جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز 1390، دوره سوم، شماره دهم، صفحه 26-23

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

محمدحسن غلامی شعبانی[1]، افشین ایمانی[1]، مهدی رزاقی ابیانه[3]، غلامحسین ریاضی[4]، محسن چیانی[5]، سمانه خادمی[5]، محمد چمنی[2]، عظیم اکبرزاده[5]

1. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران،ایران
2. گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران،ایران
3. بخش قارچ شناسی،انستیتو پاستور ایران، تهران،ایران
4. بخش بیوفیزیک- بیوشیمی، دانشگاه تهران، تهران،ایران
5. بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران،ایران

نویسنده مسؤول: دکتر عظیم اکبرزاده. بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران،ایران.
Azimakbarzadeh@pasteur.ac.ir

دریافت: 90/7/15 پذیرش: 90/9/13

چکیده

زمینه و هدف: اصلی ترین هدف نانوفناوری توسعه روش هایی است که بدون استفاده از مواد آلاینده و سمی، با کمترین هزینه و ضایعات توانایی تولید نانوساختارهای 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* IRAN 81C با حداکثر ابعاد 50 نانومتر می باشد.

وش بررسی: پس از بهینه سازی شرایط رشد در محیط کشت MGYP حاوی گلوگز 10 گرم بر لیتر، پپتون 5 گرم بر لیتر، عصاره مخمر 3 گرم بر لیتر و عصاره مالت 3 گرم بر لیتر، توده سلولی قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم تولید گردید. پس از تولید نانوذرات نقره در محلول نیترات نقره با روش های FTIR، UV-visible spectrophotometer و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نانو ذرات تولید شده مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج این پژوهش نشان داد توده سلولی قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم IRAN 81 در غلظت 3-10 مولار یون های نقره قادر به تولید نانوذرات نقره به صورت برون سلولی می باشند. همچنین مشخص شد که پس از فیلتر کردن توده سلولی قارچ، مایع رویی توانایی سنتز نانوذرات نقره را دارد که خود نشان دهنده ترشح برخی پروتیین ها و آنزیم ها توسط قارچ به محیط است.

نتیجه‌گیری: به دلیل ویژگی های منحصر به فرد فیزیکی و شیمیایی نانوذرات نقره با اندازه ذره ای حداکثر 50 نانومتر به وسیله قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم*، تولید آن در حد صنعتی و بررسی کاربردی آن پیشنهاد می گردد.

واژه‌های کلیدی: برون سلولی، نانوذرات نقره، *فوزاریوم اگزیسپوروم*، مقیاس آزمایشگاهی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

با گذر از میکروذرات به نانوذرات، با تغییر برخی از خواص فیزیکی روبرو می شویم، که دو مورد مهم آنها عبارتند از: افزایش نسبت مساحت سطح به حجم و ورود اندازه ذره به قلمرو اثرات کوانتومی. افزایش نسبت مساحت سطح به حجم که به تدریج با کاهش اندازه ذره رخ می دهد، باعث غلبه یافتن رفتار اتم های واقع در سطح ذره به رفتار اتم های درونی می شود. این پدیده بر خصوصیات ذره در حالت انزوا و بر تعاملات آن با دیگر مواد اثر می گذارد. به محض آن که ذرات به اندازه کافی کوچک شوند، شروع به بروز رفتار مکانیک کوانتومی می کنند. خواص نقاط کوانتومی مثالی از این دست است. این نقاط گاهی اتم های مصنوعی نامیده می شوند، چرا که الکترون های آزاد آن ها مشابه الکترون های محبوس در اتم ها، حالات گسسته و مجازی از انرژی را اشغال می کنند.

به طور کلی با توجه به خواص منحصر به فرد نانوذرات، به کارگیری روشهای تولیدی مناسب به منظور دستیابی به نانوذرات با خواص مطلوب، هزینه کمتر و محافظ محیط زیست از چالشهای مهم در زمینه فناوری نانو می باشد. در سال های اخیر استفاده از میکروارگانیسم ها در تولید نانوذرات بسیار مورد توجه قرار گرفته است، تولید نانوذرات توسط میکروارگانیسم ها می تواند به صورت داخل سلولی و خارج سلولی باشد (1و2).

پژوهش های مختلف نشان داده است که میکرو ارگانیسم هایی مانند باکتری ها، مخمر ها، قارچ ها و گیاهان نقش مهمی در دفع فلزات سمی از طریق احیای یون های فلزی دارند. سنتز زیستی نانو مواد توسط ارگانیسم های یوکاریوتی مانند قارچ ها، در تولید نانوذرات طلا (3) و نقره (4) به صورت درون سلولی در سلول های قارچ *Verticillium* تأیید شده است. گونه های مختلف قارچ یاد شده در مجاور یون های تتراکلرواورات طلا ($AuCl^-_4$) و نقره (Ag^+) قادر به تولید نانوذراتی با ابعاد 5 تا 50 نانومتر پس از 72 ساعت می باشند (5). قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم قادر به تولید نانوذرات طلا به صورت برون سلولی می باشد (6). همچنین این قارچ قادر به تولید نانوذرات نقره به صورت برون سلولی و بسیار پایدار است (7). تولید برون سلولی نانوذرات، باعث کاهش هزینه های استخراج و بررسی آسان آنها می شود. هدف از این پژوهش سنتز برون سلولی نانوذرات نقره توسط قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* IRAN 81C می باشد.

روش بررسی

قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* شماره IRAN 81C (بانک میکروبی مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی- ایران) تهیه گردید. ابتدا قارچ در محیط سابرو دکستروز آگار (SDA شرکت مرک آلمان) به مدت 5 روز در 28°C انکوبه گردید. برای ایجاد توده سلولی، قارچ از محیط SDA به محیط مایع حاوی 3 گرم بر لیتر عصاره مخمر، 3 گرم بر لیتر عصاره مالت، 5 گرم بر لیتر پپتون و 10 گرم بر لیتر گلوکز (MGYP) منتقل گردید و سپس در حرارت 1± 26 با دور 200 به مدت 96 ساعت انکوبه شد. پس از 96 ساعت، توده سلولی قارچ فیلتر و 3 بار با آب مقطر استریل شسته شد. برای احیای یون های نقره 5 گرم از توده سلولی قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* به 50 میلی لیتر محلول نیترات نقره (مرک) 10^{-3} مولار در شرایط 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 طیف سنج فرابنفش-مرئی(شیمادزو مدل 1601) اندازه گیری شد.

آنالیز FTIR (Fourier transform infrared) پروتیین ها که بیانگر تغییرات ساختار فضایی در ساختار دوم پروتیین است، به منظور بررسی مکانیزم احتمالی احیای یون های نقره انجام شد. اندازه نانوذرات نقره و همچنین شکل و ابعاد آنها توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM-EM208 philips) مورد بررسی قرار گرفت.

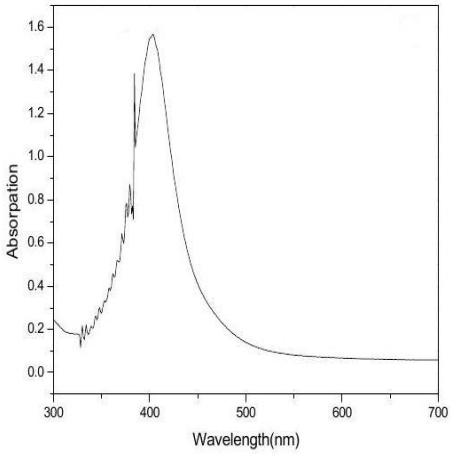
یافته ها

قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* شماره IRAN 81C (بانک میکروبی مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی- ایران) تهیه گردید. ابتدا قارچ در محیط سابرو دکستروز آگار (SDA شرکت مرک آلمان) به مدت 5 روز در 28°C انکوبه گردید. برای ایجاد توده سلولی، قارچ از محیط SDA به محیط مایع حاوی 3 گرم بر لیتر عصاره مخمر، 3 گرم بر لیتر عصاره مالت، 5 گرم بر لیتر پپتون و 10 گرم بر لیتر گلوکز (MGYP) منتقل گردید و سپس در حرارت 1± 26 با دور 200 به مدت 96 ساعت انکوبه شد. پس از 96 ساعت، توده سلولی قارچ فیلتر و 3 بار با آب مقطر استریل شسته شد.

برای احیای یون های نقره 5 گرم از توده سلولی قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* به 50 میلی لیتر محلول نیترات نقره (مرک) 10^{-3} مولار در شرایط استریل افزوده شد. به منظور جلوگیری از اثر

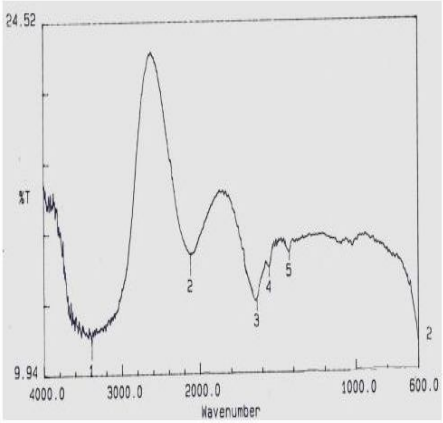
جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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 طیف سنج فرابنفش-مرئی(شیمادزو مدل 1601) اندازه گیری شد.



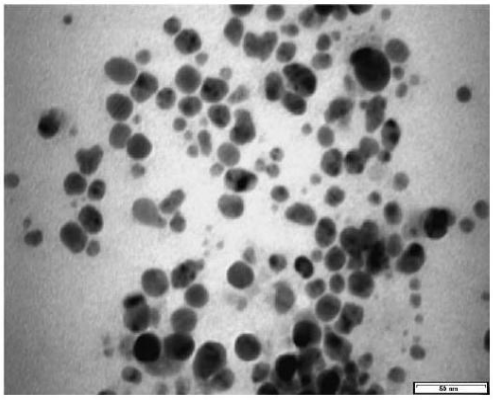
شکل 1. باندهای جذبی UV-vis نانوذرات نقره را نشان می دهد.

همانطور که مشخص است پیک جذبی در محدوده 400 نانومتر دیده می‌شود. این پیک جذب نشان دهنده احیای یون های نقره به نانوذرات نقره توسط قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم می باشد.



شکل 2. باند FTIR ار نانو ذرات نقره تولید شده توسط *فوزاریوم اگزیسپوروم*.

همان طور که مشاهده می شود محتملترین مکانیسم بیوسنتز نانوذرات فلزی به صورت خارج سلولی، ترشح یکسری پروتیین و آنزیم توسط میکروارگانیسم و احیاء یون های فلزی توسط آن ها می باشد.



شکل 3. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

تصویر TEM ثبت شده از نانوذرات نقره تولید شده بر روی یک صفحه کربنی جوشانده شده از مس نشان داد که این ذرات به صورت جدا از یکدیگر و با اندازه تقریبی 50 نانومتر تشکیل شده اند. آنالیز FTIR (Fourier transform infrared) پروتیین ها که بیانگر تغییرات ساختار فضایی در ساختار دوم پروتیین است، به منظور بررسی مکانیزم احتمالی احیای یون های نقره انجام شد. اندازه نانوذرات نقره و همچنین شکل و ابعاد آنها توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM-EM208 philips) مورد بررسی قرار گرفت.

بحث

Klaus و همکارانش نشان دادند که مجاور ساختن باکتری *Pseudomonas stutzeri AG295* جدا شده از یک معدن نقره در یک محلول غلیظ از نیترات نقره در اندازه مشخص، سبب تولید نانوذرات نقره در فضای پری پلاسمی باکتری می شود (8،9).در یک نگاه کلی، نتایج به دست آمده حاکی از آن است که قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* توانایی تولید خارج سلولی نانوذرات نقره را دارد. پیدایش رنگ قهوه ای در محلول حاوی توده سلولی قارچ، یک نشانه واضح از تشکیل نانوذرات نقره در محلول واکنش و همچنین ناشی از ارتعاشات پلاسمون سطحی در نانوذرات می باشد (۱۰،۱۱). با فیلتر کردن توده سلولی قارچ، مشاهده شد که توده سلولی هنوز هم زرد رنگ است، در صورتی که محلول حاوی نانوذرات نقره به صورت قهوه ای مشاهده گردید. این نشان می دهد که احیای یون های نقره به صورت خارج سلولی بوده که دلیل آن می تواند رها شدن برخی از پروتیین های قارچ در محلول واکنش باشد. قابل توجه است که نانوذرات نقره تولید شده توسط قارچ مذکور از پایداری

زیادی برخوردارند که شاید ناشی از تثبیت نانوذرات نقره توسط پروتیین ها باشد (9). همچنین 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 410 نانومتر می باشد (12) که نشان دهنده حضور نانوذرات نقره در محلول رویی (سوپرناتانت) است. نتایج آنالیز تصویر TEM، نانوذراتی با ابعاد 50 نانومتر را نشان می دهد. این نانوذرات نقره از لحاظ مورفولوژی دارای اشکال نسبتاً متفاوتی بودند. همان طور که در تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری مشاهده می شود، نانوذرات نقره ای که حتی به صورت تجمعی تشکیل شده، در تماس مستقیم با هم نیستند، که این مسأله می تواند ناشی از یک پوشش پروتیینی باشد (9). نانوذرات تولید شده به صورت زیستی می توانند در زمینه های مختلفی همچون اپتیک غیر خطی، پوشش انتخابی برای جذب انرژی خورشیدی، مواد بین لایه ای برای باطری های الکتریکی، گیرنده های نوری، به عنوان کاتالیزور در واکنش های شیمیایی و زیستی ، به عنوان عوامل ضد باکتریایی و قارچی کاربرد های زیادی داشته باشند(13).

هدف اصلی ما از این پژوهش، تولید نانوذرات نقره به صورت برون سلولی برای بررسی آسان تر و ایجاد 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 باقیمانده های سمی آلی در سطح، ایجاد حداقل ضایعات و مواد غیر مصرفی در فرایند تولید، حجم بالای تولید و تکرارپذیری، ارزشمندتر است. به دلیل کاربرد های گسترده و ویژگی های ارزنده نانوذرات در علم نانوبیوتکنولوژی، این مطالعه می تواند زمینه ساز مطالعات فراگیر در استفاده از روش های زیستی در تولید برون سلولی نانوذرات 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 50 نانونتر می باشد. نانوذرات نقره تولید شده توسط این قارچ، به صورت برون سلولی بوده که توسط پروتیین ها و آنزیم هایی که قارچ به محیط ترشح می کند صورت می گیرد و نیاز به استخراج نداشته و بدون داشتن هزینه و مشکلات ناشی از استخراج، می توانند مورد استفاده قرار گیرند.

References

1. Simkiss K, Wilbur KM. *Biomineralization: Cell Biology and Mineral Deposition.* Academic Press. 1989; 337.
2. Mann S. *Biomimetic Materials Chemistry*. VCH. 1996;383.
3. Mukherjee P, Ahmad A, Mondol D, Senapati S, Sainkar SR, Khan ML, etal. *Bioreduction of AuCl4 - ions by the fungus, Verticillium Sp. And surface trapping of the gold nanoparticles formed*. Angew Chem Int Ed. 2001; 40:3585-3588.
4. Mukherjee P, Ahmad A, Mondol D, Senapati S, Sainkar SR, Khan ML, etal. *Fungus mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelia matrix*: *A novel biological approach to nanoparticle synthesis.* Nano Lett. 2001; 1:515-519.
5. Sastry M, Ahmad A, Islam NI , Kumar R. *Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and Actinomycete*. Current Sci. 2003; 85:162-170.
6. Sastry M, Patil V, Sainkar SR. *Electrostatically controlled diffusion of evaporated fatty amine films*. J Phys Chem. 1998; 102:1404-1410.
7. Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mondol D, Islam Khan M, Kumar R , Sastry M. *Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus Fusarium oxysporum*. Biointerfaces. 2003; 28:313-318.
8. Klaus T, Joerger R, Olsson E, Granqvist CG. *Lactobacillus assisted synthesis of titanium nano particles.* Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1999; 96:13611.
9. Joerger R, Klaus T, Granqvist CG. *Biologically produced silver-carbon composite materials for optically functional thin-film coatings*. Adv Mater. 2000; 12:407-409.
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 SR. *Electrostatically controlled diffusion of carboxylic acid derivatized silver colloidal particles in thermally evaporated fatty amine films*. J. Phys. Chem. 1998; 102:1404-1408.
12. Duran N, Marcato PD, Alves OL, Souza G , 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. P*rotein:Colloid Conjugates for Surface Enhanced Raman Scattering: Stability and Control of Protein Orientation*. Phys.Chem B. 1998; 102(47):9404-9413.