



سنتز سبز نانوذرات زیرکونیا با استفاده از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* و قارچ *Colletotrichum gloeosporioides*

مریم قنادنیا^{1*}، معصومه باقری²

1. استادیار، گروه مهندسی علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین، ایران
2. کارشناسی مهندسی کشاورزی: مدیریت و آبادانی، دانشگاه پیام نور، قم، ایران

* نویسنده مسئول: ghannadnia@eng.ikiu.ac.ir

چکیده

امروزه استفاده از انواع قارچ‌ها به‌عنوان منبع ترکیبات فعال زیستی مانند پروتئین‌ها برای بیوسنتز انواع نانوذرات توسعه پیدا کرده است. در این تحقیق ویژگی‌های نانوذرات بیوسرامیکی زیرکونیای بیوسنتز شده توسط قارچ‌های ساکارومایسس سرویزیه و کولتوتریکوم گلوسپوریویدس مقایسه شده است. بیوسنتز خارج سلولی نانوذرات زیرکونیا (ZrO_2 NPs) با اضافه کردن محلول 1 میلی‌مولار از K_2ZrF_6 به محیط کشت‌های دو قارچ، جداگانه انجام شد. بیوسنتز نانوذرات زیرکونیا با تغییر رنگ، ایجاد کدورت محیط کشت، طیف‌سنجی نور فرابنفش و پراش اشعه ایکس تأیید شد. نتایج FTIR اثرات برخی از ترکیبات ترش‌حی قارچ‌ها مانند پروتئین‌ها، الکل و فنل‌ها را در فرایند بیوسنتز و ثبات نانوذرات ثابت کرد. نتایج تجزیه عنصری (EDAX) تشکیل نانوذرات زیرکونیا و همچنین برخی از عناصر موجود در ترکیبات آلی شرکت‌کننده در فرایند بیوسنتزی را تأیید کرد. اثر گذشت زمان بر فرایند بیوسنتز نانوذرات نیز با اسپکتروفوتومتری بررسی شد. تغییر رنگ، کدورت محیط کشت، تشکیل پیک در کمتر از 300 nm در اسپکتروفوتومتری، نوع نانوذره را مشخص و نتایج XRD ماهیت کریستالی نانوذرات زیرکونیای بیوسنتزی را نیز براساس اندازه بلورها تأیید کرد. نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM)، بیشتر نانوذرات را بی‌شکل و برخی از آنها را مونوکلینیک با اندازه‌های (35/60nm و 19/49) برای کولتوتریکوم گلوسپوریویدس و (74/07 nm و 45/81) برای ساکارومایسس سرویزیه نشان داد. ساختار مونوکلینیک نانوذرات بیوسنتزی نیز با نتایج UV، FTIR و XRD تأیید شد.

کلید واژگان: بیوسرامیک، نانوذرات زیرکونیا، ساکارومایسس سرویزیه، کولتوتریکوم گلوسپوریویدس

مقدمه

بیوسنتز نانوذرات که امروزه محققان جهانی به آن توجه بسیاری می‌کنند، سازوکاری طبیعی است که برخی موجودات زنده انجام می‌دهند. برای مثال، می‌توان به تشکیل سیلیکا در دیاتومه‌ها و اسفنج‌ها اشاره کرد که طی این فرایند، هیدرولیز سیلیسیک اسید به وسیله پروتئین‌هایی مانند سیلیکاتین¹ و پپتیدهای پلی‌کاتیونیکی به نام سیلافین‌ها² انجام می‌شود. درحالی‌که انجام آن در آزمایشگاه‌ها با استفاده از مواد شیمیایی و در pH خاصی امکان‌پذیر است [1-2]. نانوذرات با روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و ... تولید می‌شوند، اما با توجه به اهمیت حفظ محیط‌زیست، امروزه محققان بیشتر از روش‌های دوست‌دار محیط‌زیست با استفاده از سامانه‌های زیستی تک‌سلولی یا پرسلولی برای بیوسنتز نانوذرات استفاده می‌کنند [3-6]. تاکنون تحقیقات زیادی درباره بیوسنتز نانوذرات مختلف توسط باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و گیاهان انجام شده است [7-9]. برخی از این موجودات پپتیدهای ترشحی یا دیواره تغییر شکل یافته‌ای دارند که به یون‌های فلزی متصل شده‌اند و آنها را به کمپلکس‌های باثبات نانوذره تبدیل می‌کنند [10]. استفاده از قارچ‌ها در تولید نانوذرات فلزی به دلایلی چون سطح وسیع میسلیم‌ها، مقیاس‌بندی ساده‌تر و مقرون‌به‌صرفه بودن اهمیت دارد. همچنین، قارچ‌ها مقادیر زیادی پروتئین به محیط ترشح می‌کنند که در بیوسنتز نانوذرات نقش مهمی دارند [11].

زیرکونیا (ZrO_2) اکسید فلز زیرکونیوم است و از لحاظ ساختاری و عملکردی ویژگی‌هایی مانند سختی، مقاومت به سایش، مقاومت به اسید و باز، مقاومت نسبی به اصطکاک و نقطه ذوب بالا دارد [12]. به دلیل ویژگی‌های خاص این نوع سرامیک، امروزه از آن در علوم پزشکی برای ساختن ایمپلنت‌های دندان‌ی و اسکلتی استفاده

می‌شود [13]. نانوذرات زیرکونیا به دلیل ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی غیرمعمول خود، خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی دارد [14-16]. استفاده از روش‌های زیستی در بیوسنتز نانوذرات زیرکونیا علاوه بر کاربرد پزشکی آن (به دلیل زیست سازگاری) مشکلات و خطرات ناشی از سنتز این نانوذرات را (همانند روش‌های فیزیکی - شیمیایی، سل - ژل [17]، تجزیه حرارتی [18] و سنتز هیدروترمال [19]) ندارد و مقرون به صرفه‌تر است [20].

مخمر با نام علمی ساکارومایسس سرویزیه³ به عنوان یک میکروارگانیسم مدل، قارچی تک‌سلولی یوکاریوتی از قارچ‌های کیسه‌ای (اسکومایکوتا⁴) است [21] که در زمینه‌های مختلف علمی - تحقیقاتی استفاده می‌شود و از لحاظ اقتصادی اهمیت ویژه‌ای دارد [22]. انواع الکل‌ها، استرها و آلدئیدها ترکیبات مهمی هستند که ساکارومایسس سرویزیه تولید می‌کنند [23]. تولید انواعی از الکل‌های عالی‌تر که بیش از دو کربن دارند و عمدتاً از نوع آمیل الکل‌ها هستند با تجزیه آمینواسیدها از روشی به نام اریلیخ⁵ انجام می‌شود [24]. این قارچ همچنین دو گروه عمده از استرها به نام استرهای استاتی را از الکل‌های پیچیده‌تر و اتیل استرها را از اسیدهای چرب با زنجیره متوسط تولید می‌کند [25].

قارچ کولتوتریکوم گلوکوسپوریویدس⁶ از رده قارچ‌های ناقص (دوترومایست⁷) و بدون تولید مثل جنسی است. قارچ‌ها نیز مانند پروتئین‌ها برای ارتباط با محیط خارج، سایر سلول‌ها یا شرایط تنش‌زا ترشحاتی دارند که گاهی به عنوان عوامل بیماری‌زا عمل می‌کنند [26-30]. قارچ‌ها برای تجزیه ترکیباتی مانند چوب، سلولز، همی سلولز و همچنین جذب عناصر غذایی، آنزیم‌های خارج سلولی متعددی از ریشه‌های خود ترشح می‌کنند [31-32]. این

3. *Saccharomyces cerevisiae*

4. Ascomycota

5. Ehrlich

6. *Colletotrichum gloeosporioides*

7. Deuteromycetes

1. Silicatein

2. silaffins

کشت Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YPD) کشت شده و به انکوباتور با دمای 28°C درجه انتقال یافته است. محیط کشت پس از 6 ساعت به اندازه رشد مناسب ($\text{OD}=2$) رسید (قبل از واکنش).

بیوسنتز نانوذرات زیرکونیا توسط ساکارومایسس سرویزیه

$0/05\ \mu\text{l}$ از قارچ با $50\ \text{cc}$ از محلول نمک K_2ZrF_6 با غلظت $1\ \text{mM}$ مولار تلقیح و با تنظیم pH بر روی 5.5 به مدت $24\ \text{ساعت}$ داخل شیکر با $120\ \text{rpm}$ در دمای 26°C قرار داده شد. محلول حاصل به مدت $15\ \text{دقیقه}$ در $14000\ \text{rpm}$ سانتریفیوژ و سپس رسوب به دست آمده برای تشخیص نانوذرات جهت آنالیز مربوطه آماده شد (پس از واکنش).

کشت قارچ کولتوتریکوم گلو سپوریویدس

ابتدا نمونه قارچی از دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران تهیه شد. تکثیر نمونه قارچ با استفاده از لوب در پتری دیش‌های حاوی محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) آماده از شرکت مرک آلمان انجام شد. دمای انکوباتور روی 27°C برای $3\ \text{روز}$ تنظیم شد (قبل از واکنش).

مراحل بیوسنتز نانوذرات توسط کولتوتریکوم گلو سپوریویدس

$0/01\ \text{میلی گرم}$ از بافت قارچ جدا و پس از شستشو داخل $45\ \text{cc}$ محلول یک میلی مولار نمک K_2ZrF_6 قرار داده شد. سپس با تنظیم $\text{pH}=5$ داخل شیکر ($120\ \text{rpm}$ و 26°C) قرار گرفت. بعد از $48\ \text{ساعت}$ محلول سانتریفیوژ ($15\ \text{دقیقه}$ در $14000\ \text{rpm}$) و رسوب حاصل برای تشخیص نانوذرات جداسازی شد (پس از واکنش).

بررسی تغییر رنگ و کدورت محیط کشت‌های بیوستزی

بعد از اضافه کردن محلول حاوی قارچ ساکارومایسس سرویزیه و بافت قارچ کولتوتریکوم گلو سپوریویدس به

آنزیم‌ها به شکل مستقیم از سلول‌ها یا به شکل تخریب برخی سلول‌های ریشه‌ای در محیط آزاد می‌شوند و شرایط محیطی و بیوشیمیایی زیادی بر آنها تأثیرگذارند [33]. همچنین، قارچ‌ها آنزیم‌های اکسیداتیو را برای تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک و آلیفاتیک به محیط ترشح می‌کنند [34]. نانوذراتی که از روش‌های زیستی تولید می‌شوند به دلیل وجود ترکیبات آلی موجودات زنده بر سطح آنها، علاوه برداشتن ثبات بیشتر و زیست سازگارتی، در ساخت ایمپلنت‌ها از اهمیتی ویژه برخوردارند [35]. در سال‌های اخیر، تحقیقات بسیار محدودی درباره بیوسنتز اکسید فلزی زیرکونیا توسط موجودات زنده انجام شده است. بیوسنتز نانوذرات زیرکونیا توسط عصاره غده‌های گیاه زردچوبه¹ موفقیت‌آمیز بوده است [36]. تحقیقات دیگر بیوسنتز نانوذرات زیرکونیا را توسط قارچ فوزاریوم اکسیزپوروم² نشان داده است [18]. اولین گزارش درباره بیوسنتز نانوذرات زیرکونیا توسط باکتری‌ها، بیوسنتز این نانوذره سرامیکی زیستی، توسط اکتیتوباکتر³ در سال **2019** منتشر شده است [37]. تاکنون بیوسنتز این ماده با قارچ‌های آسکومیست و مقایسه آن با قارچ‌های دوترومیست انجام نشده است. بنابراین، در پژوهش حاضر سنتز سبز نانوذرات سرامیکی زیرکونیا به روش خارج سلولی بین دو قارچ تک‌سلولی آسکومیست یعنی ساکارومایسس سرویزیه و پرسلولی ناقص دوترومیست یعنی کولتوتریکوم گلو سپوریویدس برای نخستین بار مقایسه شده است تا نتایج اولیه حاصل از آن برای بهینه سازی روش استفاده شود.

مواد و روش‌ها

تکثیر ساکارومایسس سرویزیه

قارچ ساکارومایسس سرویزیه از مرکز ملی ذخایر ژنتیک و زیستی ایران (بانک میکروارگانیسم‌ها) تهیه، در محیط

1. *Curcuma longa*
2. *Fusarium oxysporum*
3. *Acinetobacter* sp. KCSII

15 دقیقه) پس از خشک شدن در دمای 60°C به مدت دو ساعت توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM, Hitachi model S-4160, Japan-Daypetronic Company) بررسی، عکس برداری و اندازه‌های نانوذرات مقایسه شد. آنالیز عنصری نیز با دستگاه EDAX متصل به میکروسکوپ الکترونی انجام شد.

تعیین گروه‌های عاملی مؤثر در بیوستتزر و ثبات نانوذرات بیوستتزی توسط FTIR

برای تعیین گروه‌های عاملی شیمیایی از مولکول‌های زیستی شرکت‌کننده در واکنش بیوستتزر نانوذرات زیرکونیا، از دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز استفاده شد. برای اینکه با دستگاه تبدیل طیف‌سنجی مادون قرمز (Tensor 27 Bruker FTIR spectrometer) نیز بتوان آنالیز انجام داد از پودر نانوذرات زیرکونیای بیوستتزی و همچنین پودر محلول خالص حاوی قارچ ساکارومایسس سرویزیه و کولتوتریکوم گلوکسپوریویدس، جداگانه استفاده شد. پودرهایی که به دست آمدند جداگانه با نمک پتاسیم بروماید (KBr) به نسبت 1:100 مخلوط شدند. سپس، برای همگن کردن نمونه از دستگاه پرس پنوماتیک استفاده و از مخلوط مورد نظر قرصی تهیه و روی گرید FTIR قرار داده شد. با تاباندن طول موج‌های بین 4000 cm^{-1} و 400 و بازتاب اشعه مادون قرمز به وسیله دستگاه، نمودار پیک‌های جذبی رسم شد. پیک‌های به دست آمده از مقایسه عصاره خالص هر نمونه با عصاره بیوستتزی نانوذره حاصل از آن، گروه‌های عاملی مؤثر در بیوستتزر را مشخص کرد.

یافته‌ها

تغییر رنگ و ایجاد کدورت

نتایج تغییر رنگ محیط کشت ساکارومایسس سرویزیه و محیط کشت کولتوتریکوم گلوکسپوریویدس، قبل و پس از واکنش، در شکل 1، جداگانه نشان داده شده است. در ساکارومایسس سرویزیه، در آغاز واکنش رنگ شفاف با

محلول 1 میلی‌مولار نمک K_2ZrF_6 و تنظیم جداگانه pH، تغییر رنگ و کدورت محلول‌ها (پس از واکنش) با فواصل زمانی 8 ساعت بررسی شد.

بررسی میزان جذب نوری نانوذرات توسط اسپکتروفوتومتری

برای تعیین غلظت نانوذرات زیرکونیای بیوستتزر شده توسط مقدار نور جذب شده، از دستگاه اسپکتروفوتومتری استفاده شد. اسپکتروفوتومتری برای نمونه قارچ به مدت 72 ساعت با فواصل زمانی 8 ساعتی و برای مخمر در 4 زمان 8 ساعتی پس از یک ساعت از آغاز واکنش، در دو محیط جداگانه انجام شد. به این منظور 300 میکرولیتر از محلول برداشته و با دستگاه اسپکتروفوتومتر Bio Tek Epoch Spectrophotometer (Microplate) در طول موج‌های بین 200 تا 500 نانومتر میزان جذب نوری اندازه‌گیری شد. باتوجه به داده‌های به دست آمده، نمودار جذب نوری رسم شد.

تعیین ماهیت نانوذرات توسط XRD

برای تعیین ماهیت نانوذرات زیرکونیای بیوستتزر شده از دستگاه پراش اشعه ایکس (به دلیل انحصاری بودن الگوی پراش آن برای هر ماده) استفاده شد. برای تعیین نانوذرات زیرکونیای تولید شده برای هر دو نمونه ساکارومایسس سرویزیه و کولتوتریکوم گلوکسپوریویدس از روش پراش اشعه ایکس و دستگاه XRD (EQUINOX 3000 X-ray Diffractometer) استفاده و الگوی XRD بین زوایای 2θ از 10 تا 90 درجه بررسی شد. $0/1$ گرم از پودر رسوب خشک شده حاصل از سانتریفوژ با دستگاه XRD، آزمایش و طول موج‌های انعکاس یافته و نمودار آنها با نرم افزار High Score Plus بررسی شد.

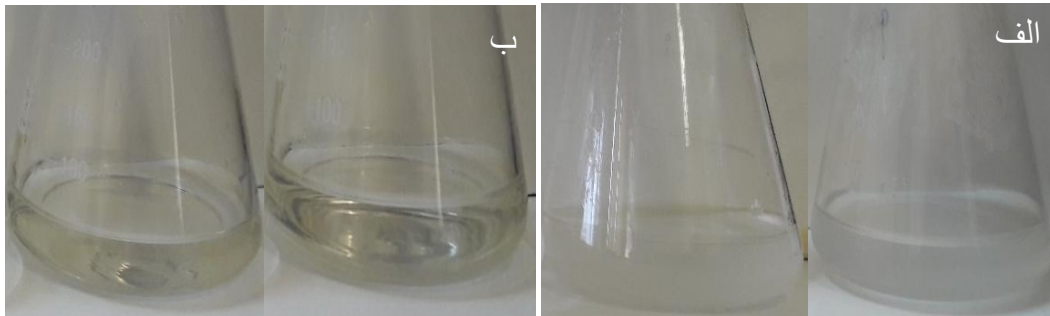
بررسی شکل و اندازه نانوذرات زیرکونیای بیوستتزی

توسط FESEM و آنالیز عنصری توسط EDAX

رسوب حاصل از سانتریفیوژ نمونه‌های ساکارومایسس سرویزیه و کولتوتریکوم گلوکسپوریویدس (14000rpm در

کولتوتریکوم گلوکسپوریویدس در ابتدا زرد شفاف بود و پس از 48 ساعت، رنگ زرد کدری به خود گرفت.

کمی کدورت سفیدرنگ بود و پس از 24 ساعت از آغاز واکنش مخلوطی شیری رنگ ایجاد کرد. مخلوط قارچ

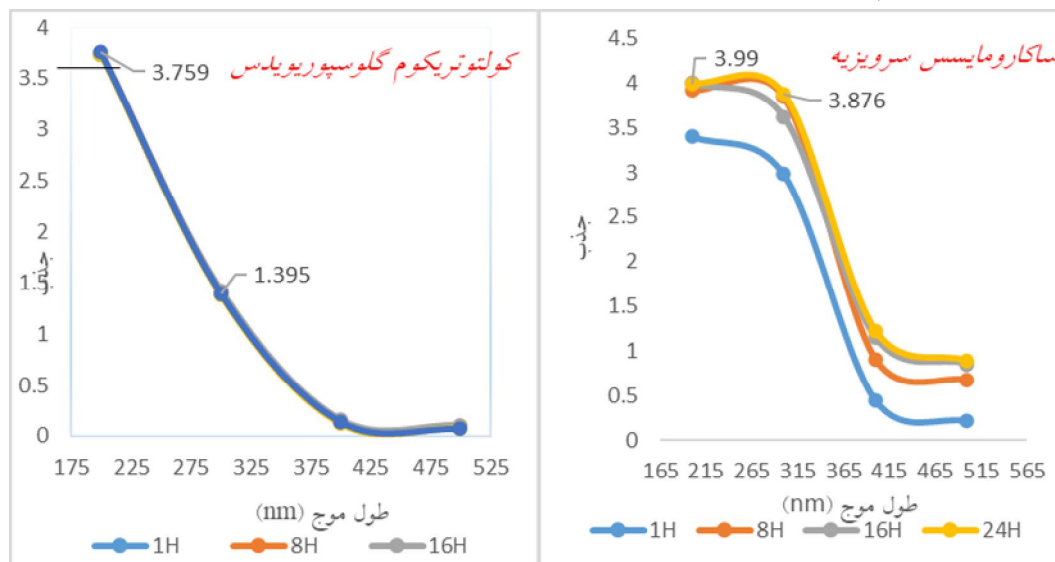


شکل 1. الف- محیط کشت ساکارومایسس سرویزیه قبل از واکنش (سمت راست) و 24 ساعت پس از واکنش (سمت چپ)، ب- محیط کشت کولتوتریکوم گلوکسپوریویدس قبل از واکنش (سمت راست) و 48 ساعت پس از واکنش (سمت چپ)

ساکارومایسس سرویزیه با افزایش زمان از یک ساعت از آغاز واکنش تا 24 ساعت از آغاز واکنش افزایش داشته است. در صورتی که گذشت زمان بر میزان جذب در کولتوتریکوم گلوکسپوریویدس تأثیر زیادی نداشته است و منحنی‌های جذب بر یکدیگر انطباق داشته‌اند.

اسپکتروفتومتری

شکل 2 میزان جذب نانوذرات زیرکونیا را در ساعت‌های مختلف از شروع واکنش نشان می‌دهد. بیشترین میزان جذب و تشکیل پیک در محدوده 200 تا 300 نانومتر در هر دو میکروارگانیسم مشاهده شد. میزان جذب در



شکل 2. طیف‌های جذب نوری UV-Vis ثبت شده برای واکنش ساکارومایسس سرویزیه و کولتوتریکوم گلوکسپوریویدس در زمان‌های مختلف پس از آغاز واکنش

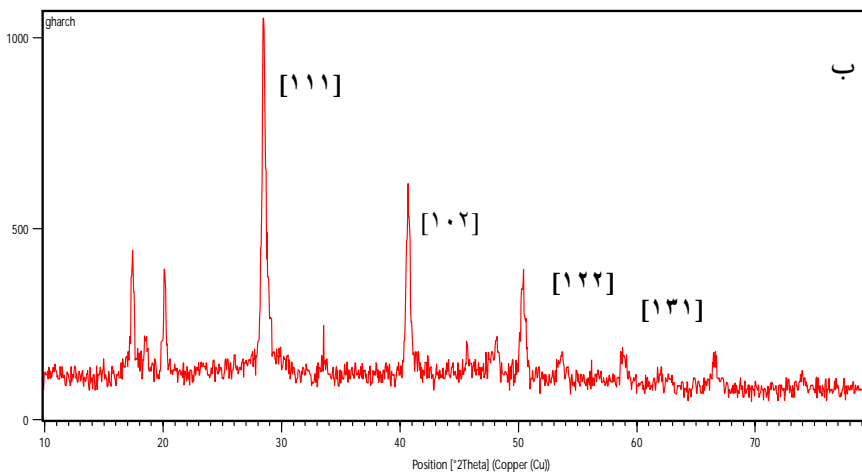
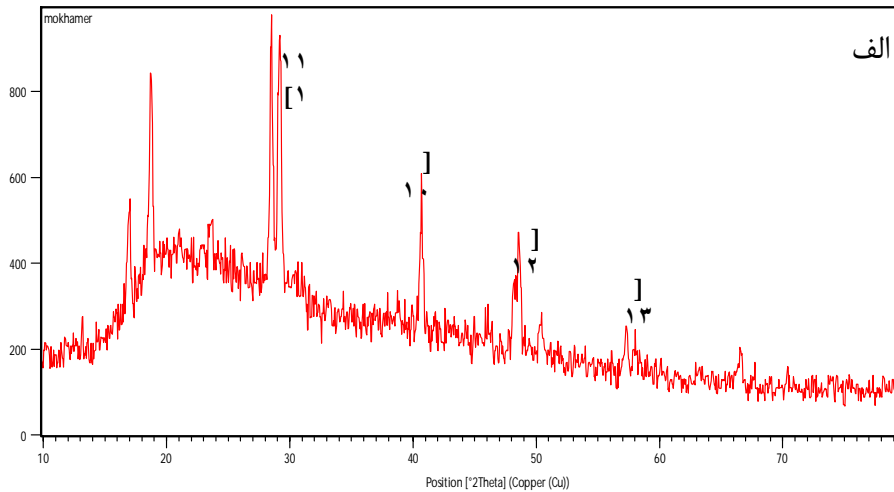
ساکارومایسس سرویزیه و کولتوتریکوم گلوکسپوریویدس در شکل 3 نشان داده شده است. در الگوی پراش اشعه

XRD

الگوی پراش اشعه ایکس به دست آمده برای نانوذرات زیرکونیا با ساختار بلوری بیوستتر شده توسط

کولتوتریکوم گلوسپوریویدس به وضوح تشخیص داده نمی شد.

ایکس در دو نوع قارچ، پیکها در 2θ مساوی 41/2، 28/8، 50/7 و 59/1 ایجاد شدند. پیک آمورف مربوط به ساکارومایسس سرویزیه تشخیص دادنی بود، ولی در قارچ



شکل 3. نمودار الگوی XRD به دست آمده از نانوذرات بیوستنتز شده توسط ساکارومایسس سرویزیه (الف) و کولتوتریکوم گلوسپوریویدس (ب)

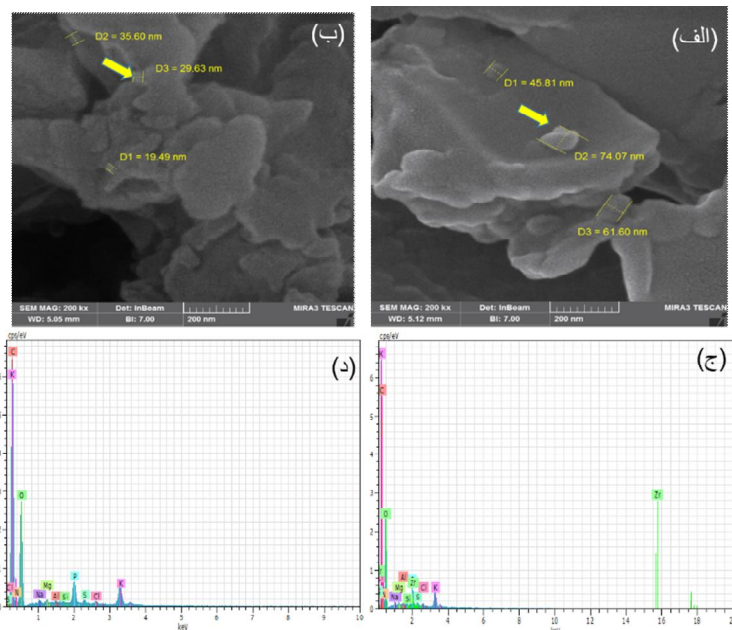
اندازه‌های 35/60 و 19/49 نانومتر مشاهده شدند (شکل 4- الف و ب). در اطراف اکثر نانوذرات بیوستنتز شده، هاله سفیدرنگی مشاهده می شد (شکل 4، فلش‌ها). با توجه به هم پوشانی زیرکونیوم و فسفر در 2 keV، دو تصویر از نتایج تجزیه عنصری EDAX ارائه شد. این نتایج وجود عنصر زیرکونیوم و اکسیژن تشکیل دهنده زیرکونیا (شکل

EDAX و FESEM

نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی، بیشتر نانوذرات را بی شکل و برخی را مونوکلینیک نشان داد. نانوذرات بیوستنتز شده با ساکارومایسس سرویزیه با اندازه‌های 45/81 و 74/07 نانومتر و در قارچ کولتوتریکوم گلوسپوریویدس با

(شکل 4، د)، تأیید کردند.

4 ج) و همچنین عناصری مانند پتاسیم، فسفر، گوگرد و نیتروژن را که از عناصر تشکیل دهنده ترکیبات آلی هستند

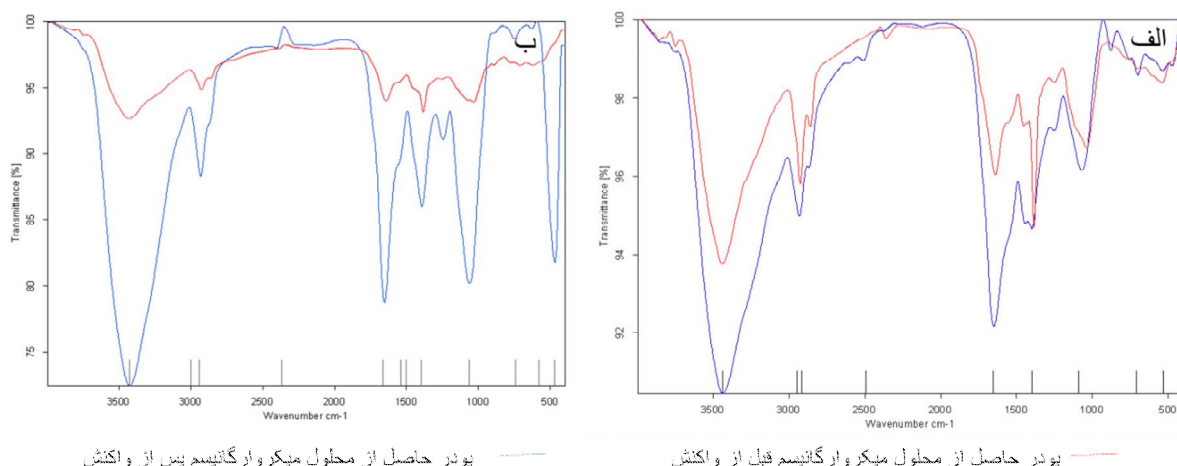


شکل 4. تصاویر میکروسکوپ الکترونی FESEM و آنالیز عنصری EDAX از نانوذرات زیرکونیا بیوسنتز شده. نانو ذرات بیوسنتزی توسط ساکارومایسس سرویزیه (الف) و کولتوتریکوم گلو سپوریویدس (ب). نتیجه تجزیه عنصری مشخص کننده زیرکونیا (ج) برخی عناصر تشکیل دهنده ترکیبات آلی (د). فلش ها نشان دهنده هاله سفید رنگ اطراف نانوذرات بیوسنتزی هستند.

1251/43، 1037/88، 540/43 بودند. این پیکها با تغییر مکانهای جزئی در عصاره بیوسنتزی مخمر عبارت از پیکهای $1649/95$ ، 2500 ، $2930/53$ ، $3435/17$ cm^{-1} پیکهایی که در محدودههای $1453/16$ ، $2858/42$ cm^{-1} و $1251/43$ در محلول خالص ساکارومایسس سرویزیه وجود داشتند، در محلول بیوسنتزی آن حذف شدند. همچنین، پیکهایی که در نواحی $878/58$ cm^{-1} و $538/07$ در محلول خالص ساکارومایسس سرویزیه نبودند در محلول بیوسنتزی آن ایجاد شده بودند.

FTIR

برای تشخیص متابولیت‌های قارچی شرکت کننده در فرایند بیوسنتز نانوذرات زیرکونیا، طیف‌های FTIR حاصل از پودر محلول خالص و بیوسنتزی خشک شده ساکارومایسس سرویزیه با یکدیگر و همچنین پودر محلول خالص خشک شده قارچ کولتوتریکوم گلو سپوریویدس و پودر محلول بیوسنتزی خشک شده آن با یکدیگر مقایسه شدند (شکل 5). پیک‌های اصلی ایجاد شده در پودر خشک شده محلول خالص ساکارومایسس سرویزیه شامل $2924/78$ ، $3442/23$ cm^{-1} ، $1384/33$ ، $1453/16$ ، $1639/32$ ، $2350/59$ ، $2858/42$



شکل 5. طیف‌های FTIR ثبت‌شده از ساکارومایسس سرویزیه (الف) و کولتوتریکوم گلوَسپوریویدس (ب) قبل و پس از واکنش

موارد تأییدکننده بیوستنز نانوذرات است [40]. کدرشدن محیط بیوستنزی می‌تواند به دلیل تولید نانوذرات بیوستنزی و رسوب آنها ایجاد شود [37]. همچنین، این گونه تغییرات می‌تواند در اثر ترشحات قارچی در مواجهه با نمک به کاربرده شده در محلول جهت بیوستنز باشد [41]. نتایج طیف‌سنجی جذبی، محدوده تشکیل پیک را در 300-200 نانومتر مشخص کرد. در این محدوده نشان داده شد که جذب توسط نانوذرات زیرکونیای بیوستنز انجام گرفته است [37، 42]. تشکیل پیک در کمتر از 300 نانومتر در هر دو نمونه مشهود بود. این امر فاز نانوذرات زیرکونیای مونوکلینیک را نشان می‌داد [43]. همچنین، مشخص شد شدت جذب نوری در ساکارومایسس سرویزیه با گذشت زمان تا 24 ساعت به تدریج افزایش داشته است. این امر افزایش مقدار نانوذرات بیوستنز شده توسط آن را نشان می‌داد. شیب نزولی میزان جذب نوری با گذشت زمان و تا 24 ساعت بعد کاهش یافت؛ به طوری که در انتها، شیب منحنی تقریباً صفر و به شکل خط افقی نشان داده شده است. در قارچ کولتوتریکوم گلوَسپوریویدس حتی پس از 48 ساعت از آغاز واکنش، تأثیری در میزان جذب نوری و در نتیجه مقدار بیوستنز نانوذرات زیرکونیا دیده نشد. همچنین، شیب کاهش سرعت بیوستنز از ساکارومایسس

پیک‌های اصلی ایجاد شده در عصاره خالص قارچ کولتوتریکوم گلوَسپوریویدس عبارت بودند از: پیک‌های $1641/82$ ، $2092/32$ ، $2925/17$ ، $3427/52$ cm^{-1} ، $1383/90$ ، $1257/00$ ، $1033/12$ ، $710/82$ و $619/86$. این پیک‌ها با تغییر موقعیت‌های جزئی در عصاره بیوستنزی قارچ کولتوتریکوم گلوَسپوریویدس، پیک‌های cm^{-1} $1392/99$ ، $1653/48$ ، $2143/06$ ، $2930/22$ ، $3424/98$ ، $1246/20$ ، $1062/71$ ، $751/53$ ، $630/41$ را شامل شدند و پیک اضافه شده cm^{-1} $468/21$ بود که در عصاره خالص این قارچ وجود نداشت. در نتایج هر دو نمونه بیوستنزی، پیک کوچکی در محدوده cm^{-1} 818 مشاهده می‌شد.

بحث

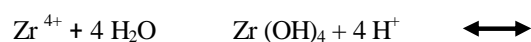
زیست‌فناوری نانو یکی از فناوری‌های زیستی جدید است که در آن می‌توان با استفاده از موجودات زنده، نانوذرات مختلف را بیوستنز کرد. این کار می‌تواند به صورت خارج سلولی یا داخل سلولی انجام شود [38-39]. از این رو در این پژوهش، با دو نوع قارچ ساکارومایسس سرویزیه و کولتوتریکوم گلوَسپوریویدس، بیوستنز نانوذرات سرمایی زیرکونیا به روش خارج سلولی مقایسه شد. معمولاً تغییر رنگ و کدورت محلول‌های بیوستنزی نانوذرات یکی از

شکل‌های نامنظم و نیز مونوکلینیک را نشان داد. اندازه‌های مشخص شده در این تصاویر، اندازه نانوذرات بیوستتزشده را توسط قارچ کولتوتریکوم گلوکوسپوریویدس از ساکارومایسس سرویزیه کوچک‌تر نشان داد. این نتیجه می‌تواند به علت وجود میسلیم‌های موجود در قارچ کولتوتریکوم گلوکوسپوریویدس باشد که با توجه به سطح زیاد، مقدار مواد ترشح شده بیشتری را در واحد زمان تولید می‌کنند و نانوذرات با این ترکیبات پوشانده می‌شوند، ثبات می‌یابند و فرصت کمتری برای اتصال به یکدیگر و تشکیل نانوذرات بزرگ‌تر می‌یابند^[50]. ترکیبات ترش‌حی از قارچ‌ها که در تشکیل و ثبات نانوذرات زیرکونیا نقش داشتند، به شکل هاله سفیدرنگ در اطراف برخی از نانوذرات بیوستتزشده مشهود بودند که به احتمال زیاد از پروتئین‌های ترش‌حی قارچ‌ها^[18] تشکیل شده‌اند (فلش‌ها در شکل 3). این نتیجه‌گیری توسط تجزیه عنصری EDAX از نمونه‌های بیوستتزی که وجود عنصری مانند فسفر، پتاسیم، گوگرد و نیتروژن را که در ترکیبات آلی وجود دارند^[51] و نتایج مربوط به FTIR که گروه‌های عاملی ترکیبات بیوشیمیایی را مشخص می‌کند، تأیید شد^[36]. نتایج، تجزیه عنصری همچنین وجود زیرکونیوم و اکسیژن تشکیل‌دهنده نانوذرات زیرکونیای بیوستتزی را تأیید کرد.

پیک‌های قوی FTIR در محدوده $3200-3650\text{ cm}^{-1}$ می‌تواند نشان‌دهنده گروه OH الکل و فنول‌ها و احتمالاً NH به علت پیوند کششی کربونیل در پروتئین‌ها باشد^[52-53]. تغییر مکان جزیی پیک‌ها در محدوده $3000-2900\text{ cm}^{-1}$ شرکت عامل CH_2 آلکان‌ها را در لیپید و اسیدهای چرب (که حتی در غشای سلول‌ها نیز وجود دارند) نشان می‌دهد^[54]. پیک‌های موجود در محدوده $2500-2000\text{ cm}^{-1}$ می‌تواند نشانه‌ای از وجود ترکیبات سیانیدی و نیتریلی در محیط باشد^[55]. همچنین این پیک می‌تواند به پیوند O-H کششی مربوط باشد^[52]. وجود پیک در

سرویزیه بیشتر بود و در ساعت‌های مختلف تفاوتی نشان داده نشد. پیک مربوط به ساکارومایسس سرویزیه نیز پهن‌تر از پیک کولتوتریکوم گلوکوسپوریویدس است که وجود متابولیت‌های متنوع بیشتر بیوستتزشده توسط ساکارومایسس سرویزیه را نسبت به کولتوتریکوم گلوکوسپوریویدس نشان می‌دهد^[40]. ساکارومایسس سرویزیه از لحاظ ساختاری شبیه یوکاریوت‌های پیشرفته است و وزیکول‌های ترش‌حی با شبکه‌های غشایی پیچیده داخل و خارج سلولی دارد^[44-45]. این نوع قارچ ترکیبات ثانویه متعددی مانند انواع الکل‌ها، از فنل‌ها گلیسرول، استرها، کربونیل و ترکیبات سولفوری مانند آمینواسیدهای گوگردی تولید می‌کند^[46] که می‌تواند در این فرایند نقش داشته باشند. در الگوی پراش اشعه ایکس در کولتوتریکوم گلوکوسپوریویدس و ساکارومایسس سرویزیه پیک‌های ایجادشده در 20 اشاره شده در نتایج، به ترتیب به سطوح [111]، [102]، [122] و [131] مربوط می‌شود که ساختار مونوکلینیک (JCPDS no. 24-1164) ایجادشده را برای نانوذرات زیرکونیای بیوستتزشده نشان می‌دهد^[36] که با نتایج برخی مطالعات مشابه موجود مطابقت دارد^[47].^[43] وجود پیک آمورف در XRD مربوط به ساکارومایسس سرویزیه می‌تواند نشانه‌ای از توده انبوه‌تری از این میکروارگانیسم‌ها و تنوع بیشتر ترکیبات ترشح‌شده از آنها^[40] در رسوب حاصل از سانتریفیوژ نسبت به قارچ کولتوتریکوم گلوکوسپوریویدس باشد. وجود وضعیت آمورف در XRD با پیک‌های ناشناخته، وجود ترکیبات آلی در ترشحات قارچ‌ها را تأیید می‌کند که با نتایج تحقیقات مشابه بر بیوستتز نانوذرات توسط سایر موجودات زنده مطابقت دارد^[48-49]. محاسباتی که با فرمول شرر^[37] انجام شد متوسط اندازه بلورهای نانوذرات بیوستتزی زیرکونیا را توسط ساکارومایسس سرویزیه 34/7 و برای کولتوتریکوم گلوکوسپوریویدس 35/5 نانومتر نشان داد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی

در $468/21 \text{ cm}^{-1}$ در پودر بیوستتزی قارچ کولتوتریکوم گلوکسپوریویدس نیز می‌تواند همین تفسیر را داشته باشد که در قارچ‌ها تحت تأثیر غلظت‌های خاصی از انواع یون-ها سمیت ایجاد و به ترشح ترکیبات خاص در آنها منجر می‌شود [57]. پیک‌های عمده در FTIR ترشح ترکیبات الکلی، پروتئینی و تریپنی از قارچ‌ها را نشان می‌دهند [23-26]³⁰. ترشح انواع آنزیم‌های تجزیه‌ای توسط قارچ‌ها که ساختار پروتئینی دارند مشخص می‌کند که ترکیب عمده ترشحاتی توسط آنها را پروتئین‌ها تشکیل می‌دهند [31-32]. باندهای OH کششی، پیوندهای آمیدی، ارتعاشات کششی C-O، N-H و همچنین C-OH را مشخص کردند [41]. به‌رحال با توجه به نتایج مشخص است که پروتئین‌ها حجم عمده‌ای از ترکیبات ترشحاتی قارچ‌ها را تشکیل داده و در مکانیسم بیوستتزی نانوذرات زیرکونیا نقش مهمی داشته‌اند. به شکل معمول نانوذرات ZrO_2 سه فاز بلوری مونوکلینیک، تتراگونال و کوبیک دارند که نوع مونوکلینیک در دمای اتاق ثبات دارد و دو نوع دیگر به دماهای بالاتری برای ثبات نیاز دارند [58]. نتایج برخی از تحقیقات مشخص می‌کند، ثبات نانوذرات زیرکونیا توسط بیومولکول‌هایی مانند آمینواسیدها، آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، استروئیدها، فنول‌ها، تانن‌ها، قندها و فلاونوئیدهای موجود در گیاهان عالی ایجاد می‌شود [59-60]. کمپلکس-های فلزی مانند فلوروزیرکونات (ZrF_6^{2-}) در محلول‌های آبی ناپایدارند و این سبب بی‌حرکی یا رسوب آنها می‌شود و به‌همین دلیل هیدرولیز می‌شوند [61]. زیرکونیوم در محلول آبی فقط با ظرفیت 4^+ وجود دارد. یون‌های آزاد 4^+ Zr به‌دلیل کشش قوی به هیدرولیز و پلیمریزه‌شدن، فقط در شرایط خیلی اسیدی ثبات دارند و در pH های بالاتر (شرایط معمولی آزمایش) هیدرولیز می‌شوند [62]:



وجود قارچ‌ها در محیط سبب تولید و ترشح انواع پروتئین‌ها از آنها و محلول آبی نمک K_2ZrF_6 سبب تولید

محدوده $1475\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده گروه عاملی $\text{C}=\text{C}$ در مواد دارای حلقه‌های آروماتیک ترکیبات معطر و مونوترپین‌ها است [55]. همچنین، پیک‌ها در محدوده 1600 ، به باند ارتعاشی آمید I و II از باندهای پروتئین مربوط می‌شوند که با نتایج کومار و همکاران مطابقت نشان می‌دهد [56]. پیک‌های موجود در محدوده $1126\text{-}1462 \text{ cm}^{-1}$ وجود عامل آلکان (CH_3) در کربوهیدرات‌ها و پیک‌های موجود در نواحی $1000\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$ وجود احتمالی انواع الکل‌ها، اترها، استرها، اسیدهای کربوکسیلیک و آلکالوئیدها را نشان می‌دهد [55]. وجود پیک در نواحی $600\text{-}800 \text{ cm}^{-1}$ وجود مونوترپین‌های دو حلقه‌ای معطر [23]⁵⁵ و ارتعاشات انحرافی C-OH ناشی از پروتئین‌ها را نشان می‌دهد [41]. پیک‌ها در محدوده $500\text{-}800 \text{ cm}^{-1}$ آلکیل‌هالیدها (C-Cl) و در $350\text{-}450 \text{ cm}^{-1}$ ترکیبات دارای گوگرد مانند آمینواسیدهای متیونین و سیستئین را نشان می‌دهد [55]. وجود پیک در محدوده 818 cm^{-1} در نمونه‌های بیوستتزی وجود نانوذرات زیرکونیای مونوکلینیک را مجدداً تأیید کرد [36].

حذف پیک‌ها در محدوده‌های $2858/42 \text{ cm}^{-1}$ و $1453/16$ و $1251/43$ در عصاره بیوستتزی ساکارومایسس سرویزیه مصرف آنها در فرایند بیوستتزی نانوذرات را نشان می‌دهد. این مواد مصرفی احتمالی در فرایند بیوستتزی می‌توانست در $2858/42 \text{ cm}^{-1}$ دارای لیپیدها و اسیدهای چرب غشاهای $1453/16 \text{ cm}^{-1}$ دارای کربوهیدرات‌ها و در $1251/43 \text{ cm}^{-1}$ دارای الکل‌ها، اترها و اسیدهای کربوکسیلیک باشد. همچنین، پیک‌های نواحی $878/58$ و $538/07$ در عصاره خالص ساکارومایسس سرویزیه وجود نداشت و در عصاره بیوستتزی آن ایجاد شد. این امر مؤید سمی بودن نمک زیرکونیوم برای آن است که ترکیبات آلکیل‌هالیدی و همچنین ترکیبات دارای گوگرد مانند آمینواسیدهای متیونین و سیستئین را ترشح کرده است. پیک اضافه‌شده

و با توجه به تعداد بار الکتریکی منفی (برای مثال چهار ترکیب الکلی یا فنلی) خود، می‌توانند در این فرایند نقش داشته باشند که البته باید تحقیقات تکمیلی بیشتری در این زمینه انجام شود.

نتیجه‌گیری

تاکنون درباره بیوستتر نانوذرات سرامیکی زیرکونیا توسط قارچ‌های ساکارومایسس سرویزیه و کولتوتریکوم گلوکسپوریویدس و مکانیسم‌های احتمالی مؤثر در آن گزارشی منتشر نشده است. نتایج حاصل از اسپکتروفتومتری، FTIR و XRD در این تحقیق، بیوستتر نانوذرات مونوکلینیک را توسط هر دو میکروارگانیزم تأیید کرد. انواع اندازه‌گیری شده آنها در تصاویر FESEM، کوچک‌تر بودن انواع بیوستتری آنها توسط قارچ کولتوتریکوم گلوکسپوریویدس را تأیید کرد. در مجموع ویژگی‌های نانوذرات بیوستتری توسط کولتوتریکوم گلوکسپوریویدس نسبت به ساکارومایسس سرویزیه بهتر بود. انواع قارچ‌ها با توجه به ترشح ترکیبات مختلف از جمله تولید انبوه آزیوم و پروتئین‌ها می‌توانند ارگانیزم‌های مناسبی برای بیوستتر نانوذرات مختلف به‌ویژه انواع سرامیکی آنها مانند زیرکونیا باشند که کاربرد وسیعی در علوم مختلف به‌ویژه پزشکی دارند. تغییر شرایط کشت به‌ویژه برای انواعی از قارچ‌ها که کشت آنها ساده‌تر است می‌تواند به بهینه‌سازی فرایند بیوستتر و دستیابی به نانوذراتی با ویژگی‌های مورد نظر منجر شود که درباره این موضوع تحقیقات تکمیلی ضروری است.

تشکر و قدردانی: از همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین، برای فراهم کردن بخشی از تسهیلات لازم در انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌شود. **تأییدیه اخلاقی:** این مطالعه را همه نویسندگان تأیید کرده‌اند. همچنین این مطالعه در نشریه دیگری به زبان

یون‌های کمپلکس ZrF_6^{2-} می‌شود. پروتئین‌های ترشح شده از قارچ‌ها نیز سبب هیدرولیز این کمپلکس یونی و تولید نانوذرات زیرکونیا (ZrO_2) از این یون‌ها می‌شوند [18]. از دلایل وجود هاله سفیدرنگ در اطراف نانوذرات زیرکونیا بیوستتر شده می‌توان به پروتئین‌های ترشحي قارچ‌ها (که در بیوستتر و ثبات نانوذرات شرکت داشته‌اند) اشاره کرد [56] که نتایج EDAX و FTIR نیز آن را تأیید کرده است [51, 36]. تحقیقات قبلی ما در این باره نشان داد که برای تشکیل نانوذراتی مانند نانوذرات نقره به دلیل بار مثبت آن، وجود ترکیبات زیستی دارای بار منفی در فرایند بیوستتری مؤثر است [63]. زیرکونیا (ZrO_2) اکسید فلزی زیرکونیوم است که به دلیل 4 بار مثبت زیرکونیوم به دو مولکول اکسیژن برای واکنش خنثی شدن نیاز دارد تا به ثبات وضعیت برسد [18]. احتمالاً ترکیبات دارای بار منفی و اکسیژن (مانند گروه‌های عاملی شامل کربوکسیل و هیدروکسیل که پیک‌های قوی در FTIR ایجاد کرده‌اند) توانسته‌اند در فرایند بیوستتر این نانوذرات سرامیکی مؤثر باشند. پروتئین‌هایی که قارچ‌ها ترشح می‌کنند به دو حالت می‌توانند در مکانیسم بیوستتر نانوذرات زیرکونیا شرکت کنند. برخی از آنها که بار مثبت دارند به یون‌های بار منفی ZrF_6^{2-} متصل می‌شوند و نانوذرات زیرکونیا را تشکیل می‌دهند. نتایج تحقیقات مشابه نشان می‌دهد، وزن مولکولی این پروتئین‌ها در قارچ فوزاریوم 24 تا 48 کیلوالتون و بسیار شبیه سلیکاتین بوده است [18]. گروه دیگری از پروتئین‌های ترشحي که با گروه اول تفاوت دارند، در واکنش هیدرولیز یون‌های ZrF_6^{2-} و تشکیل نانوذرات زیرکونیا شرکت می‌کنند. این نتایج با یافته‌های پژوهشی دیگر درباره استفاده از قارچ فوزاریوم مطابقت دارد [18]. زیرکونیوم می‌تواند 4 بار مثبت داشته باشد. بنابراین، ترکیبات غیر پروتئینی دارای اکسیژن و بار منفی مانند ترکیبات الکلی، فنل‌ها و مواد مشابهی که می‌توانند توسط قارچ‌ها ترشح شوند نیز در این فرایند مؤثر هستند

11. Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar SR, Khan MI, Parishcha R, Ajaykumar PV, Alam M, Kumar R, Sastry M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis. *Nano Lett.* 2001; 1(10): 515-519.

12. Heuer AH. Transformation toughening in ZrO₂-containing ceramics. *J Am Ceram Soc.* 1987; 70(10): 689-698.

13. Hulbert SF. The use of alumina and zirconia in surgical implants. *Bioceram Dev Appl.* 2013; 1: 27-47.

14. Jalil RD, Jawad MMHM, Abd AN. Plants extracts as green synthesis of zirconium oxide nanoparticles. *J Genet Environ Resour Conserv.* 2017; 5(1): 6-23.

15. Gowri S, Gandhi RR, Sundrarajan M. Structural, optical, antibacterial and antifungal properties of zirconia nanoparticles by biobased protocol. *J Mater Sci Technol.* 2014; 30(8):782-790.

16. Balaji S, Mandal BK, Ranjan S, Dasgupta N, Chidambaram R. Nano-zirconia-evaluation of its antioxidant and anticancer activity. *J Photochem Photobiol B.* 2017; 170: 125-133.

17. Xu H, Qin DH, Yang Z, Li HL. Fabrication and characterization of highly ordered zirconia nanowire arrays by sol-gel template method. *Mater Chem Phys.* 2003; 80(2): 524-528.

18. Bansal V, Rautaray D, Sastry M. Biosynthesis of zirconia nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *J Mater Chem B.* 2004; 14(22): 3303-3305.

19. Noh HJ, Seo DS, Kim H, Lee JK. Synthesis and crystallization of anisotropic shaped ZrO₂ nanocrystalline powders by hydrothermal process. *Mater Lett.* 2003; 57(16-17): 2425-2431.

20. Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Ahmad A, Khan MI, Kumar R, Sastry M. Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*. *Chem Bio Chem.* 2002; 3(5): 461-463.

21. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. Life with 6000 genes. *Science* 1996; 274(5287): 546-563.

22. Thomson JM, Gaucher EA, Burgan MF, De Kee DW, Li T, Aris JP, Benner SA. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nat Genet.* 2005; 37(6): 630-635.

23. Mina M, Tsaltas D. Contribution of Yeast in Wine Aroma and Flavour. In: Morata A. and Loira I., editors. *Yeast Industrial Applications*. 1th ed. Croatia, JT: InTech; 2017: 117-134.

فارسی، انگلیسی یا زبان دیگری نه چاپ شده و نه برای نشریه دیگری ارسال شده است.

تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مریم قنادیا (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی (60%): معصومه باقری (نویسنده دوم)، پژوهشگر دوم (40%).

منابع

1. Shimizu K, Cha J, Stucky GD, Morse DE. Silicatein α : cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(11):6234-38.

2. Kröger N, Deutzmann R, Bergsdorf C, Sumper M. Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(26):14133-14138.

3. Honary S, Barabadi H, Gharaei-Fathabad E, Naghibi F. Green synthesis of silver nanoparticles induced by the fungus *Penicillium citrinum*. *Trop J Pharm Res.* 2013; 12(1): 7-11.

4. Honary S, Barabadi H, Gharaei-Fathabad E, Naghibi F. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium citrinum* and *Penicillium waksmanii*. *Dig J Nanomater Bios.* 2012; 7: 999-1005.

5. Honary S, Gharaei-Fathabad E, Barabadi H, Naghibi F. Fungus-mediated synthesis of gold nanoparticles: a novel biological approach to nanoparticle synthesis. *J Nanosci Nanotechnol.* 2013; 13(2):1427-1430.

6. Honary S, Gharaei-Fathabad E, Paji ZK, Eslamifar M. A novel biological synthesis of gold nanoparticle by Enterobacteriaceae family. *Trop J Pharm Res.* 2012; 11(6):887-891.

7. Rai M, Yadav A, Gade A. Current trends in phytosynthesis of metal nanoparticles. *Crit Rev Biotechnol.* 2008; 28(4): 277-284.

8. Golinska P, Wypij M, Ingle AP, Gupta I, Dahm H, Rai M. Biogenic synthesis of metal nanoparticles from actinomycetes: biomedical applications and cytotoxicity. *Appl Microbial Biotechnol.* 2014; 98(19): 8083-8097.

9. Singh R, Shedbalkar UU, Wadhvani SA, Chopade BA. Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. *Appl Microbial Biotechnol.* 2015; 99(11): 4579-4593.

10. Yong P, Rowson AN, Farr JPG, Harris IR, Mcaskie LE. Bioaccumulation of palladium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *J Chem Technol Biotechnol.* 2002; 55: 593-601.

37. Suriyaraj SP, Ramadoss G, Chandraraj K, Selvakumar R. One pot facile green synthesis of crystalline bio-ZrO₂ nanoparticles using *Acinetobacter* sp. KCSI1 under room temperature. *Mat Sci Eng C*. 2019; 105:1-10.
38. Raja K, Saravanakumar A, Vijayakumar R. Efficient synthesis of silver nanoparticles from *Prosopis juliflora* leaf extract and its antimicrobial activity using sewage. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2012; 97: 490-494.
39. Raju D, Mehta UJ, Ahmad A. Biosynthesis of highly stable intra and extracellular gold nanoparticles by using live peanut (*Arachis hypogaea*) callus cells. *Curr Nanosci*. 2013; 9(1): 107-112.
40. Pirtarighat S, Ghannadnia M, Baghshahi S. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum basilicum* cultured under controlled conditions for bactericidal application. *Mat Sci Eng C*. 2019; 98:250-255.
41. Ghabooli A, Mirzaei S. Biosynthesis of Silver Nanoparticles using *Aspergillus Flavus* and Investigation of some Effective Factors in its Production. *Biol J Micro*. 2018; 27: 80-94.
42. Raghad DH, Abdul J, Maryam MHM, Jawad M, Ahmed NA. Plants extracts as green synthesis of zirconium oxide nanoparticles. *J Genet Environ Conserv*. 2017; 5(1): 6-23.
43. Geethalakshmi K, Prabhakaran T, Hemalatha J. Dielectric studies on nano zirconium dioxide synthesized through co-precipitation process. *World Acad Sci Eng Technol*. 2012; 6(4): 256-279.
44. Walker GM. Yeast physiology and biotechnology; Chichester, UK, New York USA: John Wiley and Sons; 1998.
45. Walker GM. Yeasts. In: Schaechter, M., editor. *Eukaryotic Microbe*. Oxford, UK: Academic Press/Elsevier Science Publishers; 2011: 3-17.
46. Walker GM, Stewart GG. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*. 2016; 2(30):1-12.
47. Guocheng W, Fanhao M, Chuanxian D, Paul KC, Xuanyong L. Microstructure, bioactivity and osteoblast behavior of monoclinic zirconia coating with nanostructured surface. *Acta Biomater*. 2010; 6: 990-1000.
48. Augustine R, Augustine A, Kalarikkal L, Thomas S. Fabrication and characterization of biosilver nanoparticles loaded calcium pectinate nano-micro dual-porous antibacterial wound dressings. *Prog Biomater*. 2016; 5: 223-235.
49. Khoshnamvand M, Huo C, Liu J. Silver nanoparticles synthesized using *Allium ampeloprasum* L. leaf extract: Characterization and performance in catalytic reduction of 4-nitrophenol
24. Ehrlich F. Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 2006; 40(1): 1027-1047.
25. Lambrechts MG, Pretorius IS. Yeast and its importance to wine aroma-A Review. *South African J Enol Vitic*. 2000; 21: 97-129.
26. Simon-Nobbe B, Denk U, Pöll V, Rid R, Breitenbach M. The spectrum of fungal allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008; 145(1): 58-86.
27. Falahati M, Ghanbari S, Ebrahimi M, Ghazanfari M, Bazrafshan F, Farahyar S, Falak R. Fractionation and identification of the allergic proteins in *Aspergillus* species. *Curr Med Mycol*. 2016; 2(4): 37-45.
28. Asif AR, Oellerich M, Armstrong VW, Riemenschneider B, Monod M, Reichard U. Proteome of conidial surface associated proteins of *Aspergillus fumigatus* reflecting potential vaccine candidates and allergens. *J Proteome Res*. 2006; 5(4): 954-962.
29. Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62(1): 130-180.
30. Schneiter R, Di Pietro A. The CAP protein superfamily: function in sterol export and fungal virulence. *Biomol Concepts*. 2013; 4(5):519-525.
31. Frey SD, Elliott ET, Paustian K, Peterson GA. Fungal translocation as a mechanism for soil nitrogen inputs to surface residue decomposition in a no-tillage agroecosystem. *Soil Biol Biochem*. 2000; 32(5):689-698.
32. Frey SD, Six J, Elliott ET. Reciprocal transfer of carbon and nitrogen by decomposer fungi at the soil-litter interface. *Soil Biol Biochem*. 2003; 35(7):1001-1004.
33. Sinsabaugh RL, Moorhead DL. Resource allocation to extracellular enzyme production: a model for nitrogen and phosphorus control of litter decomposition. *Soil Biol Biochem*. 1994; 26(10): 1305-1311.
34. Higuchi T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci Technol*. 1990; 24(1):23-63.
35. Govindaraju K, Tamilselvan S, Kiruthiga V, Singaravelu G. Biogenic silver nanoparticles by *Solanum torvum* and their promising antimicrobial activity. *J biopesticides*. 2010; 3(1): 394-399.
36. Sathishkumar M, Sneha K, Yun YS. Green fabrication of zirconia nano-chains using novel *Curcuma longa* tuber extract. *Mater Lett*. 2013; 98:242-245.

- by evolutionary engineering. *Bosn j basic med sci*. 2018; 18(1):55-65.
58. Loghman-Estarki MR, Hajizadeh-Oghaz M, Edris H, Razavi RS. Comparative studies on synthesis of nanocrystalline Sc₂O₃-Y₂O₃ doped zirconia (SYDZ) and YSZ solid solution via modified and classic Pechini method. *CrystEngComm*. 2013; 15(29): 5898-5909.
59. Ghotekar S. A review on plant extract mediated biogenic synthesis of CdO nanoparticles and their recent applications. *Asian J Green Chem*. 2019; 3(2): 187-200.
60. Zarghani M, Akhlaghinia B. Green and efficient procedure for Suzuki-Miyaura and Mizoroki-Heck coupling reactions using palladium catalyst supported on phosphine functionalized ZrO₂ NPs (ZrO₂@ ECP-Pd) as a new reusable nanocatalyst. *Bull. Chem Soc Jpn*. 2016; 89(10):1192-1200.
61. Yan H, He J, Liu X, Wang H, Liu J, Ding X. Thermodynamic Investigation of the Hydrolysis Behavior of Fluorozirconate Complexes at 423.15–773.15 K and 100 MPa. *J Solution Chem*. 2020; 49(6):836-848.
62. Brown pL, Curti E, Grambow B. *Chemical Thermodynamics of Zirconium*. Amsterdam: Elsevier; 2005.
63. Rasaee I, Ghannadnia M, Baghshahi S. Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Satureja hortensis* treated with NaCl and its antibacterial properties. *Micropor Mesopor Mat*. 2018; 264: 240-247.
- and antioxidant activity. *J Mol Struct*. 2019; 1175: 90-96.
50. Li D, Kaner RB. Shape and aggregation control of nanoparticles: not shaken, not stirred. *J Am Chem Soc*. 2006; 128(3): 968-975.
51. Shanthi S, Tharani SSN. Green Synthesis of Zirconium Dioxide (ZrO₂) Nano Particles Using *Acalypha Indica* Leaf Extract. 2016; 3(4): 23-25.
52. Ghaseminezhad SM, Hamed S, Shojaosadati SA. Green synthesis of silver nanoparticles by a novel method: Comparative study of their properties. *Carbohydr Polym*. 2012; 89(2): 467-472.
53. Luo LB, Yu SH, Qian HS, Zhou T. Large-scale fabrication of flexible silver/cross-linked poly (vinyl alcohol) coaxial nanocables by a facile solution approach. *J Am Chem Soc*. 2005; 127(9): 2822-2823.
54. Sanghi R, Verma P. pH dependent fungal proteins in the 'green' synthesis of gold nanoparticles. *Adv Mater Lett*. 2010; 1(3): 193-199.
55. Pavia D, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JA. *Introduction to spectroscopy*. 5rd ed. USA: Cengage Learning; 2013.
56. Kumar RR, Priyadharsani KP, Thamaraiselvi K. Mycogenic synthesis of silver nanoparticles by the Japanese environmental isolate *Aspergillus tamarii*. *J Nanoparticle Res*. 2012; 14(5): 1-7.
57. Tekarslan-Sahin SH, Alkim C, Sezgin T. Physiological and transcriptomic analysis of a salt-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant obtained

Green Synthesis of Zirconia Nanoparticles Using *Saccharomyces cerevisiae* and *Colletotrichum gloeosporioides*

Maryam Ghannadnia*¹, Masuomeh Bagheri, ²

1. Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
2. Bachelor of Science Degree in Agricultural Engineering, Management and Development, Qom Payame Noor University, Qom, Iran

*Corresponding Author: ghannadnia@eng.ikiu.ac.ir

Abstract

Today, the use of fungi as source of bioactive compounds such as proteins, has been developed for biosynthesis of different types of nanoparticles. In this study, the characteristics of the biosynthesized zirconia nanoparticles (ZrO₂ NPs) were compared using *Saccharomyces cerevisiae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Extracellular biosynthesis of ZrO₂ NPs was carried out by adding 1 mM of K₂ZrF₆ to *S. cerevisiae* and *C. gloeosporioides* culture medium separately. Nanoparticle biosynthesis was confirmed by visual observation of color and transparency changes in the culture medium, UV-Vis spectrophotometry and XRD. FTIR results demonstrated the effects of some possible secretory compounds of the fungi such as protein, phenol and alcohol in the biosynthesis and stability process of the biosynthesized ZrO₂ NPs. The results of elemental analysis (EDAX) confirmed the biosynthesis of zirconia nanoparticles as well as the presence of some elements in organic compounds participating in the biosynthetic process. The effect of time on the biosynthesis of the nanoparticles was also investigated. The color and transparency changes of the culture media, peak formation at less than 300 nm in spectrophotometry confirmed the extracellular biosynthesis of ZrO₂ NPs and also XRD results confirmed the crystalline nature of the biosynthesized ZrO₂ NPs based on their crystallite size. The FESEM results showed that the most of the nanoparticles were amorphous and some were monoclinic in shape with sizes (19.49 and 35.60 nm) for *C. gloeosporioides* and (45.81 and 74.07 nm) for *S. cerevisiae*. The monoclinic structure of the biosynthesized nanoparticles was confirmed by UV, FTIR and XRD results.

Key words: Bioceramic, Zirconia nanoparticle, *Saccharomyces cerevisiae*, *Colletotrichum gloeosporioides*