Archive of SID

مجله دنیای میکروب ها
سال دوم، شماره یک، ۱۳۸۸
صفحات ۴۷ ـ ۴۴

Original Article

تولید برون سلولی نانوذرات نقره به وسیله قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم در مقیاس آزمایشگاهی

گلشید سجادی*[۱] ، دکتر ابوالفتح شجاعی[۲]، دکتر محمدرضا فاضلی[۳]، جاوید امینی[۴]، حسین جمالی فر[۳]

[۱]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، [۲]گروه تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران ـ تهران،
[۳]گروه میکروبیولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه تهران، [۴]گروه میکروبیولوژی، پژوهشکده تعلیم و تربیت کرمان

چکیده

سابقه و هدف: اصلی ترین هدف نانو فن آوران توسعه روش هایی است که بدون استفاده از مواد آلاینده و سمی، با کمترین ضایعات توانایی تولید نانو ساختارهای کنترل شده را داشته باشد. به همین دلیل زیست شناسان با اطلاع قبلی از ساخت کنترل شده مواد معدنی در مقیاس نانو به وسیله موجودات زنده، به دنبال سامانه های زنده تولید کننده نانوذرات غیرآلی هستند. هدف از این پژوهش تولید برون سلولی نانوذرات نقره توسط قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم (*Fusarium oxysporum*) با حداکثر ابعاد ۲۰ نانومتر می باشد.

مواد و روش ها: پس از بهینه سازی شرایط رشد در محیط کشت حاوی عصاره مخمر و عصاره مالت، توده سلولی قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم تولید گردید. پس از تولید نانوذرات نقره در محلول نیترات نقره با روش‌های UV-Visible spectrophotometry و میکروسکوپ الکترونی گذاره (Transmission electron microscopy) نانو ذرات تولید شده مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج این پژوهش نشان داد که قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم در غلظت 10^{-3} مولار یون‌های نقره قادر به تولید نانوذرات نقره به صورت برون سلولی می باشند.

نتیجه گیری: به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد فیزیکی و شیمیایی نانوذرات نقره با اندازه ذره ای حداکثر ۲۰ نانومتر به وسیله قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم، تولید آن در حد صنعتی و بررسی کاربردی آن پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: برون سلولی، نانو ذرات نقره، فوزاریوم اگزیسپوروم، مقیاس آزمایشگاهی
دریافت مقاله: پاییز ۸۷ پذیرش برای چاپ: زمستان ۸۷

مقدمه

یکی از شاخه های مهم نانوفن آوری سنتز نانوذرات با ویژگی های شیمیایی، اندازه و ابعاد متفاوت می باشد. امروزه نیاز به گسترش فرایندهای سنتز نانوذرات دیده می شود. محققان در زمینه سنتز نانوذرات به سیستم های زیستی توجه خاص دارند. مسلما این نکته قابل توجه است که ارگانیسم های تک سلولی و چند سلولی زیادی توانایی تولید مواد غیرآلی را هم به صورت داخل سلولی و هم خارج سلولی دارا می باشند (۱و۲).

Klaus و همکارانش نشان دادند که مجاور ساختن باکتری *Pseudomonas stutzeri* AG259 جدا شده ازیک معدن نقره در یک محلول غلیظ از نیترات نقره موجب احیای یون های نقره و تشکیل نانوذرات نقره در اندازه مشخص، در فضای پری پلاسمی باکتری می‌شود (۳و۴). پژوهش‌های مختلف نشان داده که میکروارگانیسم هایی مانند باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها نقش مهمی در دفع فلزات سمی از طریق احیای یون‌های فلزی دارند. سنتز زیستی نانو مواد توسط ارگانیسم های یوکاریوتی مانند قارچ‌ها، در تولید نانوذرات طلا (۵) و نقره (۶) به صورت درون سلولی در سلول‌های قارچ *Verticillium* تایید شده است. گونه‌های مختلف قارچ یاد شده در مجاور یون های تتراکلرواورئات ($AuCl^-_4$) و نقره (Ag^+) قادر به تولید نانوذراتی با ابعاد ۲ تا ۲۰ نانومتر پس از ۷۲ ساعت

*آدرس برای مکاتبه: لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی golshid_sajadi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشند (۷). قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم قادر به تولید نانوذرات طلا به صورت برون سلولی می باشد (۸). هم چنین این قارچ قادر به تولید نانوذرات نقره به صورت برون سلولی و بسیار پایدار است (۹). تولید برون سلولی نانوذرات، باعث کاهش هزینه‌های استخراج و بررسی آسان آنها می شود. هدف از این پژوهش سنتز برون سلولی نانوذرات نقره توسط قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم می‌باشد.

مواد و روش ها

قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم از بانک میکروبی موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور(شماره C-۱۰۲۴) تهیه گردید. ابتدا قارچ در محیط سابرو دکستروز آگار(SDA) شرکت Merck به مدت ۵ روز در ۳۰ °C گرمخانه گذاری گردید . برای ایجاد توده سلولی، قارچ از محیط SDA به محیط واجد ۰/۲ گرم بر لیترعصاره مالت ۰/۰۵ گرم در لیترعصاره مخمر منتقل گردید و سپس در حرارت ۳۰ °C و در ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۳روز گرمخانه گذاری شد. پس از ۳ روز، توده سلولی قارچ به محیط حاوی ۰/۰۵ گرم در لیتر عصاره مخمر تلقیح و در حرارت ۳۰ °C به مدت ۷ روز گرمخانه گذاری شد. سپس توده سلولی قارچ فیلتر و ۳ بار به وسیله آب مقطر استریل شسته شد.

برای احیای یون های نقره، ۵ گرم از توده سلولی قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم به ۵۰ میلی لیتر محلول نیترات نقره (Merck) 10^{-3} مولار درشرایط استریل افزوده شد. به منظور جلوگیری از اثر نور بر محلول نیترات نقره، واکنش در شرایط تاریکی بررسی گردید. سپس در فواصل زمانی معین، حجم ثابتی از محلول واکنش برداشته و جذب آن توسط اسپکتوفتومتر UV-Vis (Spectronic $250D^{+}$) اندازه گیری شد. بررسی نانوذرات نقره و هم چنین شکل و ابعاد آنها توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (TEM) (EM208 Philips) بررسی گردید.

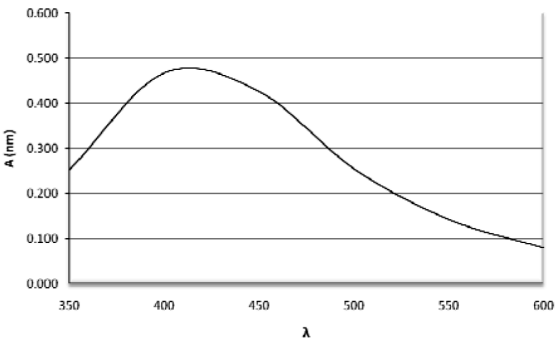
یافته ها

با ارزیابی توده سلولی قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم پس از ۷۲ ساعت مشخص شد که توده سلولی قارچ پس از واکنش با یون‌های نقره از رنگ زرد کم رنگ به قهوه ای خرمایی تغییر رنگ می‌دهد. همچنین مشخص شد که پس از فیلتر کردن توده سلولی قارچ، توده سلولی هنوز هم به صورت زرد کم رنگ باقی می‌ماند. در شکل ۱ طیف‌های UV-Vis ثبت شده در طی واکنش با قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم با محلول نیترات نقره در طول موج ۴۲۰-۴۱۰ نانومتر نشان داده شده است. همچنین ارزیابی تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) ثبت شده از نانوذرات نقره بر روی یک صفحه کربنی پوشانده شده از مس نشان داد که این ذرات به صورت جدا از یکدیگر وجود دارند (شکل ـ ۲).

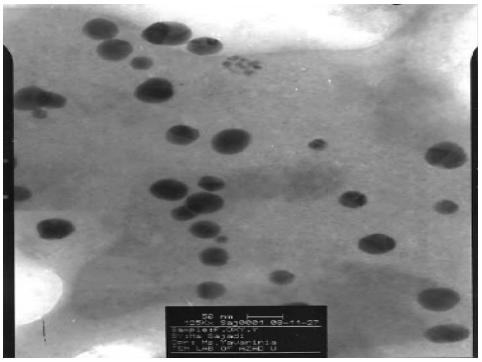
بحث

در یک دیدگاه کلی، نتایج به دست آمده حاکی از این است که قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم توانایی تولید خارج سلولی نانوذرات نقره را دارد. پیدایش رنگ قهوه ایی خرمایی در محلول حاوی توده سلولی قارچ، یک نشانه واضح از تشکیل نانوذرات نقره در محلول واکنش و هم چنین ناشی از ارتعاشات پلاسمون سطحی در نانوذرات می باشد (۱۰و۱۱).

با فیلتر کردن توده سلولی قارچ، مشاهده شد که توده سلولی هنوز هم زرد کم رنگ است، در صورتی که محلول حاوی نانوذرات نقره، به صورت قهوه ای خرمایی مشاهده گردید. این نشان می‌دهد که احیای یون های نقره به صورت خارج سلولی بوده که دلیل آن



شکل ۱: نمودار جذب نوری مایع رویی محیط کشت عصاره مخمر و مالت، قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم.



شکل ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) ثبت شده از نانوذرات نقره (DEFOCUS:89.0 μm).

www.SID.ir

Archive of SID

می تواند رها شدن عناصر قارچی در محلول واکنش باشد. قابل توجه است که نانوذرات نقره تولید شده توسط قارچ مذکور از پایداری زیادی برخوردارند که شاید ناشی از تثبیت نانو ذرات نقره توسط پروتئین ها باشد (۹). هم چنین بررسی ها نشان می دهد که ارتعاشات پلاسمون سطحی می تواند باعث افزایش شدت رنگ محلول های نانوذرات نقره باشد. طیف های UV-Vis ثبت شده، به طور کامل نشان دهنده افزایش ارتعاشات پلاسمون سطحی در طول موج ۴۱۰ نانومتر می‌باشد (۱۲) که نشان دهنده حضور نانوذرات نقره در محلول رویی (سوپرناتانت) است. نتایج آنالیز تصویر TEM، نانوذراتی با ابعاد حداکثر۲۰ نانومتر را نشان می‌دهد. این نانوذرات نقره از لحاظ مورفولوژی دارای اشکال نسبتا متفاوتی بودند. همان طور که در تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره مشاهده می‌شود، نانوذرات نقره حتی در درون تجمعات تشکیل شده، در تماس مستقیم با هم نیستند، که این مساله می‌تواند ناشی از یک پوشش پروتئینی باشد (۹). نانوذرات تولید شده به صورت زیستی می توانند در زمینه های مختلفی از جمله اپتیک غیرخطی، پوشش انتخابی برای جذب انرژی خورشیدی، مواد بین لایه‌ای برای باطری‌های الکتریکی، گیرنده های نوری، به عنوان کاتالیزگر در واکنش‌های شیمیایی و زیستی و به عنوان عوامل ضد باکتریایی کاربردهای زیادی داشته باشند (۱۳).

هدف اصلی ما از این پژوهش، تولید نانوذرات نقره به صورت برون سلولی برای بررسی آسانتر وایجاد شرایط مناسب برای تولید بهینه نانوذرات نقره بود. نانوذرات نقره تولید شده از راه زیستی، نسبت به ذرات تولید شده شیمیایی، به دلیل عدم وجود باقیمانده‌های سمی آلی درسطح، ایجاد حداقل ضایعات و مواد غیرمصرفی در فرایند تولید، حجم بالای تولید و تکرارپذیری، ارزشمندتر است. به دلیل کاربردهای گسترده و ویژگی های ارزنده نانو ذرات در علم نانوبیوتکنولوژی، این مطالعه می تواند زمینه ساز مطالعات فراگیر در استفاده از روش های زیستی در تولید برون سلولی نانو ذرات نقره را فراهم آورد.

نتیجه گیری

به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم قادر به تولید نانوذرات نقره با اندازه ابعاد حداکثر ۲۰ نانومتر می باشد. نانوذرات نقره تولید شده توسط این قارچ، به صورت برون سلولی بوده که نیاز به مرحله استخراج نداشته و بدون تقبل هزینه و مشکلات ناشی از استخراج، می توانند مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از جناب آقای محمد رضا ناظری زاده ریاست محترم پژوهشکده تعلیم و تربیت کرمان، به دلیل حمایت‌های اجرایی اعلام می‌دارند.

References

1. Simkiss K, Wilbur K.M, Biomineralization, Cell Biology and Mineral Deposition, San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, 1989;ISBN 0 12 643830 7, xiv + 337 pp.
2. MANN S, Biomimetic Materials Chemistry. New York, Weinheim, Cambridge: VCH Publishers, 1996;ISBN 1 56081 669 4, xvi + 383 pp.
3. Klaus T, Joerger R, Olsson E, Granqvist C.G, Lactobacillus assisted synthesis of titanium nano particles, Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1999;96:13611.
4. Joerger R, Klaus T, Granqvist CG. Biologically produced silver-carbon composite materials for optically functional thin-film coatings. Adv Mater, 2000;12:407-409.
5. Mukherjee P, Ahmad A, Mondol D, Senapati S, Sainkar SR, Khan ML, Ramani R, Parischa R, Ajayakumar PV, Alam A, Sastry M and Kumar R. Bioreduction of $AuCl_4^-$ ions by the fungus, *Verticillium Sp.* And surface trapping of the gold nanoparticles formed. Angew Chem Int Ed. 2001;40:3585-3588.
6. Mukherjee P, Ahmad A, Mondol D, Senapati S, Sainkar SR, Khan ML, Parischa R, Ajayakumar PV, Alam A, Kumar R and Sastry M. Fungus mediated synthesis of silver

www.SID.ir

Archive of SID

nanoparticles and their immobilization in the mycelia matrix: A novel biological approach to nanoparticle synthesis. Nano Lett. 2001;1:515-519.
7. Sastry M, Ahmad A, Islam NI and Kumar R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and *Actinomycete*. Current Sci. 2003;85:162-170.
8. Sastry M, Patil V and Sainkar SR. Electrostatically controlled diffusion of evaporated fatty amine films. J Phys Chem. 1998;102:1404-1410.
9. Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mondol D, Islam Khan M, Kumar R and Sastry M: Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. Biointerfaces. 2003;28:313-318.
10. Klaus-Joerger T, Joerger R, Olsson E, Granqvist CG: Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. Trends Biotechnol. 2001;19:15-20.
11. Sastry, M., Patil, V., Sainkar, S.R. Electrostatically controlled diffusion of carboxylic acid derivatized silver colloidal particles in thermally evaporated fatty amine films. J. Phys. Chem. 1998;B 102:1404-1408.
12. Duran N, Marcato PD, Alves OL, Souza GIHDE and Esposito E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. Journal of Nanobiotechnology. 2005;3:8-12.
13. Keating CK, Kovaleski MK, Natan MJ. Protein:Colloid Conjugates for Surface Enhanced Raman Scattering: Stability and Control of Protein Orientation. Phys.Chem B. 1998; 102(47):9404-9413.
14. Hamedi, A., H. Vahid and F. Ghanati, Optimization of the medium composition forproduction of mycellial biomass and exopolysaccharide by Agaricus blazei Murill DPPh 131. Biotechnology 2007;6(4):456-464.
15. Kumar S., M. Kazemian, W. Gozavi, K. Kulkarini,R. Pasrica, A. Ahmad, Nitrate reductase mediated synthesis of silver nano particles fromAgNO3. Biotechnol Lett 2007;29: 439-445.
16. Sintubin L, De Windt W, Dick J, Mast J, Van der Ha D, Verstraete W , Boon N, Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. Microbiology and Biotechnology. 2009;10(6):741-749.

www.SID.ir