Archive of SID

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره دوم، شماره ششم، بهار ۱۳۹۱

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بیوسنتز نانو ذرات تیتانیوم توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم های بومی ایران

سید امیر بهتاش لادن[۱]، عباس محمدی ازهر*[۲]، دکتر مریم تاج آبادی ابراهیمی[۳]، دکتر میترا حیدری نصر آبادی[۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران، ایران
[۲] کارشناس، گروه سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران
[۳] استادیار، گروه علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران
[۴] دانشیار، گروه علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بیوسنتز نانو ذرات با روش های زیستی توسط میکروارگانیسم ها، بدلیل سازگاری بالا با محیط زیست و کاهش مصرف انرژی و هزینه ها از جایگاه ویژه ای برخوردار هستند. زمانی که روش های تولید بر اساس فناوری های زیستی مطرح شدند، نظر بسیاری از محققین را بخود جلب کردند. یکی از مهم ترین ابعاد این بحث استفاده از میکروارگانیسم ها در فناوری نانو است.

مواد و روش ها: سویه های مختلفی از لاکتوباسیل های جدا شده از محصولات لبنی بومی ایران تحت شرایط کنترل شده، در معرض تیتانیوم دی اکساید قرار گرفته و نتایج با میکروسکوپ های الکترونی SEM و AFM و همچنین پراش پرتو ایکس (XRD) بررسی شدند.

یافته ها: در این مطالعه، شاهد شکل گیری نانوذرات تیتانیوم در ابعاد مختلف توسط برخی لاکتوباسیلوس پلانتاروم های جدا شده از محصولات لبنی بومی ایران هستیم.

نتیجه گیری: پس از بررسی و مطالعه سازوکار مولکولی بیوسنتز نانو ذرات توسط باکتری ها و احیای اکسیدهای فلزی توسط آنان، تحت عنوان فرایندی دفاعی که احتمالا به دلیل فقدان سوپراکسید دیسموتاز در برخی از این سویه ها است، تفصیر می گردد.

کلمات کلیدی: بیوسنتز، نانوذرات تیتانیوم، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، کاهش فلزی، تیتانیوم دی اکسید

مقدمه

میکروارگانیسم ها موجودات ریز و میکروسکوپی هستند که طولی کمتر از ۱۰ میکرون دارند (۱). این موجودات برای سوخت و ساز و انجام فرایند های حیاتی خود از منابع آلی و معدنی موجود در محیط تغذیه می کنند. مطالعات محققین نشان داده است که سیستم های زیستی قادرند شماری از ذرات فلزی با ابعاد نانومتری را سنتز نمایند (۱۲،۲). روش های فیزیکی و شیمیایی تولید نانو ذرات از لحاظ مصرف انرژی و مواد، ناکارامد بوده و بازده کمی دارند. در مقابل روش های سنتز سبز، بدلیل سازگاری بالا با محیط زیست و کاهش مصرف انرژی و هزینه ها، از جایگاه ویژه ای برخوردار گشته اند (۵). در میان روش های مختلف بیوسنتز نانو ذرات، استفاده از باکتری ها از توجه ویژه ای برخوردار است (۱۳،۱۲،۹،۸). سلول‌های باکتریایی دائماً در معرض شرایط پر تنش هستند و توانایی بقا در این شرایط برای آن ها حیاتی است. توانایی رشد میکرو ارگانیسم ها در حضور غلظت بالای فلزات ممکن است بدلیل مکانیسم های اختصاصی مقاومت باشد. این مکانیسم ها شامل سیستم انتشار به خارج (efflux system)، تغییر در حلالیت و سمیت با تغییر در پتانسیل اکسید و احیای یون های فلزی، ترکیب سازی و ته نشینی خارج سلولی و نقص در سیستم انتقال فلزات خاص می باشند (۱۵،۶،۲). گونه های باکتریایی که تحمل غلظت بالای یون های فلزی را ندارند نیز

آدرس نویسنده مسئول: گروه سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران
E-mail: am_azhar2@yahoo.com
تاریخ دریافت:۱۳۹۰/۰۸/۲۰
تاریخ پذیرش:۱۳۹۰/۱۰/۲۶

www.SID.ir

Archive of SID

می توانند گاهی به عنوان میکروارگانیسم ها ی مفید مورد استفاده قرار گیرند (۱۵،۱۰،۳).Binoj Nair و در سال ۲۰۰۲ T. Pradeep و K. Prasad و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که لاکتوباسیل های جدا شده از محصولات لبنی، توانایی تولید نانوذرات طلا، نقره و تیتانیوم را دارند (۱۱،۱۰). همچنین باکتری های اسید لاکتیک موجود در مایع پنیر نیز قادر به تولید ناذرات خالص از هر دو فلز و آلیاژ ترکیبی آن دو می باشد (۱۰). میکروارگانیسم ها جهت استفاده از ماکرومولکول های پلیمرهای آلی، به عنوان مواد غذایی، آنزیم های هیدرولیتیک را به خارج از سلول ترشح می کنند. این آنزیم ها پلیمرهای مولکول های بزرگ را به زیر واحد های کوچک می شکنند تا توانایی لازم برای نفوذ در غشای پلاسمایی را داشته باشند (۱). گروه های اصلی آنزیم های ترشح شده توسط باکتری، گروه های آمینو، کربوکسیل و سولفیدریل هستند که قدرت احیای فلزات از جمله Au^{3+} به Au^{0} را دارند (۱۴،۷،۴). از دیگر مواد ترشحی باکتری ها که می توانند به عنوان انتقال دهنده الکترون بین محیط و باکتری باشد ماده ای به نام هیدروکینون است. نقش این ماده در احیای فلزات بخوبی مشخص شده است (۳). از قندها نیز می توان به عنوان احیا کننده نام برد (۱۰). امروزه روش های میکروبی، جایگزین روش های صنعتی در استخراج و تجزیه مواد معدنی و همچنین تصفیه پسماندهای صنعتی هستند. چرا که منابع معدنی با خلوص بالا در حال اتمام هستند، هزینه های تولید انرژی افزایش یافته و اثرات مضر استفاده از تکنیک های قدیمی بر محیط زیست هر روز خود را بیشتر نمایان می سازد (۳). تولید نانوذرات تیتانیوم با استفاده از میکروارگانیسم ها از نظر هزینه، مصرف انرژی و ایمنی، نسبت به روش های فیزیکی و شیمیایی برتری دارد. از سوی دیگر تولید نانو ذرات در جنس، گونه و سویه های مختلف باکتریایی متغییر است. لذا هدف این تحقیق بررسی تولید نانوذرات تیتانیوم توسط ۱۰۰ سویه مختلف از لاکتوباسیل های بومی ایران به منظور شناسایی بهترین سویه های تولید کننده نانو ذرات تیتانیوم است. از آنجا که این باکتری ها از محصولات لبنی جدا شده و بی خطر می باشند، گزینه مناسبی جهت کاربرد در صنعت هستند.

مواد و روش ها

نمونه ها، انواعی از سویه های باکتریایی از خانواده لاکتوباسیل ها هستند که توسط خانم دکتر مریم تاج آبادی ابراهیمی از محصولات لبنی ایران، جدا و نگهداری شده اند. مواد شیمیایی مورد استفاده شامل تیتانیوم دی اکسید (TiO_2)، ساخت شرکت Carlo erba و محیط کشت ام - آر – اس براث، محصول شرکت Hi-media هستند. در این مطالعه از تکنیک هایی مانند اسپکتروفتومتری، پراش پرتو AFM، x و SEM بهره گرفته شده است.

کشت: برای هر سویه ۲ لوله در نظرگرفته شد و برای هر لوله ۴۰ml محیط ام - آر– اس براث با غلظت ۱/۵ برابر دستورالعمل تهیه شد. سپس به لوله اول ۲۰ ml محلول TiO_2 اضافه و به مدت نیم ساعت توسط مگنتیت استیرر هم زده شد. به لوله دوم تنها ۲۰ ml آب مقطر افزوده شد و در نهایت غلظت محیط کشت هر دو لوله برابر ۱ بود. هرسویه در ۲ لوله جدا گانه، در دمای ۳۷°C و درون انکوباتور CO_2 کشت داده شدند. لوله اول حاوی محیط کشت همراه با TiO_2 و لوله دوم بدون TiO_2 بودند. لوله دوم هم به عنوان کنترل و هم به عنوان بلانک برای لوله اول در نظر گرفته شد.

اسپکتروفتومتری : اسپکتروفتومتری در زمان های صفر، ۲۴ ، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ساعت بعد از انکوباسیون سویه ها انجام شد. ابتدا محلول هایی با رقت ۱/۵۰ (یک پنجاهم) از لوله های اول (کشت باکتری + TiO_2)، دوم (باکتری) و محیط کشت با غلظت ۱ برابر، تهیه شد. سپس طول موج های مختلف از ۳۵۰ nm – ۹۰۰ nm به نمونه تابانده و میزان جذب اندازه گیری گردید. با توجه به داده ها، نمودار جذب هر سویه، مانند شکل ۵ رسم شد. محلول لوله دوم (کشت باکتری) به عنوان بلانک برای لوله اول نیز در نظر گرفته شد.

AFM، X-ray و SEM: نمونه ها ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون، برای آزمایشات مربوطه به آزمایشگاه های سرویس دهنده فرستاده شدند.

یافته ها

در این مطالعه ۱۰۰ سویه از لاکتوباسیل های بومی ایران مورد بررسی قرار گرفتند؛ که سویه های C_6M_2 و C_6M_1 به عنوان

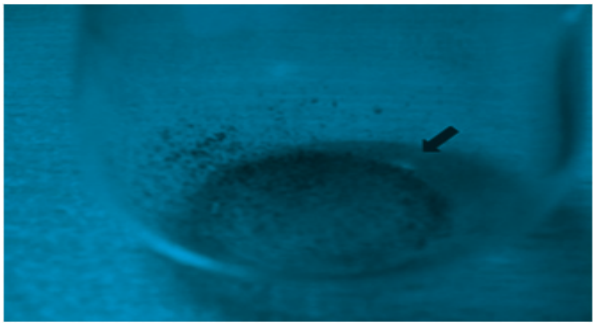
www.SID.ir

Archive of SID

سویه های برتر انتخاب شدند. تیتانیوم دی اکسیدی (TiO_2) که در اختیار لاکتوباسیل ها قرار داده شد، احیا گشته و نانو ذرات تیتانیوم شکل گرفتند. رنگ محیط کشت سویه های قادر به بیوسنتز نانوذرات Ti، از قهوه ای روشن به قهوه ای تیره تغییر یافت (شکل ۱).

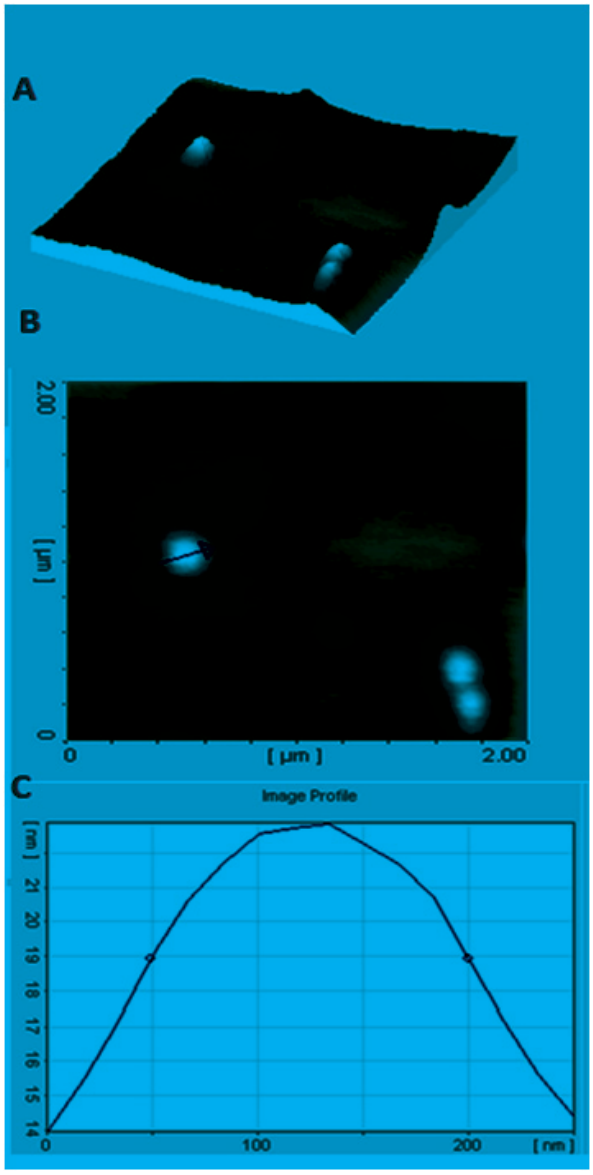
شکل۱- تغییر رنگ محلول در زمان ۰ تا ۱۲۰ ساعت پس از انکوباسیون از راست به چپ (در نوار کناری از پایین به بالا).

این تغییر رنگ در سویه هایی که توانایی بیوسنتز نانوذرات Ti را نداشتند، مشاهده نشد. تغییر رنگ در ساعت ۷۲ به خوبی مشخص بود. همچنین لوله دوم هر سویه که به عنوان کنترل در نظر گرفته شده بود، هیچ تغییر رنگی نداشت. زمانی که به محلول فرصت داده شد تا در شرایط کنترل شده خشک شود، شکل گیری ذرات سیاه رنگ تیتانیوم به شکلی قابل رویت، در آمدکه شامل مخلوطی از نانو ذرات و قطعات بالک با جلای فلزی بود (شکل۲).



شکل۲- مخلوطی از نانو ذرات و قطعات بالک با جلای فلزی.

در شکل۳، تصاویری از نانو ذرات Ti که توسط میکروسکوپ الکترونی AFM عکس برداری و با نرم افزار DME پردازش و شبیه سازی شده است را مشاهده می شود. این تصاویر از دو زاویه مایل (A) و عمود (B) گرفته شده اند و امکان تجسم شکل و ابعاد نانو ذرات را ممکن می سازند. همچنین در تصویر B، علامتی در امتداد یکی از نانو ذرات به رنگ سبز دیده می شود. نمودار سطح مقطع این علامت، در بخش C از شکل ۳، از نانو ذره مارک شده رسم گردیده، که نشان می دهد، نانو ذره مارک شده کروی و اندازه آن تقریبا ۱۵۰ nm است.

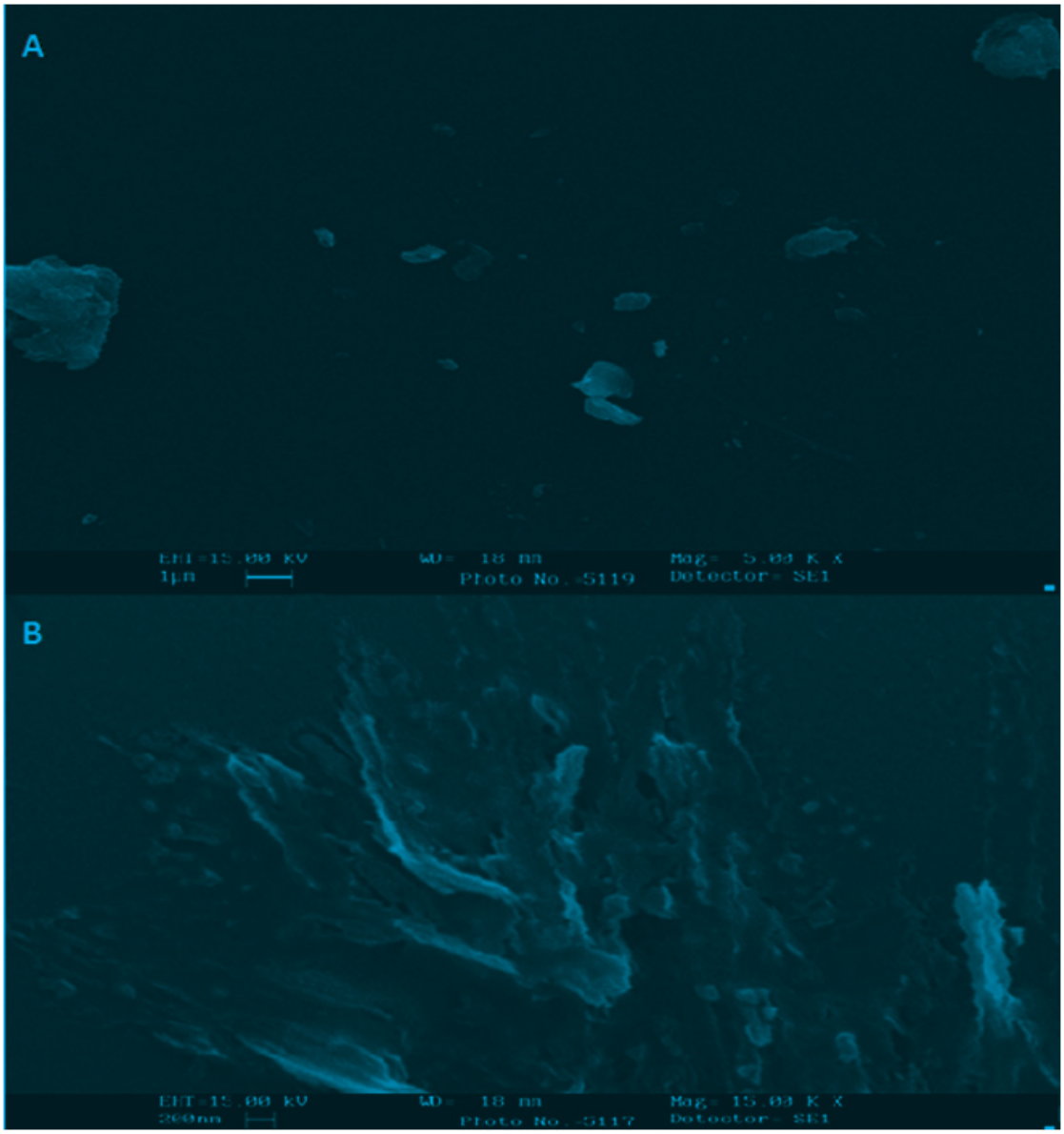


شکل۳ - عکس A از زاویه مایل و عکس B از زاویه عمود گرفته شده اند. نمودار مشخص شده در بخش C نیز نشان دهنده سطح مقطع نانوذره مارک شده در عکس B می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

در شکل ۴ دو تصویر از تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ SEM را مشاهده می شود. در تصویر A ذراتی با ابعاد متفاوت بین ۵۰nm تا ۲µm مشاهده می شود که در زمینه منتشر هستند. در شکل B نیز ذراتی با ابعاد حدود ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر به شکل بهم چسبیده و آگلوتینه وجود دارند که همگی نشانه هایی از حضور ذراتی در ابعاد نانومتری هستند. تا این مرحله وجود نانو ذرات به اثبات رسیده است.



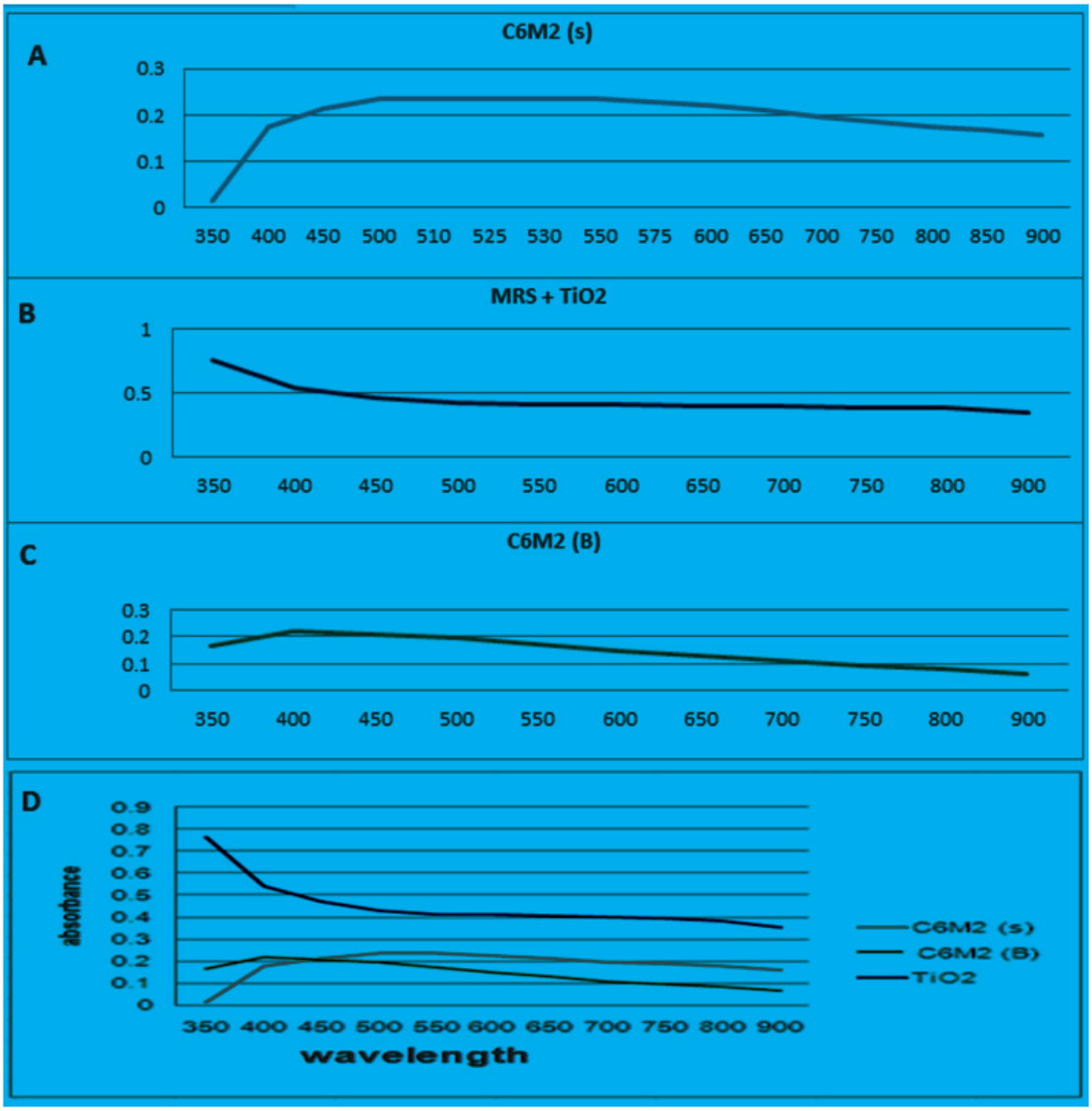
شکل۴- تصویر A ذراتی با ابعاد متفاوت بین ۵۰nm تا ۲µm و تصویر B، ذراتی آگلوتینه با ابعاد حدود ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانو متر را نشان می دهند.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

آنالیز UV برای شناسایی مواد و تعیین غلظت مواد موجود در محلول به کار می رود. هر محلول الگوی جذب ویژه ای دارد (۱۲،۲) (شکل ۵)، نمودار های جذب Blank (فقط باکتری)، TiO_2 و Sample (مخلوط باکتری و TiO_2) را برای سویه ی C_6M_2 نشان می دهد. طی ۷۲ ساعت، میزان جذب TiO_2، Blank و Sample بررسی شد و مجموع دو نمودار TiO_2 و Blank ،متفاوت از نمودار Sample بود، که این تفاوت حاکی از حضور ماده ای متمایز از واکنش دهنده ها ست و این تغییر بدلیل وجود فلز تیتانیوم می باشد.



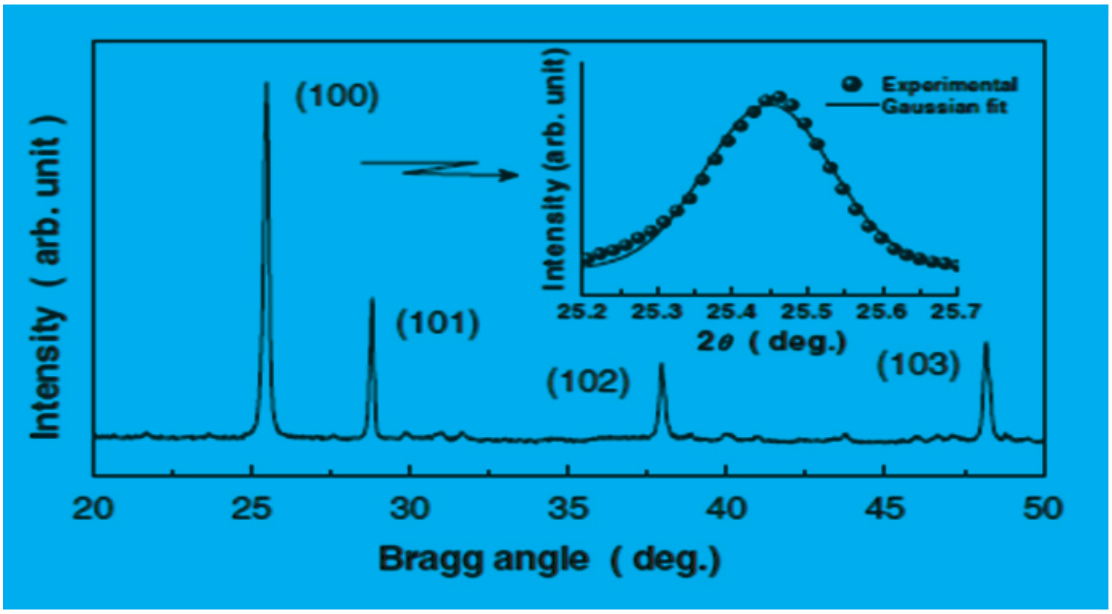
شکل ۵ - در بخش های A، B و C به ترتیب نمودار های جذب Tio_2، Sample و Blank مشخص شده است و نمودار بخش D نیز مجموع هر سه نمودار، A، B، C و را جهت مقایسه نشان می دهد.

www.SID.ir

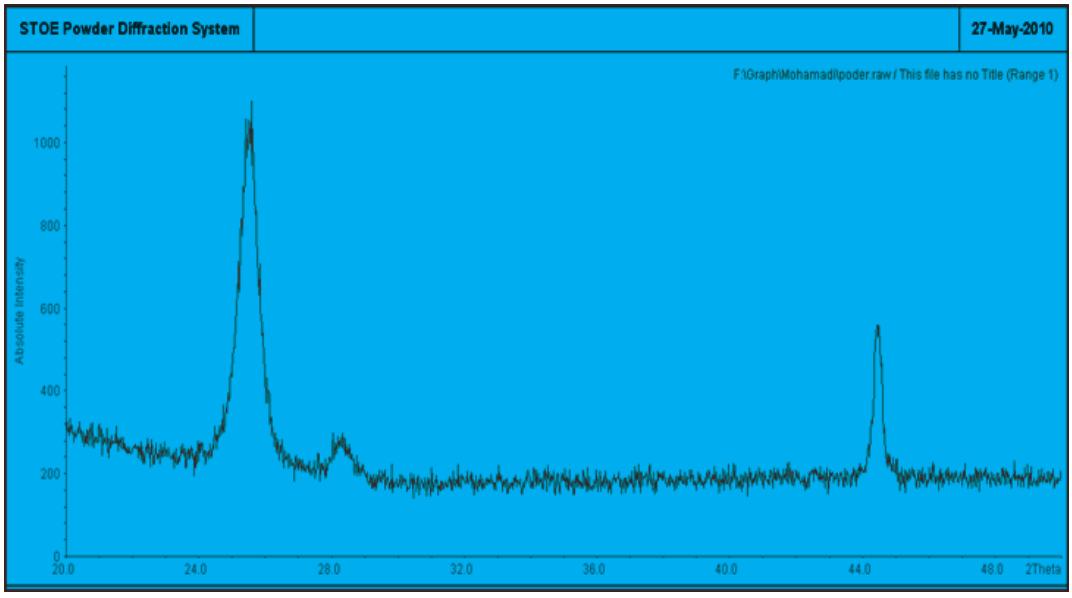
Archive of SID

در شکل ۶، نمودارهای پراش پرتو X مورد انتظار (A) و اندازه گیری شده (B) را از سوپرناتانت سویه $C_{\epsilon}M_{\gamma}$ (S) نمایش داد شده است. پراش پرتو X نیز یکی از روش های تشخیص عناصر می باشد. همان طور که از نمودار پیداست، قله های بدست آمده متعلق به الگوی جذب تیتانیوم بوده و مطابق الگوی جذب مورد انتظار از مقالات مرجع استخراج شده می باشد (۱۰). با توجه به این داده ها می توان استنباط کرد نانو ذرات تیتانیوم در محیط حضور دارند.

A



B



شکل۶ - بخش A نمودار الگوی پراش پرتو X مرجع را نشان می دهد که مطابق نمودار بدست آمده در بخش B است.نمودار B الگوی پراش پرتو X سوپرناتانت سویه $C_{\epsilon}M_{\gamma}$ می باشد.این تطابق حاکی از حضور تیتانیوم در نمونه X-Ray است.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه گیری

پس از حصول اطمینان از سنتز نانو ذرات تیتانیوم توسط $C_{\varepsilon}M_{۲}$، به بررسی این سویه موفق پرداخته شد. $C_{\varepsilon}M_{۴}$ یک لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از محصولات لبنی بومی ایران است که توان سنتز این نانوذرات را داراست. پس از بررسی های آماری و محاسبه ی راندمان از کلیه سویه ها، مشخص شد که بین سویه های نمونه ی آزمایش، تنها پلانتاروم ها توان بیوسنتز نانو ذرات تیتانیوم را دارند. در جدول ۱، اسامی و مشخصه های سویه های منتخب بیان شده است. پس از بررسی و مطالعه ساز وکار مولکولی بیوسنتز نانوذرات توسط باکتری ها، دلیل احیای اکسیدهای فلزی توسط باکتری ها، تحت عنوان فرایندی دفاعی که احتمالا به دلیل فقدان سوپراکسید دیسموتاز در این سویه است، تفسیر می گردد.

جدول۱- اسامی و مشخصه ی سویه های منتخب حاضر در آزمایش.

Lactobacillus brevisGQ423768	***Lactobacillus brevisGQ423757***
Lactobacillus plantarumGQ423760	***Lactobacillus plantarumGQ423764***
Lactobacillus pentosusGQ423764	***Lactobacillus plantarumGQ423761***
Lactobacillus plantarumGQ423755	***Lactobacillus brevisGQ423758***
Lactobacillus brevisGQ423766	***Lactobacillus caseiGQ423759***

تشکر و قدردانی

از دکتر فرهمند و مهندس معصومه سجودی که در بخش های مختلف طرح ما را یاری رساندند، قدردانی می گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

(۱)- دکتر رحیمی م ک، دکتر اطهری ع. میکروب شناسی پزشکی جاوتز. ویراش بیست و چهارم . زمستان ۱۳۸۷. انتشارات آییژ.

(۲)- شاه میرزایی ح، پازوکی م. مروری بر تولید نانوذرات با استفاده از میکروارگانیسم ها . ماهنامه فناوری نانو. سال ششم شماره ۱۱۹.

(3)-Durán N, Marcato PD, Alves OL, Souza GIH, Esposito E. Mechanistic Aspects of Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Several Fusarium Oxysporum Strains. Journal of nanobiotechnology, 2005; 3:8.

(4)-He S, Guo Z, Zhang Y, Zhang S, Wang J, GU N. Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using the Bacteria Rhodopseudomonas Capsulate. Materials Letters, 2007; 61.

(5)-Joerger TK, Joerger R, Olsson E, Granqvist CG. Bacteria as Workers in the Living Factory: Metal-Accumulating Bacteria and their Potential for Materials Science. Trends in Biotechnology, 2001; 19 (1):15-20.

(6)-Klaus T, Joerger R, Olsson E, Claes-Go¨ ran Granqvist. Silver-Based Crystalline Nanoparticles, Microbial Fabricated. PNAS; 1999; 96 (24): 13611-13614.

(7)-Law N, Ansari S, Livens FR, Renshaw JC, Lloyd JR. Formation of Nanoscale Elemental Silver Particles via Enzymatic Reduction by Geobacter sulfurreducens. Appl Environ Microbiol Apr. 2008; 74 (22): 7090-7093.

(8)-Mandal D,. Bolander ME, Mukhopadhyay D,Sarkar G and Mukherjee P. The use of Microorganisms for the Formation of Metal Nanoparticles and Their Application. Appl Microbiol Biotechnol, 2006; 69 (5): 485-92.

(9)-Minaeian S, Shahverdi A R, Nohi A S, Shahverdi HR. Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles by some Bacteria. J Sci I AU, 2008;17 (66): 1-4.

(10)-Nair B, Pradeep T. Coalescence of Nanoclusters and Formation of Submicron Crystallites Assisted by Lactobacillus Strains.Cryst Growth Des, 2002; 2 (4): 293-298.

(11)-Prasad K, Jha AK, Kulkarni AR. Lactobacillus Assisted Synthesis of Titanium Nanoparticles. NanoPerspectives. 10.1007/s11671-007-9060-x.

(12)-Sadowski Z, Maliszewska IH, Grochowalska B, polowczyk I, Kozlecki T. Synthesis of Silver Nanoparticles Using Microorganisms. Materials Science-Poland, 2008 ; 26 (2):419-424.

(13)-Salfuddin N, Wong CW, Nur Yasumir A A A. Rapid Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Culture Supernatant of Bacteria with Microwave Irradiation.E-Journal of Chemistry, 2009, 6 (1): 61-70.

(14)- Sastry M, Ahmad A, Islam Khan, Kumar R. Biosynthesis of Metal Nanoparticles Using Fungi and Actinomycete. Current Science, 2003; 85 (2): 162-170.

(15)- Soloviev M. Nanobiotechnology Today: Focus on Nanoparticles. Journal of Nanobiotechnology, 2007; 5 (11): 1-3.

www.SID.ir