیع پراکندگی اندازه ذرات با استفاده از نرم‌افزار ImageJ اندازه‌گیری شد. با توجه با نمودار ۲ و شکل ۲، تولید بیو نانوذرات طلا با استفاده از هیدروژن تتراکلروآئورات (Au III) از یکنواختی بیشتر و اندازه‌های کوچک‌تری نسبت به ذرات ایجاد شده از نمک مونوکلرید طلا (Au I) برخوردار بود؛ طیف‌سنج پراش انرژی (EDS) وجود طلا (۰) را در بیو نانوذرات اثبات نمود (نمودار ۳).

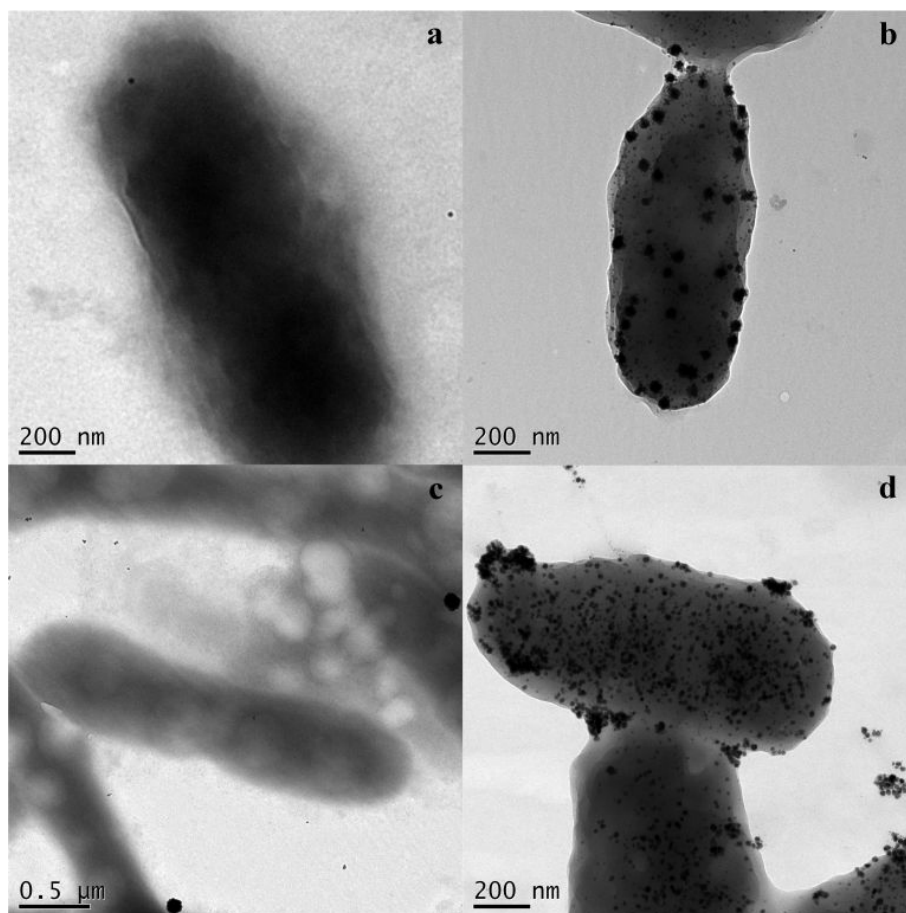
شکل ۱). آشکار شدن رنگ قرمز در محلول واکنش نشانه واضحی از تشکیل ذرات طلا در مقیاس نانومتری بود.



شکل ۱. سستریو نانوذرات توسط باکتری *C. necator*

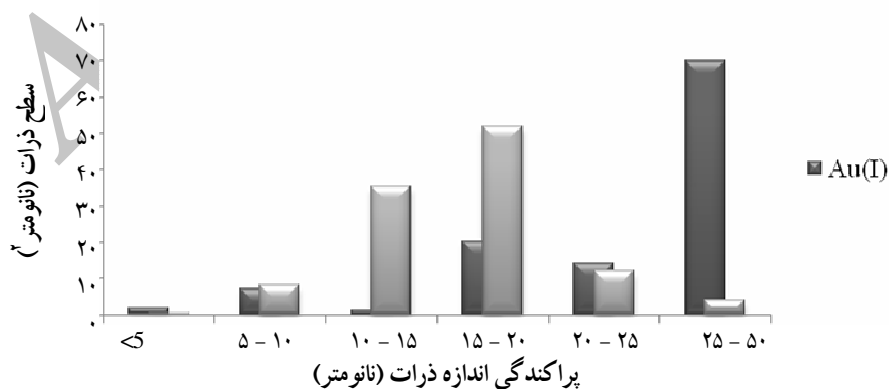
ایجاد رنگ قرمز ناشی از تشکیل بیونانوذرات در حضور باکتری *C. necator* و فرمات (a) قابل ملاحظه است. در نمونه‌های شاهد، تغییر رنگی صورت نپذیرفت (b, c, d).

طیف جذب UV-Vis محلول حاوی باکتری *C. necator*، ۲۵ میلی‌مولار فرمات و ۱ میلی‌مولار هیدروژن تتراکلروآئورات در زمان‌های متفاوت توسط دستگاه اندازه‌گیری شد و بیشترین جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر مشاهده گردید که از ویژگی‌های بارز نانوذرات طلا است (نمودار ۱). همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، افزایش میزان جذب نوری طی ۲۴ ساعت نشان‌دهنده کاهش کاتیون طلا (III) و تشکیل نانوذرات حاصل می‌باشد و طی زمان‌های متفاوت هیچ‌گونه جابه‌جایی در پیک ۵۴۰ نانومتر

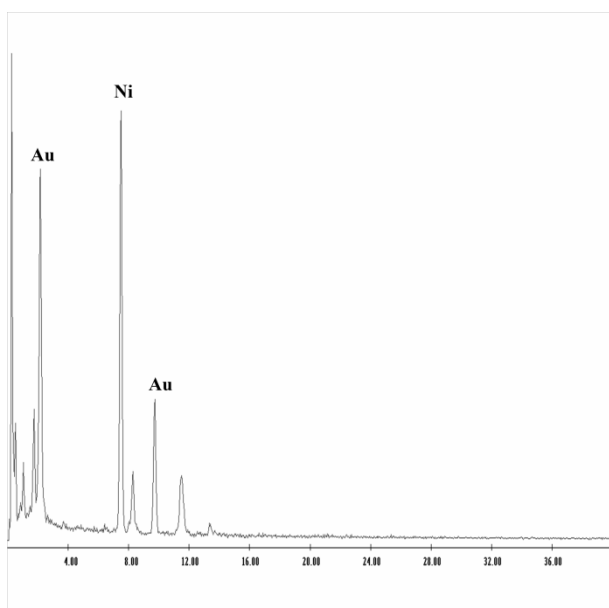


شکل ۲. نمای میکروسکوپ الکترونی نانوذرات طلا تشکیل شده در سطح باکتری *C. necator*

a در حضور ۱ میلی مولار مونوکلرید طلا بدون حضور فرمات (شاهد)؛ *b* در حضور ۲۵ میلی مولار فرمات و ۱ میلی مولار مونوکلرید طلا؛ *c* در حضور ۱ میلی مولار هیدروژن تتراکلروآنورات بدون حضور فرمات (شاهد)؛ *d* در حضور ۲۵ میلی مولار فرمات و ۱ میلی مولار هیدروژن تتراکلروآنورات



نمودار ۲. توزیع پراکنندگی اندازه نانوذرات در حضور ۱/۵۵ میلی گرم بر میلی لیتر بیوماس، ۲۵ میلی مولار فرمات و ۱ میلی مولار هیدروژن تتراکلروآنورات (*Au III*) یا ۱ میلی مولار مونوکلرید طلا (*Au I*).



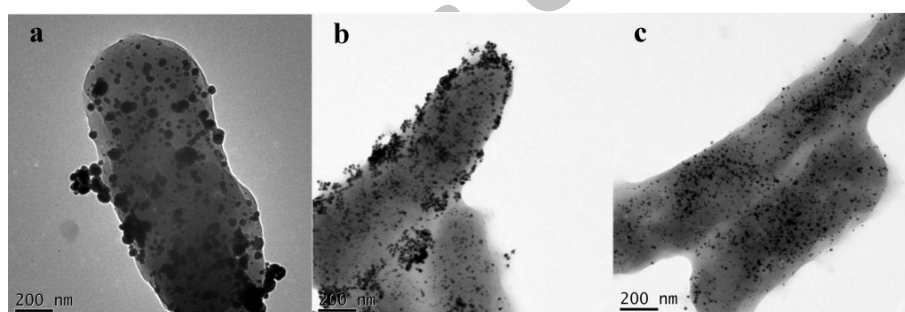
نمودار ۳. طیف سنج پراش انرژی (EDS) نانوذرات تشکیل شده در سطح باکتری *C. necator* در حضور بیوماس، ۱ میلی مولار هیدروژن تتراکلروآنورات و ۲۵ میلی مولار فرمات.

تشکیل نانوذرات در شرایط مختلف

اثر وزن خشک بیوماس بر تولید بیونانوذرات با افزایش غلظت بیوماس باکتری، اندازه بیونانوذرات کوچک تر و از یکنواختی بیشتری برخوردار بود (شکل ۳).

تأثیر غلظت های متفاوت هیدروژن تتراکلروآنورات (کاتیون طلا III) بر تشکیل، پراکندگی و اندازه ذرات

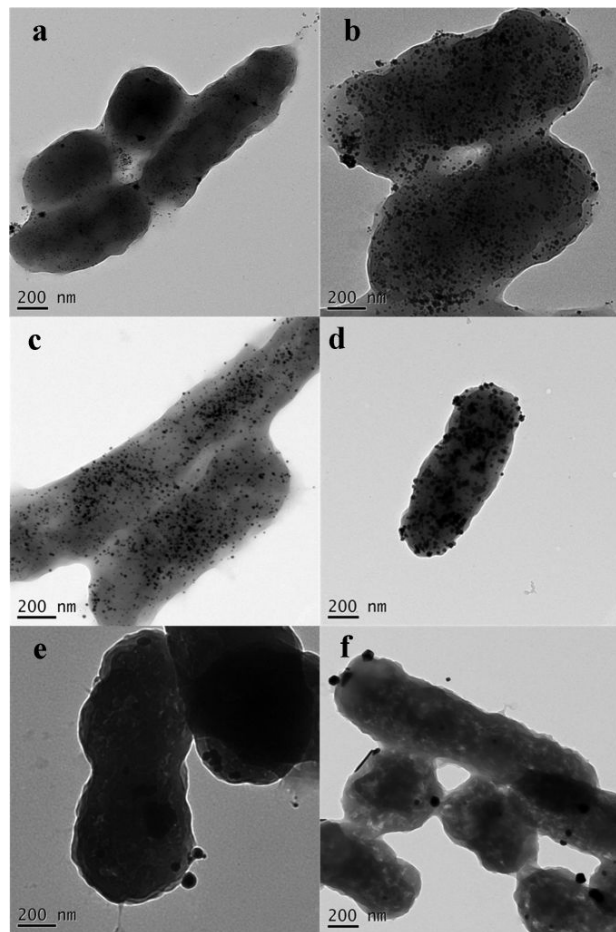
شکل ۴ نمای میکروسکوپ الکترونی تشکیل نانوذرات طلا توسط باکتری در غلظت های متفاوت کاتیون طلا III و غلظت ثابت ۲۵ میلی مولار فرمات را نشان می دهد؛ همان طور که مشاهده می شود، میزان یکنواختی در نانوذرات ایجاد شده در شرایط ۱ میلی مولار تتراکلرید طلا و ۲۵ میلی مولار بیشتر بوده است.



شکل ۳. نمای میکروسکوپ الکترونی نانوذرات طلا تشکیل شده در سطح باکتری *C. necator* در غلظت های متفاوت بیوماس با غلظت های ثابت ۱ میلی مولار هیدروژن تتراکلروآنورات و ۲۵ میلی مولار فرمات؛ a ۰/۶ میلی گرم بر میلی لیتر، b ۱/۲ میلی گرم بر میلی لیتر و c ۱/۵۵ میلی گرم بر میلی لیتر.

فرمات، نانوذره ای در سطح باکتری تشکیل نشد و یا نانوذرات بسیار بزرگ در برخی نقاط سطحی سلول مشاهده گردید (شکل ۵).

اندازه گیری میانگین اندازه نانو ذرات مشخص نمود که با افزایش غلظت کاتیون طلا III تا ۲ میلی مولار، میانگین اندازه نانو ذرات افزایش پیدا می کند (جدول ۱). در غلظت های بالاتر از ۵ میلی مولار و در حضور ۲۵ میلی مولار



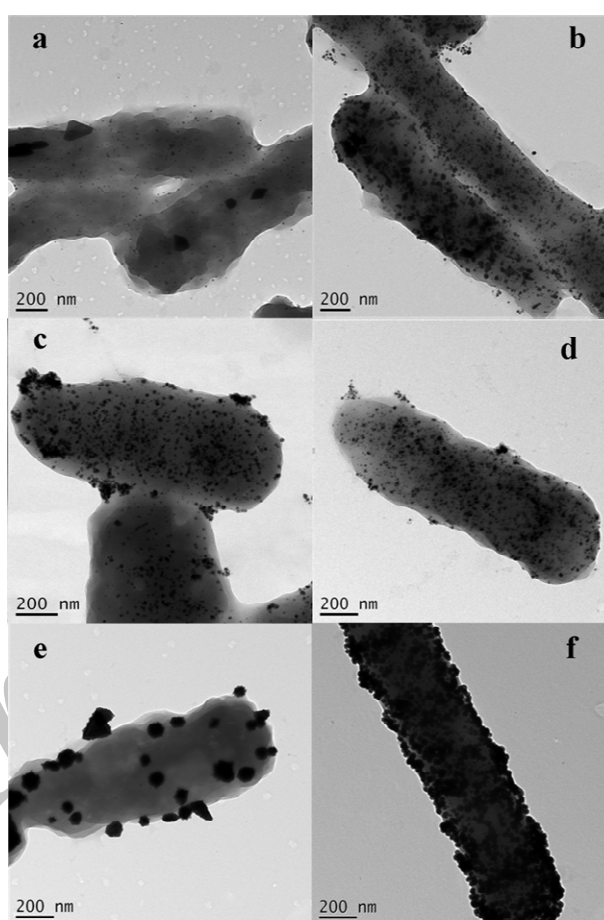
شکل ۴. نمای میکروسکوپ الکترونی نانوذرات طلا تشکیل شده در سطح باکتری *C. necator* در غلظت‌های متفاوت هیدروژن تراکلروآئورات (کاتیون طلا III) و میزان ثابت ۲۵ میلی مولار فرمات؛ *a.* ۰/۲۵ میلی مولار، *b.* ۰/۵ میلی مولار، *c.* ۱ میلی مولار، *d.* ۲ میلی مولار، *e.* ۵ میلی مولار و *f.* ۱۰ میلی مولار.

حضور ۲۵ میلی مولار مشاهده شد. همان‌طور که در شکل ۵ قسمت *e* و *f* مشاهده می‌شود، با افزایش میزان فرمات تولید نانوذرات در غلظت بالای کاتیون طلا III صورت پذیرفت و بزرگ‌ترین نانوذرات در حضور بیوماس، ۵ میلی مولار هیدروژن تراکلروآئورات و ۵۰ میلی مولار فرمات صورت پذیرفت. این نانو ذرات از یکنواختی خوبی برخوردار نبود و بیشترین یکنواختی در حضور ۲۵ میلی مولار فرمات مشاهده شد.

تأثیر تفاوت غلظت فرمات بر تشکیل، پراکندگی و اندازه ذرات برای هر یک از حالت‌های موجود در جدول ۱، با استفاده از نرم‌افزار ImageJ اندازه قطر ۱۰۰ نانوذره به صورت تصادفی انتخاب و در نهایت میانگین قطر نانوذرات اندازه‌گیری شد. شکل ۵ و جدول ۱ تأثیر غلظت‌های متفاوت ۱۰، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۲۵ میلی مولار فرمات را در حضور ۱ میلی مولار هیدروژن تراکلروآئورات نشان می‌دهد؛ افزایش غلظت از ۱۰ تا ۵۰ میلی مولار تأثیر چندانی بر میانگین اندازه ذرات نداشت اما بیشترین یکنواختی در

با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis قابل تشخیص است، در غلظت‌های کمتر از نسبت ۱:۱۰ صورت نگرفت. فرمات به عنوان الکترون دهنده ضروری می‌باشد. در نسبت بالاتر از ۱:۵۰ زمان شروع یکسان بود و طی ۳ ساعت اتفاق افتاد؛ در حالی که ذرات از یکنواختی خوبی برخوردار نبودند (شکل ۵). در نهایت بهترین نسبت، نسبت ۱ میلی مولار هیدروژن تتراکلروآئورات به ۲۵ میلی مولار فرمات تشخیص داده شد.

نسبت میان غلظت هیدروژن تتراکلروآئورات و فرمات بر زمان، تشکیل، اندازه و یکنواختی نانوذرات مؤثر است. همان طور که در جدول ۱ قابل مشاهده است، حداقل نسبت میان هیدروژن تتراکلروآئورات و فرمات برای تشکیل نانوذرات برابر ۱ میلی مولار طلا: ۱۰ میلی مولار فرمات می‌باشد که بعد از ۲۴ ساعت تولید نانوذرات شروع می‌شود. شروع تشکیل نانوذرات، که به صورت چشمی و



شکل ۵. نمای میکروسکوپ الکترونی نانوذرات طلا تشکیل شده در سطح باکتری *C. necator* در غلظت‌های متفاوت هیدروژن تتراکلروآئورات و فرمات؛

a. ۱ میلی مولار هیدروژن تتراکلروآئورات و ۱۰ میلی مولار فرمات، b. ۱ میلی مولار هیدروژن تتراکلروآئورات و ۱۲/۵ میلی مولار فرمات، c. ۱ میلی مولار هیدروژن تتراکلروآئورات و ۲۵ میلی مولار فرمات، d. ۲ میلی مولار هیدروژن تتراکلروآئورات و ۵۰ میلی مولار فرمات، e. ۵ میلی مولار هیدروژن تتراکلروآئورات و ۵۰ میلی مولار فرمات و f. ۵ میلی مولار هیدروژن تتراکلروآئورات و ۱۲۵ میلی مولار فرمات.

جدول ۱. زمان شروع احیای کلرید طلا و میانگین اندازه نانوذرات تشکیل شده در غلظت‌های متفاوت هیدروژن تتراکلروآئورات و فرمات توسط

باکتری *C. necator*

فرمات (میلی مولار)	غلظت Au III (میلی مولار)	ساعت (زمان شروع احیا)	میانگین اندازه (نانومتر)
۰	۱	-	۰
	۲	-	۰
	۵	-	۰
۱۰	۱	۲۴	۱۴/۱۷
	۲	-	۰
	۵	-	۰
۲۵	۰	-	۰
	۰/۲۵	۳	۳/۷۵
	۰/۵	۳	۱۳/۸۳
	۱	۶	۱۳/۲۷
	۲	۲۴	۲۱/۹۵
	۵	-	۰
۵۰	۱۰	-	۰
	۱	۳	۱۱/۷۹
	۲	۳	۱۴/۸۴
	۵	۳	۵۶/۴۳
۱۲۵	۱	۳	۱۹/۲۵
	۲	۳	۲۱/۸۹
	۵	۳	۲۲/۳۴

بحث

نانوذرات طلا است) اشاره نموده‌اند (۱۱). ما این تغییر رنگ را در حضور بیوماس باکتری فلزدوست *C. necator*، هیدروژن تتراکلروآئورات و فرمات نیز مشاهده نمودیم؛ محلول قرمز رنگ مورد نظر بیشترین جذب نوری را در ۵۴۰ نانومتر داشت. پایداری محلول تا ۴ هفته نشان‌گر تشکیل نانوذرات پایدار می‌باشد. حدس بر این است که اتصال نانوذرات به گروه‌های عاملی موجود در سطح باکتری بر پایداری بیونانوذرات مؤثر است؛ این نکته از مزایای روش زیستی می‌باشد. Bunge و همکاران ذکر

طبق گزارش‌های قبلی، از ویژگی‌های بارز ذرات طلا در مقیاس نانومتری ایجاد رنگ قرمز- صورتی با بیشترین جذب نوری در نواحی اطراف ۵۴۰ نانومتر در محلول است. بدین ترتیب یک روش بسیار ساده در تشخیص تشکیل نانوذرات طلا، مشاهده چشمی در تغییر رنگ محلول مورد نظر به رنگ قرمز می‌باشد (۱۰). Kalishwaralal و همکاران همچنین طی گزارشی به ایجاد رنگ قرمز در محلول حاصل از سنتز نانو ذرات طلا توسط باکتری *Bacillus licheniformis* با بیشترین جذب نوری در ۵۴۰ نانومتر (که متعلق به

تتراکلرید طلا به ۱۰ میلی مولار فرمات تشخیص داده شد. در غلظت ثابت ۲۵ میلی مولار فرمات با افزایش غلظت طلا (III) تا حد ۲ میلی مولار اندازه ذرات افزایش پیدا کرد؛ در حالی که در غلظت ۵ میلی مولار طلا (III) و بیشتر، در صورت افزایش غلظت فرمات نانوذرات تشکیل شد. بنابراین، در شرایط ۱ میلی مولار تتراکلرید طلا و ۲۵ میلی مولار فرمات بیشترین یکنواختی در شکل و اندازه نانوذرات قابل مشاهده است.

نتیجه گیری

در دهه های اخیر، با توجه به اهمیت کاربرد نانو ذرات طلا در علوم مختلف پزشکی و دارورسانی، تولید و پایدارسازی این نانوذرات از اهداف دانشمندان فناوری نانو می باشد. در این تحقیق موفق یه سنتز بیونانو ذرات پایدار توسط باکتری شدید. نانومتری بودن و ویژگی های این ذرات با روش های میکروسکوپ الکترونی و طیف سنج پراش انرژی مورد بررسی قرار گرفت. بهینه سازی یکنواختی نانوذرات با تغییر شرایط محیطی صورت پذیرفت و بیشترین یکنواختی در شکل و اندازه نانو ذرات در حضور ۱/۵۵ میلی گرم بر میلی لیتر بیوماس، ۱ میلی مولار هیدروژن تتراکلروآتورات و ۲۵ میلی مولار فرمات مشاهده شد.

نموده اند که در سنتز نانوذرات میکروبی، سطح باکتری به عنوان پایدار کننده عمل می کند (۱۲).

در این مطالعه، برای اطمینان از حضور طلا در نانو ذرات مشاهده شده در سطح باکتری از طیف سنج پراش انرژی استفاده شد. Nangia و همکاران نیز از این روش برای اثبات وجود طلا در نانوذرات تولید شده توسط باکتری *Stenotrophomonas malophilia* استفاده نموده اند (۱۳).

اندازه و شکل نانوذرات بر خصوصیات نوری، الکترونیک و مغناطیسی آنان مؤثر است. یکی از اهداف علم نانو تکنولوژی تولید نانوذرات با یکنواختی و اندازه های کوچک تر می باشد. کنترل شکل و اندازه نانوذرات به عوامل محیطی مؤثر است. ما مشاهده کردیم که با افزایش غلظت باکتری، نانوذرات کوچک تر با یکنواختی بیشتر تولید گردید. مشابه با نتایج ما، Shankar و همکاران مشاهده نمودند که با افزایش غلظت عصاره گیاه ماگنولیا اندازه نانوذرات طلا تولیدی کوچک تر می شود (۱۴). Feng و همکاران نیز در مطالعه بر روی احیای طلا توسط *Rhodobacter capsulatus* گزارش نمودند که با افزایش غلظت اولیه طلا (III)، اندازه نانوذرات افزایش پیدا می کند. قابل ذکر است که در تحقیق آنان، نسبت میان غلظت تتراکلرید طلا و فرمات بر تشکیل و اندازه نانوذرات مؤثر بود (۱۵). حداقل نسبت برای تشکیل نانوذرات برابر ۱ میلی مولار

References

1. Kermanshahi RK, Hossein Khani B. Nanobiotechnology and microbiology perspective. Isfahan, Isfahan University Publications, 2008; p. 20-63[Persian].
2. Mandal D, Bolander ME, Mukhopadhyay D, Sarkar G, Mukherjee P. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. Appl Microbiol Biotechnol 2006; 69(5): 485-92.
3. Murali S, Absar A, Islam Khan M, Kumar R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. Current Science 2003; 85(2): 162-70.
4. Absar A, Satyajyoti S, Islam Khan M, Rajiv K, Murali S. Extracellular biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by a novel extremophilic actinomycete. Thermomonospora sp Langmuir 2003; 19(8): 3550-3.

5. He SH, Guo Z, Zhang Y, Zhang S, Wang J, Gu N. Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodospseudomonas capsulata*. *Materials Letters* 2007; 61(18): 3984-7.
6. Ambrosi A, Airo F, Merkoci A. Enhanced gold nanoparticle based ELISA for a breast cancer biomarker. *Anal Chem* 2010; 82(3): 1151-6.
7. Gerick M, Pinches A. Biological synthesis of metal nanoparticle. *Hydromet* 2006; 83(1-4): 132-40.
8. Lang C, Schuler D. Biogenic nanoparticles: production, characterization, and application of bacterial magnetosomes. *Journal of Physics: Condensed Matter* 2006; 18(38): S2815-S2828.
9. Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research* 2006; 10(3): 507-17.
10. Agnihotri M, Joshi S, Kumar AR, Zinjarde SZ, Sulabh K. Biosynthesis of gold nanoparticles by the tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Materials Letters* 2009; 63(15): 1231-4.
11. Kalishwaralal K, Deepak V, Ram Kumar PS, Gurunathan S. Biological synthesis of gold nanocubes from *Bacillus licheniformis*. *Bioresour Technol* 2009; 100(21): 5356-8.
12. Bunge M, Søbjerg LS, Rotar A, Gauthier D, Lindhardt AT, Hause G, et al. Formation of Palladium(0) Nanoparticles at Microbial Surfaces. *Biotechnol and Bioeng* 2010; 107(2): 1-11.
13. Nangia Y, Wangoo N, Goyal N, Shekhawat G, Suri CR. A novel bacterial isolate *Stenotrophomonas maltophilia* as living factory for synthesis of gold nanoparticles. *Microb Cell Fact* 2009; 8: 39.
14. Shankar SS, Rai A, Ankamwar B, Singh A, Ahmad A, Sastry M. Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. *Nat Mater* 2004; 3(7): 482-8.
15. Feng Y, Lin X, Wang Y, Wang Y, Hu J. Diversity of Aurum bio-reduction by *Rhodobacter capsulatus*. *Materials Letters* 2008; 62(27): 4299-302.

Bio-gold Nanoparticle Synthesis by Metalophilic Bacterium *Cupriavidus necator***Hoseinkhani B., M.Sc.^{1*}, Emtiazi G., Ph.D.²**

1. PhD Student, Department of Biology, School of Science, The University of Isfahan, Isfahan, Iran

2. Professor, Department of Biology, School of Science, The University of Isfahan, Isfahan, Iran

* Corresponding author; e-mail: bahar_hoseinkhani@yahoo.com

(Received: 2 Jan. 2011 Accepted: 14 August 2011)

Abstract

Background and Aims: Gold nanoparticles have potential applications in the areas of medicine, target drug delivery, cancer diagnosis and therapy, electronic, etc. Recently, biological system is considered as an environmental friendly method for synthesis of stable nanoparticles.

Methods: We demonstrated a biological system for formation of stable gold nanoparticle by using *Cupriavidus necator* without using additives such as stabilizing agents. The sizes and composition of nanoparticles were characterised by UV-Vis spectrophotometer, transmission electron microscopy, energy dispersive spectra, and ImageJ software.

Results: Stable bio-gold nanoparticle was formed by using metalophilic bacterium *Cupriavidus necator*. High uniformity was observed in the presence of 1.55 mg/ml dry biomass, 1 mM Hydrogen tetrachloroaurate and 25 mM formate.

Conclusions: Microbial synthesis of nanoparticle, such as gold, is an easy and eco-friendly method to preparation of stable nanoparticles.

Keywords: Bio-nanoparticle, Gold, Bacteria, Medicine

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2012; 19(1): 20-31