زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دورهٔ 3، شمارهٔ 2، پاییز و زمستان 1391

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

بهروز محمدی[1]، مجتبی صلوتی[2*]، علی‌هانیلو[3]

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، کدپستی 45156-58145**
saloutim@yahoo.com
(دریافت مقاله: 90/11/10، پذیرش: 91/9/28)

چکیده - در روش‌های بیولوژیک از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، اکتینومیست‌ها و مخمرها برای تولید نانوذرات فلزی استفاده می‌شود. قارچ‌ها با ترشح آنزیم‌ها به مقدار زیاد، انتخاب مناسبی برای ساخت زیستی نانوذرات نقره است. هدف این پژوهش، تولید زیستی نانوذرات نقره به‌وسیله‌ی قارچ‌های جنس پنی‌سیلیوم جداشده از معدن سرب و روی زنجان است. پس از کشت اولیه، رشد کلونی‌ها و جداسازی قارچ‌های جنس پنی‌سیلیوم، 15 گرم از بیومس قارچی در محلول حاوی نیترات نقره‌ی 1 میلی‌مولار، 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 جداشده، 6 نوع قارچ پنی‌سیلیوم تشخیص داده شد که از بین آن‌ها تنها قارچ پنی‌سیلیوم بروی کامپاکتوم (*Penicillium brevicompactum*) توانایی ساخت نانوذرات نقره را داشت. تغییر رنگ محلول‌های واکنش، از بی‌رنگ به قهوه‌ای مایل به زرد، وجود بیشینه‌ی جذب در بازه‌ی طول موجی 425-406 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 میسلیوم‌ها، در اندازه‌ی 100-50 نانومتر و به شکل کروی تولید شده است. آزمایش‌های اسلاید کالچر، رشد روی آگار مخمر czapek و آگار کراتین سوکروز، نشان دادند که این قارچ، پنی‌سیلیوم بروی کامپاکتوم است.

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-12]

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-12]

1- مقدمه

نانوذرات نقره در زمینه‌های 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]. هم‌اکنون نانوذرات به دو روش فیزیکی و شیمیایی تولید می‌شوند. روش‌های فیزیکی و شیمیایی، افزون بر گران بودن، با آلودگی‌های زیست‌محیطی همراه است. تولید زیستی نانوذرات به‌خاطر سازگاری با محیط زیست و استفاده از تکنولوژی سبز، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این روش از گیاهان و میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و اکتینومیست‌ها برای تولید نانوذرات استفاده می‌شود. هنگامی که میکروارگانیسم‌ها در تماس با نمک یون‌های فلزی قرار می‌گیرند، این مواد را با سازوکار کاتالیستی احیا کرده و نانوذرات را به صورت خارج سلولی و داخل سلولی تولید می‌کنند. سازوکار تولید نانوذرات در میکروارگانیسم‌های مختلف متفاوت است [3]. در میان میکروارگانیسم‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها انتخاب مناسبی برای تولید نانوذرات نقره محسوب می‌شوند ولی قارچ‌ها به خاطر توانایی تولید مقدار زیادی متابولیت و آنزیم‌های احیاکننده، همچنین به دلیل کشت ساده و ارزان در مقیاس آزمایشگاهی و صنعتی، بی‌خطر بودن برای محیط زیست و توانایی احیا یک یا چند یون فلزی، به باکتری‌ها ترجیح داده می‌شوند [4].

پنی‌سیلیوم‌ها یکی از فراوان‌ترین قارچ‌های ساپروفیت موجود در خاک می‌باشند. قارچ‌های ساپروفیت روی خاک زندگی می‌کنند و گروه بزرگی از قارچ‌ها را شامل می‌شوند [5]. در سال 2009، *کتیرسان و همکارانش* به‌وسیله‌ی پنی‌سیلیوم فلوتانوم (*Penicillium fellutanum*)، نانوذرات نقره را به شکل کروی و در اندازه‌ی 2 تا 5 نانومتر تولید کردند [6]. در سال 2010، *ناوین و همکارانش*، نانوذرات نقره را به روش خارج سلولی در اندازه‌ی 52 تا 104 نانومتر به‌وسیله‌ی گونه‌ای از قارچ پنی‌سیلیوم تولید کردند [7]. بیشتر پژوهش‌ها روی قارچ‌های ساپروفیت خاک‌های سطحی و زمین‌های کشاورزی انجام شده است و شواهد کمتری در مورد قارچ‌های جداسازی‌شده از معادن وجود دارد [6-7]. به نظر می‌رسد استرس ناشی از فلزهای موجود در معادن می‌تواند در تولید متابولیت‌ها و آنزیم‌های قارچ‌ها 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 می‌شود میکروارگانیسم‌های موجود در این معادن بتوانند به استرس فلزی ایجادشده با فلز نقره، مقاوم و قادر به بقا و تولید آنزیم بیشتر در محیط‌های حاوی نیترات نقره شوند. هدف این پژوهش، تولید زیستی نانوذرات نقره به‌وسیله‌ی قارچ‌های پنی‌سیلیوم جداشده از معدن سرب و روی زنجان است.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد و محیط‌های کشت استفاده‌شده

همه‌ی مواد و محیط‌های کشت استفاده‌شده شامل سابرو دکستروز آگار (SDA)، پتیتو دکستروز آگار (PDA)،

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-12]

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

2-2- نمونه‌برداری از خاک معدن سرب و روی زنجان

نمونه‌های خاک با قاشق استریل از سه نقطه‌ی مختلف از معدن سرب و روی زنجان از عمق 3 تا 5 سانتی‌متری خاک تهیه و در ظروف پلاستیکی استریل حمل و پس از انتقال به آزمایشگاه، در دمای 4 درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. از نمونه‌های خاک، رقت 10^{-3} در آب مقطر تهیه و در محیط‌های کشت SDA، PDA، BHI، MEA و NA در 28 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. پس از 72 ساعت، قارچ‌ها جداسازی شدند [7].

2-3- جداسازی پنی‌سیلیوم‌ها

از بین قارچ‌های جداشده با توجه به رنگ سطح و پشت کلونی و آرایش فیالیدها در روش اسلاید کالچر، گونه‌های مختلف قارچ پنی‌سیلیوم جداسازی شد [7].

2-4- تهیه‌ی بیومس قارچی

برای تهیه‌ی بیومس، کلونی‌های پنی‌سلیوم جداسازی‌شده به طور جداگانه در 100 میلی‌لیتر محیط MYPG براث کشت داده شدند و در لرزاننده انکوباتور با حرکت ثابت 150 دور در دقیقه در 28 درجه سانتی‌گراد، 96 ساعت انکوبه شدند. بیومس‌های به‌دست‌آمده در سه مرحله سانتریفیوژ (3500 دور در دقیقه، 20 دقیقه، 10 درجه سانتی‌گراد) و با آب مقطر دیونیزه شست‌وشو داده شدند [8].

2-5- تولید زیستی نانوذرات نقره

15 گرم از هر گونه بیومس قارچی پنی‌سیلیوم جداسازی‌شده به 100 میلی‌لیتر محلول حاوی نیترات نقره 1 میلی‌مولار 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 بی‌رنگ به قهوه‌ای مایل به زرد [7 - 9] و اسپکتروفتومتری UV-vis (Shimadzu, UV Pharma spec 1700)، قبل و بعد از لیز سلول‌های قارچ در بازه‌ی طول موجی 350 تا 700 نانومتراستفاده شد. برای تأیید کریستالی بودن نانوذرات نقره تولیدشده از روش پراش اشعه‌ی ایکس (XRD, Philips, PW 1800) استفاده شد؛ بنابراین بیومس قارچی 24 ساعت در 60 درجه‌ی سانتی‌گراد خشک شد و سپس پودر به‌دست‌آمده 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. برش‌های نازکی از بیومس قارچی انکوبه‌شده در محلول نیترات نقره طبق روش *مورالی و همکارانش* [10] با اندکی اصلاحات، تهیه و پس از رنگ‌آمیزی بررسی شد. 1 میلی‌لیتر از بیومس قارچی بعد از تثبیت اولیه در گلوتارآلدئید 2/5 درصد و تثبیت ثانویه در تترواکسید اسمیوم و شست‌وشوهای لازم با بافر فسفات، با غلظت‌های متفاوتی از اتانول آب‌گیری شد. سپس نمونه‌ها سه بار و هر بار 15-20 دقیقه در نسبت‌های مختلف اکسید پروپیلن و رزین (3:1، 1:1 و 1:3) و سرانجام رزین خالص به مدت

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-12]

یک شبانه روز قرار داده شدند. بعد از قالب‌گیری، برش‌های بسیار نازکی از نمونه‌ها با دستگاه اولترامیکروتوم تهیه روی توری مسی مخصوص قرار داده شدند. در آخرین مرحله، برش‌ها با یورانیل استات 2 درصد و سیترات سرب 2 درصد، رنگ‌آمیزی و تصاویر با میکروسکوپ الکترونی عبوری تهیه شد.

2-7- شناسایی گونه پنی‌سیلیوم جداسازی‌شده

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

3- یافته‌ها

3-1- نتایج به‌دست‌آمده از کشت خاک

پس از فرایند ایزولاسیون، 16 نوع قارچ جداسازی شد که با انجام روش اسلاید کالچر، 6 گونه از آن‌ها، قارچ پنی‌سیلیوم تشخیص داده شد.

3-2- بررسی تولید نانوذرات نقره با مشاهده‌ی چشمی

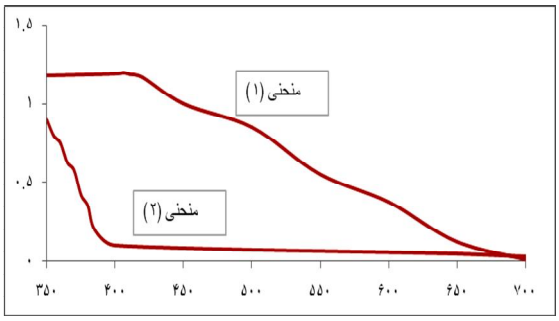
پس از تهیه‌ی بیومس از قارچ‌های پنی‌سیلیوم جداسازی‌شده و قرار دادن آن‌ها در محلول 1 میلی‌مولار نیترات نقره به مدت 72 ساعت، تنها در محلول واکنش یک گونه از پنی‌سیلیوم‌ها تغییر رنگ [از بی رنگ به قهوه‌ای مایل به زرد] ایجاد شد که نشان‌دهنده تولید نانوذرات نقره به‌وسیله‌ی این گونه از قارچ پنی‌سیلیوم بود (شکل 1).

شکل 1 بیومس قارچ پنی‌سیلیوم قبل (الف) و پس از (ب) قرار گرفتن در معرض محلول نیترات نقره. تغییررنگ محلول واکنش از بی‌رنگ به قهوه‌ای مایل به زرد، نشان‌دهنده تولید نانوذرات نقره است.

3-3- نتایج به‌دست‌آمده از اسپکتروفتومتری UV-vis

نتایج به‌دست‌آمده از اسپکتروفتومتری UV-vis سلول لیزشده، نشان‌دهنده‌ی یک پیک جذبی در بازه‌ی طول موجی 425-406 نانومتر بود. پهن شدن پیک جذبی نشان می‌دهد که نانوذرات نقره تولیدشده، طیفی از اندازه را دارند و مونودیسپرس نیستند (شکل2، منحنی 1)؛ همچنین محلول قارچی قبل از لیز سلول باکتری نیز اسکن شد که نتیجه آن در شکل 2 (منحنی 2) آمده شده است.

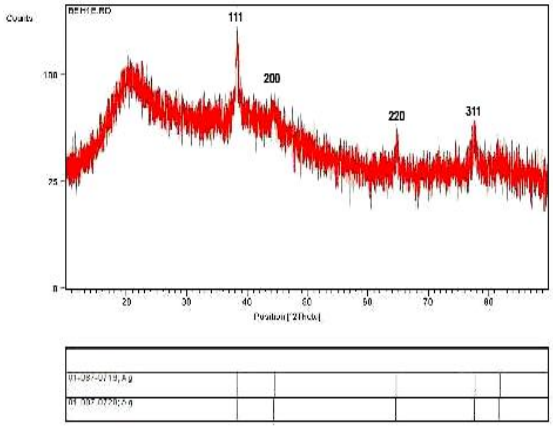
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-12]



شکل 2 منحنی 1، نمودار به‌دست‌آمده از اسپکتروفتومتری سلول‌های قارچ لیزشده است. مشاهده بیشینه‌ی جذب در بازه‌ی طول موجی 425-406 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 به‌دست‌آمده از XRD

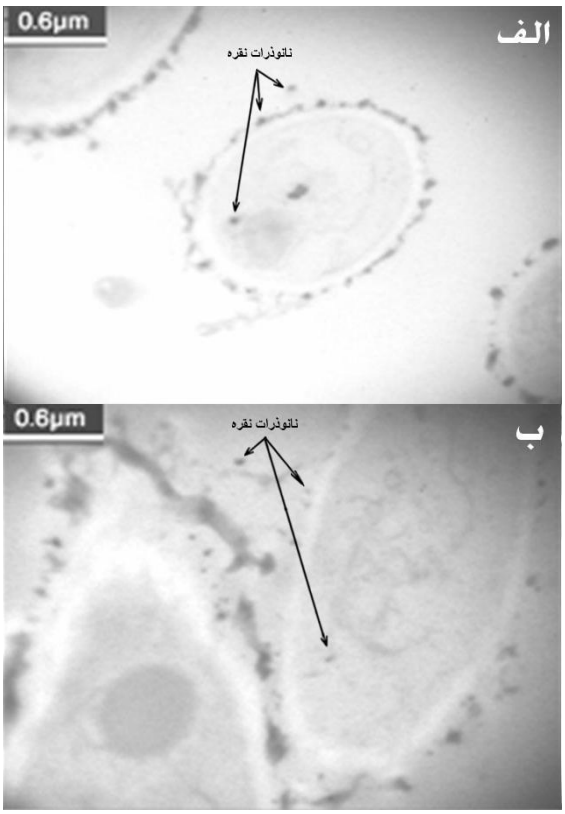
وجود پیک در نقاط (111)، (200)، (220) و (311) در نمودار به‌دست‌آمده از آنالیز XRD و مقایسه آن با نمودار استاندارد نقره نشان‌دهنده‌ی حضور نانوذرات کریستالی نقره در محلول واکنش بود (شکل 3).



شکل 3 نمودار به‌دست‌آمده از XRD تهیه‌شده از پودر بیومس قارچی و پیک‌های منطبق با استاندارد نقره.

3-5- نتایج به‌دست‌آمده از تصویربرداری TEM

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



شکل 4 تصاویر میکروسکوپ TEM تهیه‌شده از *پنی‌سیلیوم بروی کامپاکتوم*. حضور نانوذرات نقره در داخل و خارج سلول (در سطح میسلیوم‌ها) کاملاً مشخص است.

3-6- نتایج تعیین گونه‌ی قارچ پنی‌سیلیوم

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-12]

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 انجام‌شده، همچنین به این دلیل که پنی‌سیلیوم‌ها جزء فراوان‌ترین قارچ‌های ساپروفیت موجود در خاک است، در این مقاله، بررسی امکان تولید نانوذرات نقره به‌وسیله‌ی 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 جداسازی‌شده، تنها گونه بروی *کامپاکتوم* می‌تواند نانوذرات نقره را تولید کند. اندازه‌ی نانوذرات نقره، 100-50 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 لیزنشده با اسپکترفتومتری UV-vis، وجود نانوذرات نقره تأیید نشد و در ابتدا چنین نتیجه‌گیری شد که تولید نانوذرات نقره به‌وسیله‌ی این قارچ به صورت داخل سلولی است. ولی با بررسی‌هایی که با میکروسکوپ الکترونی TEM انجام شد، مشاهده شد که نانوذرات نقره در سطح میسلیوم‌ها درگیر است و به همین خاطر است که در محلول رویی واکنش یافت نمی‌شوند. درگیری نانوذرات با میسلیوم‌ها، احتمالاً به‌خاطر واکنش الکترواستاتیکی میان یون‌های نقره و گروه کربوکسیلات موجود در سطح میسلیوم‌ها است. این نتایج شبیه نتایج بررسی‌های *موخرجی و همکارانش*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-12]

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 پژوهش ایشان با مدت زمان انکوباسیون در این پژوهش (72 ساعت) برای تولید نانوذرات نقره احتمالا 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 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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-12]

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.

[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.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-12]