

تولید زیستی نانوذرات نقره با استفاده از قارچ پنی سیلیوم بروی کامپاکتوم جداسازی شده از معدن سرب و روی زنجان

بهروز محمدی¹، مجتبی صلوتی^{2*}، علی هانیلو³

- 1- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران
2- دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران
3- دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

*زنجان، کد پستی 45156-58145

saloutim@yahoo.com

(دریافت مقاله: 90/11/10، پذیرش: 91/9/28)

چکیده - در روش های بیولوژیک از میکروارگانیسم ها مانند باکتری ها، قارچ ها، اکتینومیست ها و مخمرها برای تولید نانوذرات فلزی استفاده می شود. قارچ ها با ترشح آنزیم ها به مقدار زیاد، انتخاب مناسبی برای ساخت زیستی نانوذرات نقره است. هدف این پژوهش، تولید زیستی نانوذرات نقره به وسیله قارچ های جنس پنی سیلیوم جدا شده از معدن سرب و روی زنجان است. پس از کشت اولیه، رشد کلونی ها و جداسازی قارچ های جنس پنی سیلیوم، 15 گرم از بیومس قارچی در محلول حاوی نیترات نقره 1 میلی مولار، 72 ساعت انکوبه شد. تولید نانوذرات نقره با استفاده از اسپکتروفتومتری UV-vis، آزمایش پراش اشعه ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) بررسی شد. بین 16 نوع قارچ جدا شده، 6 نوع قارچ پنی سیلیوم تشخیص داده شد که از بین آن ها تنها قارچ پنی سیلیوم بروی کامپاکتوم (*Penicillium brevicompactum*) توانایی ساخت نانوذرات نقره را داشت. تغییر رنگ محلول های واکنش، از بی رنگ به قهوه ای مایل به زرد، وجود بیشینه جذب در بازه طول موجی 406-425 نانومتر و ظهور پیک در نقاط (111)، (200)، (220) و (311) در روش پراش اشعه X، تولید نانوذرات نقره را تأیید کردند. در نهایت، تصاویر TEM نشان دادند که نانوذرات نقره بیشتر در خارج سلول در سطح میسلیم ها، در اندازه ی 50-100 نانومتر و به شکل کروی تولید شده است. آزمایش های اسلاید کالچر، رشد روی آگار مخمر czapek و آگار کراتین سوکروز، نشان دادند که این قارچ، پنی سیلیوم بروی کامپاکتوم است.

کلید واژگان: نانوذرات نقره، تولید زیستی، قارچ پنی سیلیوم بروی کامپاکتوم.

1- مقدمه

نانوذرات نقره در زمینه های مختلف علوم پزشکی، صنایع، کشاورزی، آرایشی و بهداشتی کاربرد فراوانی دارد [1]. در علوم پزشکی و بهداشت، استفاده از نانوذرات نقره به دلیل خاصیت ضد میکروبی آنها، بسیار مورد توجه است [2]. هم اکنون نانوذرات به دو روش فیزیکی و شیمیایی تولید می شوند. روش های فیزیکی و شیمیایی، افزون بر گران بودن، با آلودگی های زیست محیطی همراه است. تولید زیستی نانوذرات به خاطر سازگاری با محیط زیست و استفاده از تکنولوژی سبز، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این روش از گیاهان و میکروارگانیسم ها مانند باکتری ها، قارچ ها، مخمرها و اکتینومیسیت ها برای تولید نانوذرات استفاده می شود. هنگامی که میکروارگانیسم ها در تماس با نمک یون های فلزی قرار می گیرند، این مواد را با سازوکار کاتالیزتی احیا کرده و نانوذرات را به صورت خارج سلولی و داخل سلولی تولید می کنند. سازوکار تولید نانوذرات در میکروارگانیسم های مختلف متفاوت است [3]. در میان میکروارگانیسم ها، باکتری ها و قارچ ها انتخاب مناسبی برای تولید نانوذرات نقره محسوب می شوند ولی قارچ ها به خاطر توانایی تولید مقدار زیادی متابولیت و آنزیم های احیاکننده، همچنین به دلیل کشت ساده و ارزان در مقیاس آزمایشگاهی و صنعتی، بی خطر بودن برای محیط زیست و توانایی احیا یک یا چند یون فلزی، به باکتری ها ترجیح داده می شوند [4].

پنی سیلیوم ها یکی از فراوان ترین قارچ های ساپروفیت موجود در خاک می باشند. قارچ های

ساپروفیت روی خاک زندگی می کنند و گروه بزرگی از قارچ ها را شامل می شوند [5]. در سال 2009، کتیرسان و همکارانش به وسیله ی پنی سیلیوم فلوتانوم (*Penicillium fellutanum*)، نانوذرات نقره را به شکل کروی و در اندازه ی 2 تا 5 نانومتر تولید کردند [6]. در سال 2010، ناوین و همکارانش، نانوذرات نقره را به روش خارج سلولی در اندازه ی 52 تا 104 نانومتر به وسیله ی گونه ای از قارچ پنی سیلیوم تولید کردند [7]. بیشتر پژوهش ها روی قارچ های ساپروفیت خاک های سطحی و زمین های کشاورزی انجام شده است و شواهد کمتری در مورد قارچ های جداسازی شده از معادن وجود دارد [6-7]. به نظر می رسد استرس ناشی از فلزهای موجود در معادن می تواند در تولید متابولیت ها و آنزیم های قارچ ها مؤثر باشد. بر اساس شواهد و گزارش کارشناسان در کنار عناصر اصلی در معادن سرب و روی زنجان، مقداری عنصر نقره نیز وجود دارد که باعث می شود میکروارگانیسم های موجود در این معادن بتوانند به استرس فلزی ایجاد شده با فلز نقره، مقاوم و قادر به بقا و تولید آنزیم بیشتر در محیط های حاوی نیترات نقره شوند. هدف این پژوهش، تولید زیستی نانوذرات نقره به وسیله ی قارچ های پنی سیلیوم جدا شده از معدن سرب و روی زنجان است.

2- مواد و روش ها

2-1- مواد و محیط های کشت استفاده شده

همه ی مواد و محیط های کشت استفاده شده شامل سابرو دکستروز آگار (SDA)، پتیتو دکستروز آگار (PDA)،

2-5- تولید زیستی نانوذرات نقره

15 گرم از هر گونه بیومس قارچی پنی سیلیوم جداسازی شده به 100 میلی لیتر محلول حاوی نیترات نقره 1 میلی مولار اضافه شد. pH محیط 6/5 تنظیم شد و محلول واکنش همانند مرحله قبل در لرزاننده انکوباتور به مدت 72 ساعت انکوبه شد [9].

2-6- بررسی و ارزیابی تولید نانوذرات

برای بررسی تولید نانوذرات نقره از مشاهده تغییر رنگ محلول از بی رنگ به قهوه ای مایل به زرد [7 - 9] و اسپکتروفتومتری UV-vis (Shimadzu, UV Pharma spec 1700)، قبل و بعد از لیز سلول های قارچ در بازه ی طول موجی 350 تا 700 نانومتر استفاده شد. برای تأیید کریستالی بودن نانوذرات نقره تولید شده از روش پراش اشعه ی ایکس (XRD, Philips, PW 1800) استفاده شد؛ بنابراین بیومس قارچی 24 ساعت در 60 درجه ی سانتی گراد خشک شد و سپس پودر به دست آمده بررسی شد. در نهایت برای تعیین اندازه، شکل و محل تولید (داخل سلولی یا خارج سلولی) نانوذرات نقره از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM, Philips, EM 208S) استفاده شد. برش های نازکی از بیومس قارچی انکوبه شده در محلول نیترات نقره طبق روش مورالی و همکارانش [10] با اندکی اصلاحات، تهیه و پس از رنگ آمیزی بررسی شد. 1 میلی لیتر از بیومس قارچی بعد از تثبیت اولیه در گلو تار آلدئید 2/5 درصد و تثبیت ثانویه در تترواکسید اسمیوم و شست و شوهای لازم با بافر فسفات، با غلظت های متفاوتی از اتانول آب گیری شد. سپس نمونه ها سه بار و هر بار 15-20 دقیقه در نسبت های مختلف اکسید پروپیلن و رزین (3:1، 1:1 و 1:3) و سرانجام رزین خالص به مدت

عصاره ی مغز و قلب (BHI)، عصاره ی مالت آگار (MEA)، نوترینت آگار (NA) و نیترات نقره (AgNO_3) از شرکت سیگما خریداری شدند.

2-2- نمونه برداری از خاک معدن سرب و روی زنجان

نمونه های خاک با قاشق استریل از سه نقطه ی مختلف از معدن سرب و روی زنجان از عمق 3 تا 5 سانتی متری خاک تهیه و در ظروف پلاستیکی استریل حمل و پس از انتقال به آزمایشگاه، در دمای 4 درجه ی سانتی گراد نگهداری شدند. از نمونه های خاک، رقت 10^{-3} در آب مقطر تهیه و در محیط های کشت SDA، PDA، BHI، MEA و NA در 28 درجه سانتی گراد کشت داده شد. پس از 72 ساعت، قارچ ها جداسازی شدند [7].

2-3- جداسازی پنی سیلیوم ها

از بین قارچ های جدا شده با توجه به رنگ سطح و پشت کلونی و آرایش فیالیدها در روش اسلاید کالچر، گونه های مختلف قارچ پنی سیلیوم جداسازی شد [7].

2-4- تهیه ی بیومس قارچی

برای تهیه ی بیومس، کلونی های پنی سیلیوم جداسازی شده به طور جداگانه در 100 میلی لیتر محیط MYPG براث کشت داده شدند و در لرزاننده انکوباتور با حرکت ثابت 150 دور در دقیقه در 28 درجه سانتی گراد، 96 ساعت انکوبه شدند. بیومس های به دست آمده در سه مرحله سانتریفیوژ (3500 دور در دقیقه، 20 دقیقه، 10 درجه سانتی گراد) و با آب مقطر دیونیزه شست و شو داده شدند [8].



شکل 1 بیومس قارچ پنی سیلیوم قبل (الف) و پس از (ب) قرار گرفتن در معرض محلول نیترات نقره. تغییر رنگ محلول واکنش از بی رنگ به قهوه ای مایل به زرد، نشان دهنده تولید نانوذرات نقره است.

3-3- نتایج به دست آمده از اسپکتروفتومتری UV-vis

نتایج به دست آمده از اسپکتروفتومتری UV-vis سلول لیز شده، نشان دهنده یک پیک جذبی در بازه طول موجی 406-425 نانومتر بود. پهن شدن پیک جذبی نشان می دهد که نانوذرات نقره تولید شده، طیفی از اندازه را دارند و مونودیسپرس نیستند (شکل 2، منحنی 1)؛ همچنین محلول قارچی قبل از لیز سلول باکتری نیز اسکن شد که نتیجه آن در شکل 2 (منحنی 2) آمده شده است.

یک شبانه روز قرار داده شدند. بعد از قالب گیری، برش های بسیار نازکی از نمونه ها با دستگاه اولترامیکروتوم تهیه روی توری مسی مخصوص قرار داده شدند. در آخرین مرحله، برش ها با یورانیل استات 2 درصد و سیترات سرب 2 درصد، رنگ آمیزی و تصاویر با میکروسکوپ الکترونی عبوری تهیه شد.

7-2- شناسایی گونه پنی سیلیوم جداسازی شده

پس از شناسایی قارچی که توانایی تولید نانوذرات نقره را داشت، قارچ جداسازی شده در محیط های CYA (Czapek yeast agar) و کراتینین سوکروز آگار کشت داده شد تا با توجه به خصوصیات رشد، تا حد گونه شناسایی شود.

3- یافته ها

1-3- نتایج به دست آمده از کشت خاک

پس از فرایند ایزولاسیون، 16 نوع قارچ جداسازی شد که با انجام روش اسلاید کالچر، 6 گونه از آن ها، قارچ پنی سیلیوم تشخیص داده شد.

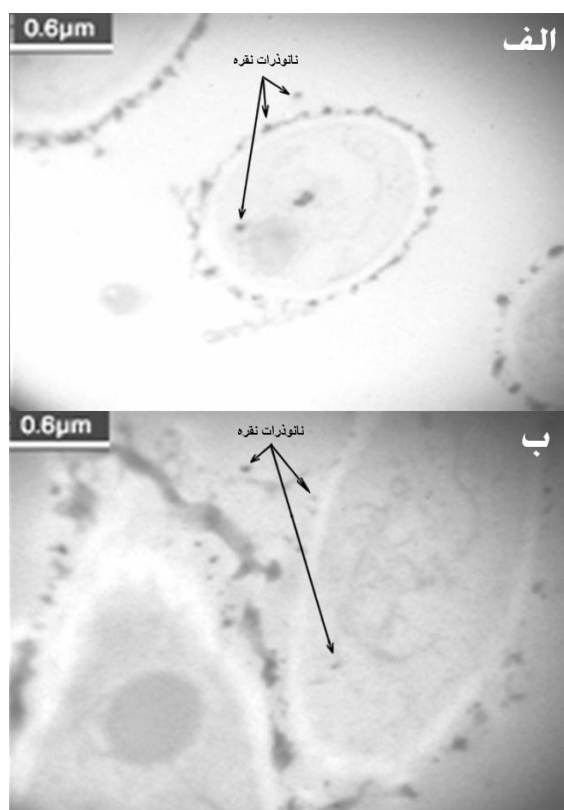
2-3- بررسی تولید نانوذرات نقره با مشاهده ی

چشمی

پس از تهیه ی بیومس از قارچ های پنی سیلیوم جداسازی شده و قرار دادن آن ها در محلول 1 میلی مولار نیترات نقره به مدت 72 ساعت، تنها در محلول واکنش یک گونه از پنی سیلیوم ها تغییر رنگ [از بی رنگ به قهوه ای مایل به زرد] ایجاد شد که نشان دهنده تولید نانوذرات نقره به وسیله ی این گونه از قارچ پنی سیلیوم بود (شکل 1).

3-5- نتایج به دست آمده از تصویربرداری TEM

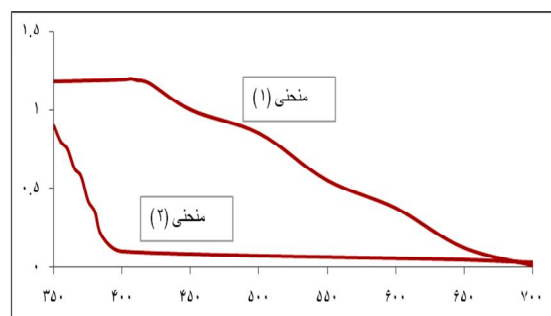
نتایج به دست آمده از تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی TEM، بیانگر تولید بیشتر خارج سلولی نانوذرات نقره (در سطح میسلیم‌ها) در اندازه‌ی 50-100 نانومتر و به شکل کروی بود (شکل 4).



شکل 4 تصاویر میکروسکوپ TEM تهیه شده از پنی سیلیوم بروی کامپاکتوم. حضور نانوذرات نقره در داخل و خارج سلول (در سطح میسلیم‌ها) کاملاً مشخص است.

3-6- نتایج تعیین گونه‌ی قارچ پنی سیلیوم

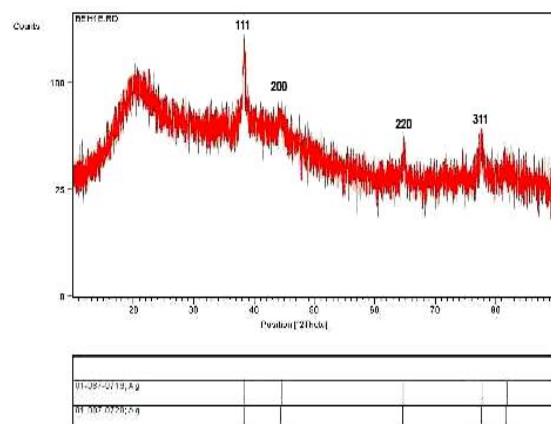
پس از کشت قارچ پنی سیلیوم تولیدکننده‌ی نانوذرات نقره روی محیط‌های CYA و کراتین سوکروز آگار، با توجه به این که این قارچ در محیط CYA، اسپورولاسیون



شکل 2 منحنی 1، نمودار به دست آمده از اسپکتروفتومتری سلول‌های قارچ لیز شده است. مشاهده بیشینه‌ی جذب در بازه‌ی طول موجی 406-425 نانومتر، نشان‌دهنده تولید نانوذرات نقره در اندازه‌های مختلف است. منحنی 2، نمودار جذب محلول حاوی بیومس قارچی قبل از لیز سلول است.

3-4- نتایج به دست آمده از XRD

وجود پیک در نقاط (111)، (200)، (220) و (311) در نمودار به دست آمده از آنالیز XRD و مقایسه آن با نمودار استاندارد نقره نشان‌دهنده‌ی حضور نانوذرات کریستالی نقره در محلول واکنش بود (شکل 3).



شکل 3 نمودار به دست آمده از XRD تهیه شده از پودر بیومس قارچی و پیک‌های منطبق با استاندارد نقره.

خوبی داشت، کونیدیوفور چندشاخه‌ای داشت، اندازه‌ی کونیدیوفورها 500 تا 2000 میکرومتر بودند و استیپ‌ها به صورت گرد یا نیمه‌گرد و به شکل تجمع‌یافته آرایش داشتند، گونه این قارچ، پنی‌سیلیوم بروی کومپاکتوم تعیین شد.

4- بحث

بسیاری از میکروارگانیسم‌ها می‌توانند نانوذرات فلزی را به صورت داخل سلولی و خارج سلولی تولید کنند. از این میکروارگانیسم‌ها می‌توان به باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها اشاره کرد [10]. مزیت قارچ‌ها در ساخت نانوذرات، توانایی آن‌ها در تولید مقادیر بالایی از انواع آنزیم‌ها است [4]. با مطالعاتی که در سال‌های گذشته روی گونه‌های مختلف پنی‌سیلیوم انجام شده، همچنین به این دلیل که پنی‌سیلیوم‌ها جزء فراوان‌ترین قارچ‌های ساپروفیت موجود در خاک است، در این مقاله، بررسی امکان تولید نانوذرات نقره به وسیله‌ی قارچ‌های پنی‌سیلیوم برای بومی‌سازی تولید نانوذرات نقره به روش زیستی انجام شد.

قارچ پنی‌سیلیوم از خاک معدن سرب و روی زنجان جداسازی شد، زیرا در چنین مناطقی، میکروارگانیسم‌ها با شرایط نامساعد مانند استرس‌های فلزی، مقابله کرده و به این شرایط مقاوم می‌شوند. یکی از این استرس‌های فلزی، عنصر نقره است که با خاصیت ضد میکروبی خود، موجب از بین رفتن میکروارگانیسم‌ها می‌شود و میکروب‌هایی که ژن مقاومت را نداشته باشند قادر به رشد و حفظ حیات خود نیستند [11]. در این مطالعه، بیومس قارچی گونه‌های پنی‌سیلیوم جداسازی شده از معدن سرب و

روی زنجان، در معرض محلول نیترات نقره قرار گرفتند تا گونه‌های قادر به تولید نانوذرات نقره شناسایی شوند. نتایج نشان داد که از 6 گونه قارچ پنی‌سیلیوم جداسازی شده، تنها گونه بروی کومپاکتوم می‌تواند نانوذرات نقره را تولید کند. اندازه‌ی نانوذرات نقره، 50-100 نانومتر، به شکل کروی و بیشتر در خارج سلول تولید شده بودند. برای استخراج نانوذرات داخل سلولی، باید از روش‌های لیز سلول و سپس فیلتراسیون استفاده کرده و نهایتاً برای جداسازی ذرات از نیترات نقره، نیاز به استفاده از روش‌های سانتریفیوژ، دیالیز و کروماتوگرافی تبادل یونی است [13، 12] که در کل، استخراج نانوذرات را بسیار پیچیده و هزینه‌بر می‌کند؛ پس تولید خارج سلولی نانوذرات نقره یک مزیت بسیار مهم قارچ پنی‌سیلیوم بروی کومپاکتوم است. نکته‌ی ویژه‌ای که در این مطالعه مشاهده شد، این بود که انتظار می‌رفت نانوذرات نقره در محلول رویی واکنش یافت شوند؛ ولی با بررسی محلول واکنش و سلول‌های قارچ لیز نشده با اسپکتروفتومتری UV-vis، وجود نانوذرات نقره تأیید نشد و در ابتدا چنین نتیجه‌گیری شد که تولید نانوذرات نقره به وسیله‌ی این قارچ به صورت داخل سلولی است. ولی با بررسی‌هایی که با میکروسکوپ الکترونی TEM انجام شد، مشاهده شد که نانوذرات نقره در سطح میسلیم‌ها درگیر است و به همین خاطر است که در محلول رویی واکنش یافت نمی‌شوند. درگیری نانوذرات با میسلیم‌ها، احتمالاً به خاطر واکنش الکترواستاتیکی میان یون‌های نقره و گروه کربوکسیلات موجود در سطح میسلیم‌ها است. این نتایج شبیه نتایج بررسی‌های موخرجی و همکارانش

- nanoparticles: advances and prospects. *Russ. Chem. Rev.* 77, 233-257.
- [4] Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S. R., Khan, M. I. (2001) Fungus mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis. *Nano Lett.* 1, 515-519.
- [5] Caesar-TonThat, T. C., Cochran V. L. (2001) Role of saprophytic basidiomycete soil fungus in aggregate stability, p. 575-579. In: Stott, D. E., Mohtar, R. H., Steinhardt, G. C. (eds). Sustaining the global farm-selected papers from the 10th International Soil Conservation Organization Meeting, May 24-29, 1999, West Lafayette.
- [6] Kathiresan, K., Manivannan, S., Nabeel, M. A., Dhivya, B. (2009) Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. *Colloid Surface B.* 71, 133-137.
- [7] Naveen, K. Sh., Kumar, G., Karthik, L., Bhaskara, K. V. (2010) Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus *Penicillium* sp. *Arch. Appl. Sci. Res.* 2, 161-167.
- [8] Karbasian, M., Atyabi, S. M., Siadat, S. D., Momen, S. B., Norouzian, D. (2008) Optimizing nano-silver formation by روی قارچ ورتیسیلیوم بود [4]. در سال 2009. کتیرسان و همکارانش با پنی‌سیلیوم فلوتانوم، در pH=6/5 و 5 درجه‌ی سانتی‌گراد، نانوذرات نقره را در 24 ساعت تولید کردند. تفاوت زمان انکوباسیون در این پژوهش ایشان با مدت زمان انکوباسیون در این پژوهش (72 ساعت) برای تولید نانوذرات نقره احتمالاً به دلیل شرایط دمایی متفاوت در این دو پژوهش بوده است [6]. با توجه به این موضوع، در پژوهش‌های بعدی سعی بر این است که با تغییر شرایط محلول واکنش، مانند تغییر pH، دما و غلظت محلول نقره، تأثیر این عوامل در تولید نانوذرات نقره بررسی شود.
- ### 5- مراجع
- [1] Badawy A., Luxton, T., Silva, R., Scheckel, K., Suidan, M., Tolaymat, T. (2010) Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1260-1266.
- [2] Holt, K. B., Bard, A. J. (2005) Interaction of silver (I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: An electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺. *Biochemistry.* 44, 13214-13223.
- [3] Krutyakov, Y. A., Kudrinskiy, Y. A., Olenin, A. Y., Lisichkin, G. V. (2008) Synthesis and properties of silver

- [11] Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E., Granqvist, CG. (1999) Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13611-13614.
- [12] Benn, T. M., Westerhoff, P. (2008) Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4133–4139.
- [13] Sadowski, Z., maliszewka, I. H., Grochowalska, B., Polowczyk, I., Kozlecki, T. (2008) Synthesis of silver nanoparticles using microorganisms. *Mater. Sci.* 26 (2), 419-424.
- Fusarium oxysporum* PTCC 5115 employing response surface methodology. *Am. J. Agr. Biol. Sci.* 3, 433-437.
- [9] Balaji, D. S., Basavaraja, S., Deshpandeb, R., Bedre Maheshb, D., Prabhakara, B. K., Venkataraman, A. (2009) Extracellular biosynthesis of functionalized silver nanoparticles by strains of *Cladosporium cladosporioides* fungus. *Colloid Surface B.* 68, 88–92.
- [10] Murali, S., Absar, A. M., Islam, Kh., Kumar, R. (2003) Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr. Sci.* 85(2), 162-170.