پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال هجدهم، شماره ۶، پی در پی ۹۶، صفحات ۳۱۰ تا ۳۱۹
بهمن و اسفند ۱۳۹۲

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۵/۲۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۱/۲

سنتز نانوذره‌ی نقره از نیترات نقره توسط عصاره‌ی کشت مخمر *Rhodotorula* sp. strain GM5

دکتر مراحم آشنگرف[*1]

۱. استادیار میکروبیولوژی، گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج

چکیده

سابقه و هدف: فناوری نانو رویکردهای جدیدی برای مبارزه و جلوگیری از بیماری‌ها از طریق استفاده از اتصال در مقیاس اتمی مواد می‌گشاید. در میان بهترین مواد با خاصیت ضد میکروبی، نانوذره‌ی نقره به عنوان یکی از پرکاربردترین نانوذرات در علوم پزشکی، دارویی و بهداشتی مورد استفاده قرار گرفته است. توسعه‌ی روش‌های زیستی تولید نانوذرات، به عنوان روشی سازگار با محیط زیست و ارزان، مطرح است. اگرچه اثرات سمی یون نقره برای اغلب میکروارگانیسم‌ها گزارش شده ولی گونه‌های مختلفی از میکروارگانیسم‌ها، از جمله سویه‌ی بومی مخمری غربال‌گری شده در این پژوهش، می‌تواند با احیای یون نقره به فرم عنصری آن در قالب نانوذره‌ی نقره، بر سمیت آن غلبه کند. هدف از تحقیق حاضر، استفاده از توان بالقوه‌ی سویه‌های جدید مخمری به عنوان زیست واکنشگر، برای احیای زیستی نیترات نقره به نانوذره‌ی نقره بود.

مواد و روش‌ها: ۱۱ سویه‌ی مخمری بر اساس مشاهدات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی تشخیصی، از خاک‌های جمع‌آوری شده در حوالی معادن طلا، واقع در شهرستان قروه از توابع استان کردستان، بر اساس تکنیک غنی سازی انتخابی، غربال‌گری و جداسازی شدند. سوپرناتانت‌های حاصل از سویه‌های مخمری جداسازی شده، به عنوان زیست واکنشگر، با محلول نیترات نقره با غلظت ۲/۵ میلی مولار در شیکر انکوباتوردار به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند و سویه‌ی مخمری که قادر به سنتز نانوذرات نقره بود، شناسایی شد. نانوذرات نقره تولیدی، توسط آنالیزهای طیف سنجی UV-visible، XRD، SEM و Particle size histogram بررسی شدند.

یافته‌ها: از بین سویه‌های مخمری غربال‌گری شده، تنها سویه‌ی GM5 قادر به سنتز خارج سلولی نانوذرات نقره بود. سویه‌ی مذکور از نظر ویژگی‌های ریخت شناسی، بیوشیمیایی و همچنین مولکولی، شناسایی و در جنس *Rhodotorula* (با شماره‌ی دسترسی KF543865 در بانک اطلاعات ژنی NCBI) قرار داده شد. نتایج به دست آمده از مشاهدات چشمی، اسپکتروفتومتری UV-visible و تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی SEM، پراش اشعه ایکس (XRD) و آنالیز توزیع اندازه‌ی ذرات، ثابت کرد که سوپرناتانت کشت مخمری *Rhodotorula* sp. strain GM5، قادر به احیای زیستی نیترات نقره به نانوذرات نقره به اشکال کروی با توزیع نسبتاً باریک اندازه‌ی ذرات و متوسط اندازه‌ی ذرات ۴۰ نانومتر بود.

نتیجه‌گیری: سنتز خارج سلولی نانوذرات نقره، بدون نیاز به مراحل پیچیده‌ی استخراج، می‌تواند با استفاده از سوپرناتانت کشت سویه‌ی مخمری GM5 به عنوان زیست واکنشگر زیستی ارزان و محافظ محیط زیست، جایگزین روش‌های فیزیکوشیمیایی جهت تولید نانوذرات نقره، مطرح شود. با توجه به اطلاعات ما، تاکنون هیچ مطالعه‌ای از تولید نانوذرات نقره در جنس مخمری *Rhodotorula* صورت نگرفته و در این پروژه برای نخستین بار، سنتز زیستی نانوذرات نقره در سویه‌ی مخمری *Rhodotorula* sp. strain GM5 گزارش شد.

واژگان کلیدی: نانوذره‌ی نقره، احیای زیستی، *Rhodotorula* sp. strain GM5

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Ashengroph M. Synthesis of silver nanoparticle from silver nitrate using culture extract of *Rhodotorula* sp. strain GM5. Pejouhandeh 2014;18(6):310-319.

مقدمه

نانوذرات، شامل ذرات جامد کلوئیدی با اندازه‌ای در محدوده‌ی ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر می‌باشند. این ذرات، مشتمل بر موادی با سطوح خارجی بسیار زیاد و ناهمگونی کم می‌باشند که پدیده‌های کوانتومی بروز می‌دهند. آنچه باعث ظهور علم فناوری نانو شده، نسبت بالای سطح به حجم می‌باشد که موجب گردیده مواد در مقیاس نانو، شروع به تغییر رفتار کرده و رفتار سطح بر رفتار توده‌ای غلبه کند (۱ و ۲). در واقع در این مقیاس، قوانین فیزیک کلاسیک از بین رفته و قوانین فیزیک کوانتومی وارد صحنه می‌شوند. تقریباً وقتی به مقیاس

*نویسنده مسؤول مکاتبات: مراحم آشنگرف؛ کردستان، سنندج، بلوار پاسداران، دانشگاه کردستان، صندوق پستی ۴۱۶، کدپستی: ۱۵۱۷۵-۶۶۱۷۷، تلفن و نمابر: ۶۶۲۴۱۳۳ (۰۸۷۱)؛ پست الکترونیک: m.ashengroph@uok.ac.ir

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]

نانو می‌رسیم خواص فیزیکوشیمیایی، نقطه ذوب و حتی رنگ، کاملاً متحول می‌شود. افزایش نسبت سطح به حجم باعث می‌شود که اتم‌های واقع در سطح نسبت به اتم‌های درون حجم ذرات، اثر بیشتری روی خواص فیزیکی ذرات داشته باشند. همچنین، افزایش نسبت سطح به حجم علاوه بر افزایش واکنش پذیری ذرات، فشار سطحی را تغییر داده و باعث می‌شود که فاصله‌ی بین اتم‌های ذرات با کاهش اندازه‌ی ذره، کاهش یابد که همین امر اثرات متقابلی بر خواص نوری، مغناطیسی، الکترونیکی و ترمودینامیکی ماده خواهد داشت (۳ و ۴). در حال حاضر، گستردگی و تنوع کاربردهای فناوری نانو به حدی است که صنعت، کشاورزی، محیط زیست، بهداشت و درمان، علوم دارویی، اقتصاد، تغذیه و بسیاری دیگر از جنبه‌های زندگی بشر، تحت تأثیر شگرف آن قرار گرفته است.

درسال‌های اخیر، تلاش‌های بسیار زیادی به منظور تولید نانو ذرات به دلیل خواص ویژه‌ی نوری، شیمیایی، الکتریکی و فوتو الکتریکی آنها صورت گرفته است. همین امر بیانگر استفاده‌های گوناگون این مواد در عرصه‌های مختلف همچون زیست واکنشگرها، علوم پزشکی، دارویی و بهداشتی، علوم زیستی، اپتیک، دانش داروهای زیستی، مکانیک، مغناطیس و انرژی است (۵). نانوذرات نقره به واسطه‌ی اهمیت زیادی که در صنایع پزشکی و در درمان و بهبود بیماری‌های عفونی (باکتریایی، قارچی، ویروسی و انگلی)، گوارشی، بیماری‌های پوستی از جمله جوش‌ها، انواع جراحات و سوختگی‌ها و همچنین تهیه‌ی محلول‌های خوراکی و ضدعفونی کننده‌های دست و سطوح دارد، ساخت آن نیز بسیار حایز اهمیت است (۶ و ۷).

تولید فیزیکوشیمیایی نانو ذرات نقره اغلب متحمل هزینه‌های بالا، سختی مسیر فرآیند سنتز، راندمان تولید کم و آلودگی‌های زیست محیطی بالا می‌باشد. از همین روی، با توجه به کاربرد رو به رشد نانوذرات نقره و نیاز روزافزون به توسعه‌ی روش‌هایی برای ساخت ابزار و وسایلی که آلودگی زیست محیطی نداشته باشند، بهترین روش برای تهیه‌ی نانوذرات نقره، استفاده از سیستم‌های زیستی به عنوان زیست-واکنشگر است که علاوه بر تولید انبوه با صرف هزینه‌ی کمتر، به دور از خطرات زیست محیطی صورت گرفته و نانوذرات زیستی تولید شده از لحاظ توزیع اندازه‌ی ذرات و پایداری، نسبت به سنتز فیزیکی و شیمیایی، یکنواخت‌تر هستند (۸).

اگرچه اثرات سمی یون نقره برای اغلب میکروارگانیسم‌ها گزارش شده ولی گزارش‌های متعددی برای سنتز نانوذرات نقره توسط گونه‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، قارچ‌های رشته‌ای، اکتینومیست‌ها و مخمرها وجود دارد (۲۱-۹). با این حال در مورد سنتز زیستی نانودرات نقره به وسیله‌ی سویه‌های مخمری، مطالعات نادری صورت گرفته که در این ارتباط تنها می‌توان به مطالعه‌ی Kowshik و همکارانش اشاره نمود (۲۲). در مطالعه‌ی صورت گرفته توسط Kowshik و همکارانش در سال ۲۰۰۳، از سویه‌ی مخمر MKY3، برای سنتز خارج سلولی نانوذرات نقره از یک محلول نیتراتی به منظور دستیابی به نانوذرات نقره با ابعاد ۲ تا ۵ نانومتری، در دما و فشار محیط استفاده شده است. در مطالعه‌ی حاضر، توان بالقوه‌ی سویه‌های بومی مخمری به عنوان زیست واکنشگر در احیای زیستی نیترات نقره به نانوذره‌ی نقره، مورد بررسی قرار گرفته و برای اولین بار در سطح مجامع ملی و بین‌المللی، سنتز خارج نانوذرات نقره توسط یک سویه‌ی بومی مخمری از جنس *Rhodotorula* sp. گزارش می‌شود.

مواد و روش‌ها

نمک نیترات نقره با خلوص بالای ۹۹ درصد از شرکت سیگما-آلدریچ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) خریداری شد. محلول‌های استوک نیترات نقره در آب دو بار تقطیر استریل، حل شده و پس از فیلتراسیون به وسیله‌ی فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرونی، در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در یخچال و به دور از نور نگهداری شدند. گلوکز، پپتون و عصاره‌ی مخمر مورد نیاز برای تهیه‌ی محیط‌های کشت YPD (گلوکز ۱۰ گرم در لیتر، پپتون ۲۰ گرم در لیتر و عصاره‌ی مخمر ۲۰ گرم در لیتر) از شرکت مرک (E. Merck, Darmstadt, Germany) خریداری گردید. در موارد لزوم، برای جامد کردن محیط کشت مذکور، به آن ۲ درصد آگار اضافه می‌شد. محیط کشت Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar حاوی ۵ گرم در لیتر پپتون، ۱۰ گرم در لیتر گلوکز، ۱ گرم در لیتر دی هیدروژن پتاسیم فسفات، ۰/۵ گرم در لیتر سولفات منیزیم، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر دی کلوران، ۰/۰۲۵ گرم در لیتر رزبنگال، ۰/۱ گرم در لیتر آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و ۱۵ گرم در لیتر آگار با pH برابر ۵/۶، از شرکت Quelab انگلستان، خریداری شد. اغلب مواد استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، از شرکت سیناژن (Cinnagen Company, Iran) تهیه شدند.

نمونه‌گیری از خاک‌های حوالی معادن طلا، واقع در شهرستان قروه از توابع استان کردستان، انجام شد. نمونه‌های خاک در ظرف‌های استریل جمع‌آوری و پس از انتقال به

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]

آزمایشگاه، تا هنگام استفاده، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از هر نمونه، ۱۰ گرم به ارلن‌های حاوی ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک (۸/۵ گرم در لیتر نمک سدیم کلراید) از محیط اضافه شد و سپس سری رقت تهیه شد. از هر رقت، ۲۰۰ میکرولیتر در محیط کلرامفنیکل رزبنگال آگار که به آنها غلظت مشخصی از نیترات نقره (۲/۵ میلی‌مولار) پس از استریل کردن از طریق پالایه‌های غشایی میلی‌پور با قطر سوراخ ۰/۲۲ میکرون افزوده شده بود، به روش کشت چمنی (Spread plate) با میله‌ی سرکج، کشت داده و پلیت‌ها به مدت ۵ روز در انکوباتور ۲۸ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. کلنی‌های مخمری رشد یافته بر روی محیط، پس از لام گرفتن و مشاهده در زیر میکروسکوپ و اثبات این موضوع که مخمر هستند، به منظور خالص‌سازی به محیط‌های YPD آگار حاوی ۲/۵ میلی‌مولار نیترات نقره، انتقال داده شدند. مخمرهای جداسازی شده، به محیط‌های اسلنت انتقال یافتند. محیط مورد استفاده، همان محیط YPD است که به منظور خالص‌سازی مخمر استفاده گردیده است. از هر محیط دو عدد اسلنت تهیه گردید. یک اسلنت به عنوان کشت مادر نگهداری و از محیط دیگر به عنوان منبعی جهت آزمایش‌های مربوط به سنتز زیستی نانوذرات نقره استفاده شد.

برای بررسی توانایی سنتز خارج سلولی نانوذرات نقره توسط سویه‌های مخمری جداسازی شده، یک لوپ از مخمرهای تازه رشد یافته (۲۴ ساعته) بر روی محیط YPD جامد را به محیط YPD مایع (۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت YPD مایع در یک ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری) تلقیح کرده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور ۲۰۰ rpm و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، گرماگذاری گردید. از این محیط به منظور تلقیح در محیط‌های کشت استفاده گردید. یک درصد از سوسپانسیون‌های مخمری تهیه شده را در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع YPD در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد بر روی شیکر مدور (۲۰۰ دور در دقیقه)، به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. برای جدا کردن توده‌ی زیستی مخمری از محیط کشت مایع YPD، از سانتریفیوژ یخچالی با دور g ×۵۰۰۰ در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. پس از سه بار شستشو با آب دو بار تقطیر استریل، ۱۰ گرم از توده‌ی زیستی مذکور در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر استریل بود، ریخته شد و به مدت ۴۸ ساعت در شیکر انکوباتوردار در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از طی دوره‌ی گرماگذاری، توده‌های سلولی مخمری با استفاده از سانتریفیوژ جدا شده و از سوپرناتانت‌های عاری از توده‌ی زیستی مخمری جمع‌آوری شده به عنوان زیست واکنشگر برای احیای زیستی نیترات نقره به نانوذرات نقره استفاده شد. برای این منظور، به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از سوپرناتانت برداشت شده مخمری، محلول نیترات نقره (با غلظت نهایی ۲/۵ میلی‌مولار) اضافه شده و به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط دمایی ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۲۰۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد. به طور همزمان، از محلول نیترات نقره (بدون تلقیح سوپرناتانت کشت مخمری) به عنوان محیط کنترل استفاده گردید. خصوصیت نانو ذرات نقره‌ی تشکیل شده در محلول واکنش زیست تبدیلی، مورد آنالیزهای UV، XRD و SEM قرار گرفت.

شناسایی سویه‌ی مخمری GM5 بر مبنای ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی، بر اساس استاندارد طبقه‌بندی Kurtzman and Fell (۲۰۰۰) انجام شد (۲۳). جهت تشخیص مورفولوژی سلولی با میکروسکوپ نوری، لام مرطوب از کشت مایع دو روزه در محیط کشت YPD تهیه و بررسی گردید. جهت انجام شناسایی جذب قندها، از محیط YNB (yeast nitrogen base) استفاده گردید. این محیط که حاوی انواع نوترینت‌ها، ویتامین‌ها، فاکتورهای رشد و عناصر کمیاب می‌باشد، به صورت آماده از شرکت HIMDEIA هند خریداری شد. سپس جهت تأیید جنس سویه‌ی مخمری مذکور از تعیین ترادف ژن‌های 18S rRNA و ITS (Internal Transcribed Spacers) استفاده شد. استخراج DNA ژنومی سویه‌ی GM5 به روش تخریب با کمک دانه‌های شیشه‌ای (glass bead disruption) روی سوسپانسیون حاصل از کشت ۲۴ ساعته مخمر در محیط کشت YPD مایع انجام شد. در این روش، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط YPD تلقیح شده با سویه‌ی مخمری را برداشته و در دور g × ۳۰۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. سپس، توده‌ی زیستی مخمری رسوب داده شده به وسیله‌ی آب مقطر استریل، کاملاً شستشو داده شد. پس از آن، سوسپانسیون مخمری در دور g × ۳۰۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از تخلیه‌ی محلول رویی، به توده‌ی سلولی رسوب یافته، ۴۰۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% SDS, 2% Triton X-100, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl) اضافه و ورتکس شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از محلول فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل (به ترتیب با نسبت های ۲۵ و ۲۴ و ۱) و همچنین ۴۰۰ میلی‌گرم از دانه‌های شیشه‌ای با قطر ۰/۵ میلی‌لیتر اضافه شد.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]

سپس به مدت ۱۵ دقیقه به شدت هم زده شد (در این مرحله برخورد شدید بین دانه های شیشه ای و سلول‌های مخمری، باعث تخریب کامل دیواره‌ی سلولی می‌شود. حضور دترجنت‌ها، فنل و سایر مواد موجود، باعث سست شدن دیواره‌ی سلولی و حذف پروتئین‌ها و چربی‌های موجود در دیواره می‌شود و بنابراین زمینه‌ی تخریب کامل دیواره با استفاده از دانه‌های شیشه‌ای فراهم می‌شود). پس از هم زدن، نمونه به مدت پنج دقیقه با دور g × ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی برداشته و به لوله‌ی فالکون استریل دیگری انتقال داده شد. هم حجم محلول رویی برداشته شده، محلول کلروفرم-ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ به ۱) اضافه و سپس با استفاده از ایزوپروپانول سرد DNAی استخراج شده، رسوب داده شد. نمونه، به مدت ۵ دقیقه، با دور g×۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از آن، به منظور حذف نمک‌های اضافی و سایر ناخالصی‌ها، DNAی رسوب یافته، با استفاده از اتانول ۸۰ درصد شستشو داده شد. مخلوط حاصله به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. پس از آن به مدت پنج دقیقه، با دور g × ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شده و سپس مایع رویی به وسیله سمپلر خارج شد. پس از تبخیر کامل اتانول، به رسوب حاصل، ۵۰ میکرولیتر بافر TE یا آب مقطر تزریقی اضافه و تا زمان انجام فرآیند PCR در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، نگهداری شد (۲۴). پس از استخراج DNAی ژنومی سویه‌ی مخمری GM5، با استفاده از دو پرایمر همگانی UL18 و UL28 که از آنها برای شناسایی و طبقه‌بندی انواع یوکاریوت‌ها استفاده می‌شود، تکثیر ژن مربوطه انجام پذیرفت (۲۵). توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مربوطه، در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. توالی‌های نوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده شده جهت تعیین جنس سویه‌ی GM5.

Name	Orientation sequence (5′-3′)
UL18	Forward- tgtacacaccgcccgtc
UL28	Reverse- atcgccagttctgcttac

واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش انجام شد. مواد واکنش دهنده در این فرآیند PCR در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. مواد و مقادیر مورد نیاز برای انجام واکنش PCR در سویه‌ی GM5.

مواد	حجم لازم برای واکنش با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر	غلظت نهایی
بافر 10 X PCR	5 µl	1 X
مخلوط dNTP (40 mM)	1 µl	800 µM
$MgCl_2$ (50 mM)	2 µl	2 mM
پرایمر Forward	1 µl	0.5 µM
پرایمر Reverse	1 µl	0.5 µM
Taq polymerase (5U/µl)	1 µl	0.1 U
DNA الگو	2 µl	20 µg/ml
آب تزریقی	اضافه نمودن تا حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر	-

شرایط دمایی واکنش در این فرآیند PCR عبارت بودند از دمای واسرشت شدن اولیه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل تکرار دمای واسرشت شدن ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه. بعد از اتمام این سیکل، دمای طویل شدن نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. پس از الکتروفورز محصول حاصل از PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تحت شرایط بافری TAE و در ولتاژ ۸۰، باند تکثیری از روی ژل جدا شده و پس از خالص‌سازی به وسیله‌ی کیت تخلیص PCR شرکت Fermentase، جهت تعیین ترادف ژنی (Sequencing) به شرکت فزاپژوه جهت ارسال به آزمایشگاه Macrogen در کشور کره‌ی جنوبی، ارسال گردید.

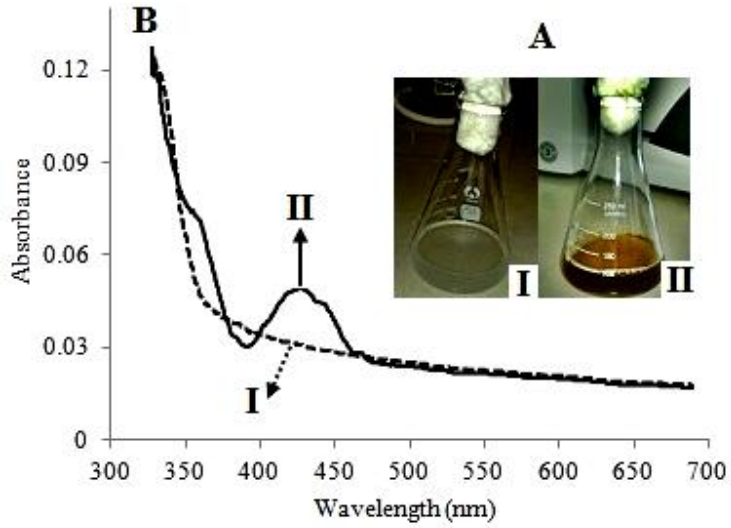
نانوذرات نقره‌ی تشکیل شده در محلول واکنش زیستی، با استفاده از مشاهدات ظاهری (تغییر رنگ محلول واکنش)، آزمایشات اسپکتروفتومتری UV-visible (Analytik Jena's spectrophotometer SPECORD 210, Carel Zeiss Technology, Germany)، روش پراش پرتو ایکس (X-ray Diffractometer, D8ADVANCE, Bruker, Germany)، بررسی توزیع ذرات و میانگین اندازه‌ی ذرات با استفاده از Particle size analyzer (Malvern Instruments Ltd., Mastersizer 2000, UK) و همچنین

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]

تصویر برداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی (KYKY-EM3200, KYKY Technology Development Ltd., China) مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله‌ی اول، تشکیل نانوذرات با مشاهده‌ی تغییر رنگ محلول واکنش حاوی سوپرناتانت کشت باکتری و محلول نیترات نقره ($AgNO_3$) مشخص شد. به منظور تعیین طیف جذبی محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، نمونه‌ها با سرعت g × ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شد. سپس آنالیزهای Particle size analyzer، XRD و SEM با هدف تأیید کریستالی بودن نانو ذرات تشکیل شده و همچنین بررسی شکل و اندازه‌ی آنها انجام پذیرفت.

یافته‌ها

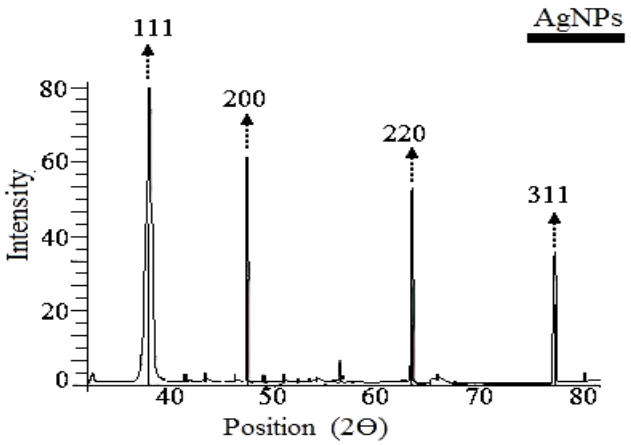
از بین ۱۱ سویه‌ی مخمری با قابلیت تحمل‌پذیری نسبت به یون سمی نقره، تنها سوپرناتانت کشت سویه‌ی GM5، جدا شده از معدن طلای قروه، قادر به احیای نیترات نقره به نانوذرات نقره، در غلظت ۲/۵ میلی مولار بود که با ایجاد تغییر رنگ محلول واکنش از سفید به قهوه‌ای شناسایی شد (شکل ۱ قسمت AII). میکروارگانیسم‌هایی که به عنوان زیست واکنشگر، قادر به احیای زیستی نیترات نقره هستند، رنگ محلول نیترات نقره را به صورت ارغوانی، قهوه‌ای، زرد و خاکستری تغییر می‌دهند که دلیل ایجاد رنگ‌های متفاوت، مکانیسم‌های متفاوت در احیای زیستی یون‌های نقره به نانوذرات نقره است که منجر به تولید نانوذرات با ابعاد و اشکال متفاوت شده و در نهایت رنگ‌های مختلفی از نانوذرات ظاهر می‌شود (۷). آنالیز نمونه‌ها با اسپکتروفتومتری UV-vis، یک پیک جذبی مشخص را در طول موج ۴۳۵ نانومتر (پیک اختصاصی برای نانوذرات نقره) نشان داد که بیانگر وجود نانوذرات نقره در محلول واکنش است (شکل ۱- قسمت BII). بر اساس منابع معتبر، بیشینه‌ی پیک جذبی نانوذرات نقره، در طول موج‌های ۴۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر می‌باشد (۲۶).



شکل ۱. مشاهدات چشمی و طیف سنجی UV-visible جهت تأیید سنتز خارج سلولی نانوذرات نقره توسط سویه‌ی مخمری GM5. A: سوپرناتانت مخمر GM5 در محلول نیترات نقره (۲/۵ میلی مولار) در ابتدای واکنش (I) و ۴۸ ساعت پس از واکنش احیای زیستی (II). B: طیف‌های UV-visible اسپکتروفتومتری حاصل از سوپرناتانت مخمر GM5 در محلول نیترات نقره در ابتدای واکنش (I) و ۴۸ ساعت پس از واکنش احیای زیستی (II). در واکنش‌های احیای زیستی مذکور از شرایط دمایی ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۲۰۰ rpm استفاده گردید.

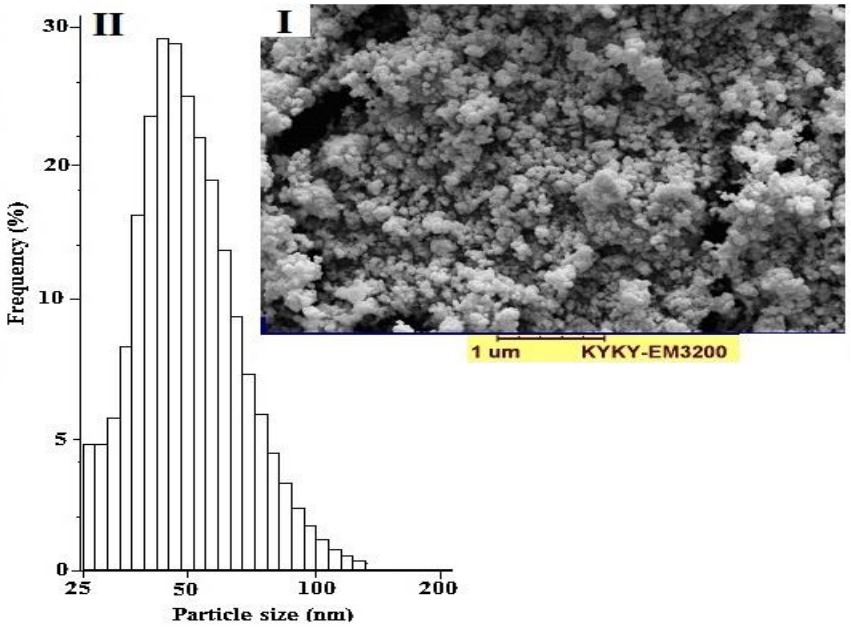
در ادامه‌ی این پژوهش، آنالیز XRD به منظور اثبات نانوکریستال‌های فلزی نقره انجام گرفت. براساس یافته‌های به دست آمده که در شکل ۲ نشان داده شده است، نانوکریستال‌های فلزی نقره در سطوح ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰ و ۳۱۱، به ترتیب، پیک‌هایی با مقادیر $38/2^o$، $46/4^o$، $64/6^o$ و $77/6^o$ را نشان داد که با نمونه‌ی استاندارد نانوکریستال‌های نقره کاملاً همخوانی دارد (۲۷).

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]



شکل ۲. آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD) نانو ذرات نقره سنتز شده توسط سویه‌ی مخمری GM5.

میکروگراف‌های حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و Particle size analyzer نیز سنتز نانوذرات کروی با توزیع نسبتاً باریک اندازه‌ی ذرات ۲۵ تا ۱۲۵ نانومتر و متوسط اندازه‌ی ذرات ۴۰ نانومتر را نشان داد (شکل ۳).

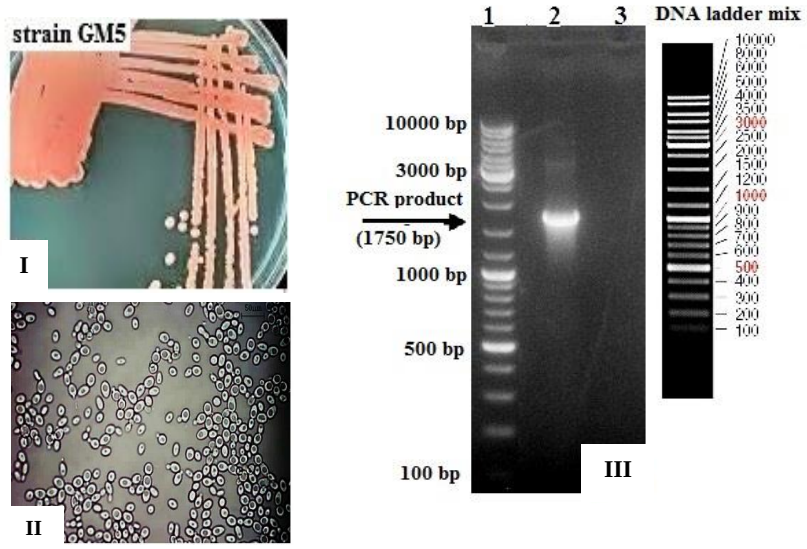


شکل ۳. عکس‌های تهیه شده از میکروسکوپ الکترونی SEM (I) و آنالیز توزیع نانوذرات نقره (II) سنتز شده توسط سویه‌ی مخمری GM5.

پس از قطعی شدن توانایی تولید نانوذرات نقره توسویه‌ی مخمری GM5، شناسایی سویه‌ی منتخب با استفاده از روش‌های فنوتیپی و مولکولی، صورت پذیرفت. سویه‌ی مخمری GM5 که براساس آنالیزهای ظاهری و مشاهدات دستگاهی، قابلیت احیای زیستی نیترات نقره به نانوذرات نقره را دارا بود، انتخاب و بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی تشخیصی متداول مخمرها، مورد شناسایی قرار گرفت (۲۳) و به طور موقت به عنوان *Rhodotorula* sp. تشخیص داده شد. ویژگی‌های مورفولوژیک و کشتی این سویه، در شکل ۴ (I و II) نشان داده شده است. سویه‌ی GM5، از نظر ماکروسکوپی،

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]

دارای کلنی به رنگ قرمز تا صورتی بوده و از نظر میکروسکوپی به صورت تک سلولی و فاقد ریسه بوده و به شکل کروی یا بیضوی‌های منفرد، دوتایی و یا گروهی دیده می‌شوند و معمولاً با جوانه زدن تکثیر می‌یابند (شکل ۴II). جهت شناسایی دقیق سویه‌ی GM5، ابتدا DNA ژنومی استخراج و سپس ژن کد کننده‌ی نواحی ITS و 18S rDNA از طریق پرایمرهای همگانیUL18F و UL28R مورد واکنش PCR قرار گرفت (شکل ۴III). همان‌گونه که در شکل ۴ قابل مشاهده است، محصول PCR مناسب در ناحیه‌ی ۱۷۵۰ pb نمایان شده که بیانگر خلوص DNAی مورد استفاده جهت تعیین توالی می‌باشد.



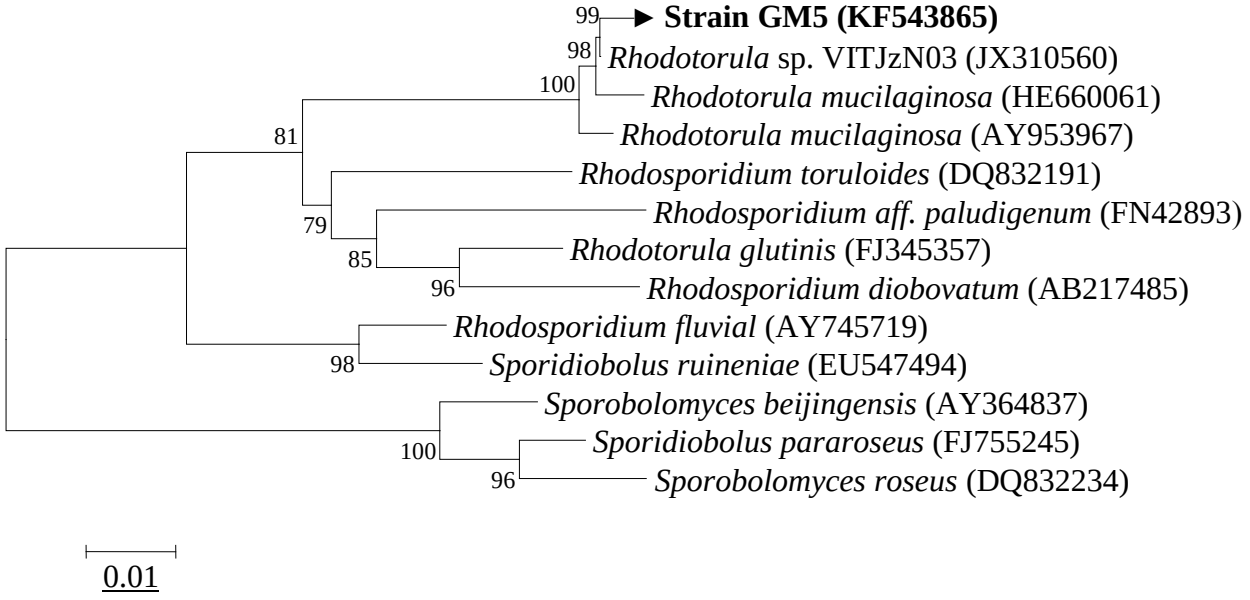
شکل ۴. کلنی سویه‌ی مخمری GM5 در محیط YPD آگار (I) و شکل میکروسکوپی آن (II)، الکتروفورز محصول PCR ژنوم سویه‌ی مخمری GM5 (III). ستون 1: DNA مارکر، ستون 2: سویه GM5، ستون 3: کنترل منفی.

پس از مشخص شدن توالی ژن سویه‌ی مذکور و بلاست نمودن آن در سایت اینترنتی NCBI، قارچ مورد نظر تعیین هویت شد. بر اساس نتایج حاصل از بلاست، این سویه دارای مشابهت بیش از ۹۹ درصدی با سویه‌ی ثبت شده *Rhodotorula* sp. VITJzN03 (با شماره‌ی دسترسی JX310560 در سایت اینترنتی NCBI) می‌باشد. در ادامه، با ترسیم درختچه‌ی فیلوژنی بر پایه‌ی روش neighbor-joinig با استفاده از نرم افزار MEGA-4 (۲۸) مشخص شد که این سویه در میان سویه‌های ثبت شده، نزدیک‌ترین قرابت ژنتیکی را با سویه‌های مخمری از جنس *Rhodotorula* دارد (شکل ۵).

بحث

فناوری نانو با مواد و ساختارهایی که ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و زیستی منحصر به فردی داشته و دارای اندازه‌های بسیار کوچکی می‌باشند، به وجود آمده است. دسترسی به نانوذرات، فواید فراوانی در علوم پزشکی، دارویی، بهداشتی، دامپزشکی، صنایع غذایی و نساجی دارد. نانوذرات فلزی به دلیل برخورداری از توان بالقوه‌ی کاربردی بالا، توجه زیادی را به خود جلب نموده و افق‌های جدیدی را در زندگی نوین علوم و بهداشت، نمایان ساخته است. از میان نانوساختارهای با خواص ضد میکروبی، نانوذرات نقره به علت دارا بودن خواص کاتالیستی و ضدمیکروبی بالا، دارای جایگاه ویژه‌ای می‌باشند (۲۹). مقاومت دارویی و ظهور میکروب‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان یک معضل بهداشتی مهم، سلامت عمومی را تهدید می‌کند. با توجه خواص ضدباکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد انگلی نانوذرات نقره، با استفاده از آنها می‌توان سطوح ضدمیکروبی ایجاد نمود و به عنوان پوششی برای تمام سطوح مثلاً در بیمارستان‌ها، مکان‌های عمومی و حتی منازل، استفاده نمود.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]



شکل ۵. درختچه‌ی فیلوژنی سویه‌ی مخمری GM5 رسم شده به روش Neibour-joining. درخت فیلوژنتیک با الگوریتم Kimura-2 parameters ترسیم شد. بررسی اعتبار شاخه‌های درخت با استفاده از الگوریتم Bootstrap analysis و با ۱۰۰ بار نمونه‌گیری صورت گرفت. اعداد داخل پرانتز مربوط به شماره‌ی ژنی قابل دستیابی در بانک اطلاعات ژنی NCBI می‌باشد.

نانوذرات نقره در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، در غلظت‌های بسیار پایین، دارای اثرات ضد میکروبی قوی بوده و با توجه به مزیت‌هایی از قبیل عدم سمیت و اثرات سوء جانبی بر سلول‌های انسانی، وسیع‌الطیف بودن و همچنین عدم مقاومت میکروبی نسبت به این نانوذرات که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارد، در حال حاضر به عنوان جایگزین مناسب آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های گوارشی، بیماری‌های پوستی، عفونت‌های بیمارستانی و همچنین برای ضدعفونی کردن زخم‌ها و جراحات عفونی، مطرح می‌باشد (۷ و ۳۰). با توجه به مشکلات عمده‌ای که در روش‌های فیزیکوشیمیایی مورد استفاده در سنتز نانوذرات نقره نظیر احیای شیمیایی، احیای فتوشیمیایی، استفاده از لیزر و رادیولیز وجود دارد، استفاده از میکروارگانیسم‌های مختلف به عنوان نانوکارخانه‌های بالقوه‌ی سبز برای سنتز نانوذرات همسو و سازگار با محیط زیست، توزیع یکنواخت اندازه‌ی ذرات، پایدار و همچنین مقرون به صرفه بودن از نظر اقتصادی، پیشنهاد شده است (۳۱ و ۳۲). در این پروژه، توان بالقوه‌ی سویه‌های بومی مخمری، در احیای زیستی نیترات نقره به نانوذرات نقره، مورد ارزیابی قرار گرفت. استفاده از سویه‌های مخمری در تولید نانوذرات به دلیل وجود مقادیر قابل ملاحظه‌ای از آنزیم‌ها و پروتئین‌های ویژه در این میکروارگانیسم‌ها، سهولت کار با آنها در آزمایشگاه و سهولت دسترسی به مقادیر زیادی توده‌ی سلولی و ایمن بودن، از جذابیت بالایی برخوردار است (۲۲). در این راستا، ۱۱ سویه‌ی مخمری، از خاک‌های جمع‌آوری شده از معادن طلا واقع در قروه، از توابع استان کردستان، براساس الگوی تحمل‌پذیری نسبت به یون نقره، جداسازی گردید. در ادامه‌ی این تحقیق، سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از سوپرناتانت‌های کشت سویه‌های مخمری مذکور، مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس یافته‌های به دست آمده، تنها سوپرناتانت سویه‌ی مخمری GM5، قادر به تولید زیستی نانو ذرات نقره بود. از سوپرناتانت عاری از توده‌ی سلولی مخمری به عنوان زیست واکنشگر برای تهیه‌ی نانوذرات نقره از محلول نیترات نقره در یک واکنش زیست تبدیلی استفاده گردید. براساس نتایج بدست آمده، سوپرناتانت سویه‌ی GM5 بعد از مواجهه با محلول نیترات نقره در غلظت ۲/۵ میلی مولار، قادر به احیای زیستی نیترات نقره به نانوذرات نقره به اشکال کروی با توزیع نسبتاً باریک اندازه‌ی ذرات و متوسط اندازه‌ی ذرات ۴۰ نانومتر بود. مزیت سنتز خارج سلولی نانوذره‌ی نقره توسط سویه‌ی مخمری GM5 جدا شده در تحقیق حاضر در این است که تولید داخل سلولی نانوذره‌ی مذکور، پرهزینه بوده و نیاز به مراحل اضافی جهت استخراج نانو ذرات از درون سلول دارد (۳۳). بنابراین، به وسیله‌ی سویه‌ی مذکور می‌توان به تولید خارج سلولی نانوذرات اکسید روی، بدون نیاز به مراحل پیچیده‌ی استخراج، دست یافت. در ادامه‌ی این پژوهش، سویه‌ی GM5 به عنوان سویه‌ی برتر انتخاب گردید و مورد شناسایی ریخت شناسی و

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]

مولکولی قرار گرفت. نتایج آنالیزهای مورفولوژیک و فیلوژنیک نشان داد که سویه‌ی مذکور دارای بیشترین مشابهت با *Rhodotorula* sp. می‌باشد. توالی نوکلئوتیدی ژن rDNAی سویه‌ی GM5 با شماره دسترسی KF543865 در بانک اطلاعات ژنی NCBI قابل دسترسی می‌باشد. اگرچه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها در تولید زیستی نانوذرات نقره به صورت عمدتاً داخل سلولی به کار گرفته شده‌اند (رجوع شود به بخش مقدمه)، با این حال، مطالعات صورت گرفته در زمینه‌ی تولید خارج سلولی نانوذرات نقره با استفاده از سوپرناتانت کشت میکروبی، محدود به چندین جنس قارچی از جمله کپک‌های رشته‌ای *Aspergillus fumigatus*، *Trichoderma asperellum*، *Phaenerochate chrysosporium* و سویه‌ی مخمری MKY3 (۲۲ و ۳۴) بوده و در سویه‌های باکتری، تنها در باکتری بیماری‌زا *Klebsiella pneumoniae* (۱۹) و سویه‌ی اکتینومیست *Streptomyces* sp. ERI-3 (۲۰) گزارش شده است و بنابراین لزوم نیاز به تحقیقات گسترده‌تر حس می‌شود. امید است نتایج این طرح پژوهشی بتواند در سطح مجامع داخلی و بین‌المللی در راستای معرفی سویه‌های میکروبی جدید و همچنین معرفی سویه‌های مذکور به مراکز علمی پژوهشی، مراکز دانشگاهی و نانوزیست‌فناوری در راستای تحقیقات بیشتر با هدف بهره‌برداری تجاری از زیست واکنشگرهای غربال‌گری شده جهت استفاده‌ی عملی در علوم پزشکی، دارویی و بهداشتی، مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق، در قالب طرح پژوهشی به شناسه ۴/۴۲۳۷۷/۱۳۹۱ با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان انجام گرفته است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان نهایت سپاس و قدردانی به عمل می‌آید.

REFERENCES

1. Jain PK, Huang X, EI-Sayed IH, EI-Sayed MA. Review of some interesting Surface Plasmon Resonance- enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. Plasmonics 2007;2(3):107–18.

2. Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. Adv Drug Delivery Rev 2008;60 (11):1289–306.

3. Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. Adv Colloid Interface Sci 2010;156(1–2):1–13.

4. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomedicine NBM 2009;6(2): 257–62.

5. Mandal D, Bolander ME, Mukhopadhyay D, Sarkar G, Mukherjee P. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. Appl Microbiol Biotechnol 2006;69(5):485–92.

6. Salata OV. Applications of nanoparticles in biology and medicine. J Nanobiotechnol 2004;2(3):1–6.

7. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. J Colloid Interface Sci 2004;275(1):177–82.

8. Mandal D, Bolander ME, Mukhopadhyay D, Sarkar G, Mukherjee P. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. Appl Microbiol Biotechnol 2006;69(5):485–92.

9. Klaus T, Joerger R, Olsson E, Granqvist CG. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96(24):13611–4.

10. Zhang H, Li Q, Lu Y, Sun D, Lin X, Deng X, et al. Biosorption and bioreduction of diamine silver complex by Corynebacterium. J Chem Technol Biotechnol 2005;80(3):285–90.

11. Nair B, Pradeep T. Coalescence of nanoclusters and formation of submicron crystallites assisted by *Lactobacillus* strains. Cryst Growth Des 2002;2(4):293–8.

12. Mouxing FU, Qingbiao LI, Daohua SUN, Yinghua LU, Ning HE, Xu DENG, et al. Rapid preparation process of silver nanoparticles by bioreduction and their characterizations. Chinese J Chem Eng 2006;14(1):114–7.

13. Barud HS, Barrios C, Regiani T, Marques RFC, Verelst M, Dexpert-Ghys J, et al. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. Mat Sci Eng C 2008;28(4):515–8.

14. Pugazhenthiran N, Anandann S, Kathiravan G, Kanna-ian N, Prakash U, Crawford S, et al. Microbial synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus* sp. J Nanopart Res 2009;11(7):1811–5.

15. Shivai O, Salouti M, Sorouri R, Khadivi Derakhshan F. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Bacillus* bacteria isolated from Sungun Copper. Pejouhandeh 2012;17(3):142–7. (Full Text in Persian)

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]

16. Parikh RP, Singh S, Prasad BLV, Patole MS, Sastry M, Shouche YS. Extracellular synthesis of crystalline silver nanoparticles and molecular evidence of silver resistance from *Morganella* sp.: towards understanding biochemical synthesis mechanism. Chem Biochem 2008;9(9):1415–22.

17. Lengke MF, Fleet ME, Southam G. Biosynthesis of silver nanoparticles by filamentous cyanobacteria from a silver (I) nitrate complex. Langmuir 2007;23(5):2694–9.

18. Gade AK, Bonde P, Ingle AP, Marcato PD, Duran N, Rai MK. Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nanoparticles. J Biobased Mater Bioenergy 2008;3(2):123–9.

19. Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Nanomedicine 2007; 3(2):168–71.

20. Faghri ZN, Salouti M. Extracelluar biosynthesis of silver nanoparticles using cell filtrate of *Streptomyces* sp. ERI-3. Scientia Iranica 2011;18(6):1631–5.

21. Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar SR, Khan MI, et al. Fungus mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelia matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis. Nano Lett 2001;1:515–9.

22. Kowshik M, Ashtaputre S, Kharrazi S, Vogel W, Urban J, Kulkarin S, et al. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. Nanobiotechnology 2003;14(1):95–100.

23. Kurtzman CP, Fell JW. The yeasts: a taxonomic study. 4th ed. Amsterdam: Elsevier; 2000. p. 1–525.

24. Yamada Y, Makimura K, Mirhendi H, Ueda K, Nishiyama Y, Yamaguchi H, et al. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. Jpn J Infect Dis 2002;55:122–5.

25. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JT. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press; 1990.

26. Kalimuthu K, Suresh Babu R, Venkataraman D, Bilal M, Gurunathan S. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. Colloids Surf B Biointerfaces 2008;65(1):150–3.

27. Magudapathy P, Gangopadhyay P, Panigrahi BK, Nair KGM, Dhara S. Electrical transport studies of Ag nanocrystallites embedded in glass matrix. Physics B 2001;299(1–2):142–6.

28. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007;24(8):1596–9.

29. Gericke M, Pinches A. Biological synthesis of metal nanoparticles. Hydrometallurgy 2006;83(1-4):132–40.

30. Alkam OIE. Bacteriostases of polyester non moves after enter antibacterial finishing with nano sized fundamental of microbiology. Benjamin: Cuming Publishing Company; 1991. p. 709–91.

31. Bhainsa KC, Souza SFD. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigates*. Colloids Surf B Biointerfaces 2006;47(2):160–4.

32. Prabhu S, Poulose EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. Nano Lett 2012;2(32):1–10.

33. Ahmad A, Senapati S, Islam Khan M, Kumar R, Ramani R, Srinivas V, et al. Intracelluar synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* sp. Nanotechnology 2003;14(7):824–8.

34. Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. Adv Colloid Interface Sci 2010;156(1–2):1–13.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-02]