مجـلـه‌ی علمـی، پژوهـشی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۰، شماره‌ی ۷۸، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۱، صفحات ۴۷ تا ۵۶

بیوسنتز داخلی و خارجی نانوذرات طلا توسط قارچ رایزوپوس اوریزا

زینب شیخ‌لو[۱]، دکتر مجتبی صلوتی[۲]، زهره فرهمندکیا[۳]، ساناز مهمازی[۴]، علی عینلو[۵]

نویسنده‌ی مسئول: زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، دانشکده‌ی علوم، گروه میکروبیولوژی saloutim@yahoo.com

دریافت: ۹۰/۳/۱۰ پذیرش: ۹۰/۶/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: *از نانوذرات طلا در زمینه‌های زیادی مانند تشخیص و درمان سرطان، انتقال دارو و ژن و تشخیص DNA و پروتئین استفاده می‌شود. قارچ‌ها به علت توانائی‌شان در ترشح مقدار زیاد آنزیم، کاندیدای بسیار خوبی برای بیوسنتز نانوذرات هستند. هدف از تحقیق حاضر تولید زیستی نانوذرات طلا با استفاده از قارچ رایزوپوس اوریزا بود.*

روش بررسی: *نمونه‌برداری از خاک معدن مس اهر انجام شد. بیومس حاصل از قارچ های جداسازی شده با محلول $HAuCl_4$ در شیکر انکوباتور به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد و گونه‌های قادر به سنتز نانوذرات طلا شناسایی شدند. تولید نانو ذرات طلا با استفاده از اسپکتروفوتومتری UV-vis، تفرق اشعه‌ی ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) بررسی گردید.*

یافته‌ها: *در این تحقیق ۸ نوع قارچ از خاک معدن جدا شد که از میان آن‌ها تنها قارچ رایزوپوس اوریزا قادر به سنتز نانوذرات طلا شد. تولید نانوذرات طلا با مشاهده‌ی تغییر رنگ محلول واکنش از زرد به ارغوانی و با ایجاد یک پیک مشخص در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتری UV-vis تأیید گردید. آنالیز XRD نانوذرات حاصل اثبات کرد که ذرات سنتز شده به صورت نانوکریستال‌های طلا می‌باشند. تصاویر تهیه شده به کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد که قارچ رایزوپوس اوریزا نانوذرات طلا را به صورت داخل سلولی و خارج سلولی به شکل‌های کروی و سه گوش و با مونودیسپرسیتی بالا سنتز می‌کند.*

نتیجه‌گیری: *قارچ رایزوپوس اوریزا قادر به سنتز نانو ذرات طلا به صورت داخل سلولی و خارج سلولی با اندازه‌ی ۱۰ تا ۷۰ نانومتر است. این روش می‌تواند به عنوان یک روش زیستی جایگزین روش‌های شیمیایی و فیزیکی جهت تولید نانو ذرات طلا مطرح شود.*

واژگان کلیدی: نانوذرات طلا، سنتز بیولوژیکی، قارچ رایزوپوس اوریزا

مقدمه

نانو ذرات طلا دارای خصوصیات فیزیکی و شیمیایی منحصربه فردی مانند پایداری بسیار بالا، مقاوم بودن به گرما و توانایی بالا در جذب و انتشار نور هستند و به اندازه‌های گوناگون و شکل‌های مختلف مانند کروی، میله‌ای، کریستالی، مثلثی و مارپیچی سنتز می‌شوند. نانو ذرات طلا کاربرد گسترده‌ای در زمینه‌های پزشکی مانند تشخیص و درمان

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان
۲- دکترای تخصصی فیزیک پزشکی، دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان
۳- کارشناسی ارشد مهندسی محیط زیست، مربی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۴- دانشجوی دکترای تخصصی ژنتیک پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان
۵- کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان

سرطان، دارورسانی، استفاده در بیوسنسورها، تشخیص DNA و پروتئین‌ها و حذف میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از آب‌های آلوده دارند (۱). یکی از جنبه‌های مهم در فناوری نانو، توسعه‌ی روش‌های آزمایشگاهی برای سنتز تکرار پذیر نانو موادی است که از نظر اندازه، ترکیب شیمیایی و شکل قابل کنترل باشند. به طور کلی سه روش برای سنتز نانو ذرات طلا وجود دارد که به ترتیب روش‌های شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی نام دارند (۲). در بین این روش‌ها، در درجه‌ی نخست روش‌های شیمیایی قرار دارند که قادر به تولید مقادیر بالایی از نانوذرات در زمان نسبتا کوتاه با یک کنترل اندازه‌ی تقریبا مناسب هستند (۳). ولی عیب این روش‌ها در آن است که بسیار انرژی‌بر بوده و به دلیل استفاده از مواد شیمیایی سمی، باعث تولید پساب‌های خطرناک برای محیط زیست می‌شوند (۴). اغلب روش‌های فیزیکی سنتز کننده‌ی نانوذرات هم مانند رادیولیزیز (خردایش تشعشعی) و ترمولیزیز (خردایش گرمایی)، مسیر ساخت مشکلی دارند. به‌علاوه، این روش‌ها بسیار زمان‌بر بوده و نیازمند دما و فشار بالا هستند که شرایط را مشکل‌تر می‌سازد (۵). با توجه به کاربرد رو به رشد نانو ذرات طلا و نیاز روز افزون به ارایه‌ی روش‌هایی برای ساخت نانوذراتی که آلودگی‌های زیست محیطی در بر نداشته باشند، ضرورت تولید انبوه این نانوذرات توسط سیستم‌های زیستی احساس می‌شود (۶). سنتز میکروبی نانوذرات، اشاره به پدیده‌ای دارد که به وسیله‌ی فرآیندهای بیولوژیکی یا واکنش‌های آنزیمی اتفاق می‌افتد. این فرآیندهای زیست‌سازگار به عنوان "تکنولوژی سبز" در نظر گرفته می‌شوند. سابقاً از میکروارگانیسم‌ها برای استخراج فلزات استفاده می‌شد و امروزه از این موجودات تک سلولی و پرسلولی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، اکتینومیست‌ها، مخمرها و جلبک‌ها برای تولید نانوذرات فلزی استفاده می‌شود (۷). در حقیقت اغلب میکروارگانیسم‌ها در غلظت‌های بالای یون‌های فلزی زنده مانده و رشد می‌کنند که این به دلیل توانایی آن‌ها در مبارزه با شرایط استرس است. قارچ‌ها به دلیل کشت ساده و ارزان در مقیاس آزمایشگاهی و صنعتی، ترشح آنزیم‌های فراوان، بی‌خطر بودن برای محیط زیست، دست کاری آسان، توانایی در احیای یک یا چند یون فلزی، تولید حجم بالا از نانوذرات و کاهش هزینه‌های مالی به باکتری‌ها ترجیح داده می‌شوند (۸). قارچ‌های ساپروفیت، گروه بزرگی از قارچ‌ها هستند که هم در خاک و هم بر روی مواد آلی یافت می‌شوند. این قارچ‌ها حاوی مقدار زیادی آنزیم می‌باشند که با ترشح آن‌ها به خارج از سلول، ترکیبات پیچیده را به مواد ساده و کوچک تجزیه می‌کنند (۹). از قارچ‌های ساپروفیت می‌توان به رایزوپوس اشاره کرد. رایزوپوس اوریزا، قارچی از خانواده‌ی موکوراسه است که از نظر شکل ظاهری کلنی و ساختمان میکروسکوپی بسیار شبیه به جنس موکور است. ژانگ و همکارانش طی مطالعاتی که در سال ۲۰۰۹ بر روی قارچ پنی‌سیلیوم انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که این قارچ توانایی سنتز نانوذرات طلا را به صورت داخل سلولی با مورفولوژی کروی دارد (۱۰). در ایران نیز زهرا رنجبر نوازی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ با استفاده از قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس، نانوذرات نقره را به صورت خارج سلولی تولید کردند (۱۱). در تحقیقی که در سال ۲۰۱۱ توسط خدیوی و همکارانش گزارش گردید نشان داده شد که باکتری‌های رودوکوکوس جدا شده از معدن مس اهر قادر به تولید نانوذرات طلا هستند. لذا این معدن جهت جداسازی قارچ‌های قادر به تولید نانوذرات طلا انتخاب گردید (۱۲). هدف از تحقیق حاضر تولید بیولوژیکی نانوذرات طلا به کمک قارچ‌های جدا شده از خاک معدن مس اهر (در شمال غربی ایران) می‌باشد تا علاوه بر ترویج روش‌های زیستی و دوست‌دار محیط زیست، یک سویه‌ی بومی قارچ در ایران جهت تولید نانوذرات طلا معرفی شود.

روش بررسی

مواد لازم: مواد شیمیایی و محیط‌های کشت مورد استفاده شامل سابرو دکستروز آگار (SDA)، پتیتو دکستروز آگار (PDA)، عصاره‌ی مغز و قلب (BHI)، عصاره‌ی مالت آگار ۴٪ (EMA)، نوترینت آگار (NA) و محلول کلرید طلا ($HAuCl_4. 3H_2O$)، از شرکت سیگما خریداری شد.

نمونه‌برداری از خاک معدن مس اهر: از ۱۲ نقطه‌ی مختلف معدن مس اهر نمونه‌برداری انجام شد. برای این کار، ۱۰ سانتی‌متر از خاک سطحی کنار زده شد. نمونه‌های خاک با استفاده از یک بیلچه به صورت مورب برداشته شد و در ظرف‌های استریل پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل و در یخچال نگهداری شد (۱۳).

کشت خاک: ۱۰ گرم از خاک‌های نمونه‌برداری شده در ۹۰ میلی‌لیتر از آب مقطر حل شد و در محیط‌های مختلف شامل SDA، PDA، BHI، EMA، NA، جهت رشد قارچ‌ها کشت داده شد. محیط‌های کشت در pH ۶، به مدت ۳ تا ۷ روز در انکوباتور ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرما گذاری شدند. لازم به ذکر است که برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها در محیط‌های کشت، از کلرامفنیکل با غلظت ۰/۰۵ گرم در لیتر استفاده گردید (۱۴).

جداسازی قارچ‌ها و تهیه‌ی بیومس از آن‌ها: از تمام قارچ‌های رشد یافته، تک کلنی تهیه شد. برای تهیه‌ی بیومس، کلنی‌های هر یک از قارچ‌ها، وارد ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری که حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط براث MYPG بودند، شدند و به مدت ۹۶ ساعت در شیکر انکوباتور ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ دور در دقیقه گرما گذاری شدند (۱۵).

مخلوط کردن بیومس قارچی با محلول $HAuCl_4$: برای جدا کردن بیومس از محیط براث از سانتریفیوژ با دور ۲۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده گردید. پس از سه بار شستشو، ۵ گرم از بیومسی که فاقد هرگونه ناخالصی بود در ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری که حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول آبی $HAuCl_4$ با pH ۲ و غلظت 10^{-3} مولار بود، ریخته شد و به مدت ۷۲ ساعت در شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد (۱۰). جهت تعیین بهترین شرایط تولید نانوذرات طلا، آزمایش در pH های ۲تا۶ و در غلظت‌های ۱تا ۳ میلی مولار محلول کلرید طلا تکرار گردید.

مشاهده‌ی ظاهری تولید نانوذرات طلا: قبل از این‌که از دستگاه خاصی برای اثبات تولید نانوذرات استفاده شود می‌توان با مشاهده تغییر رنگ مخلوط بیومس و $HAuCl_4$، از رنگ زرد به رنگ ارغوانی به سنتز نانوذرات طلا پی برد (۱۵).

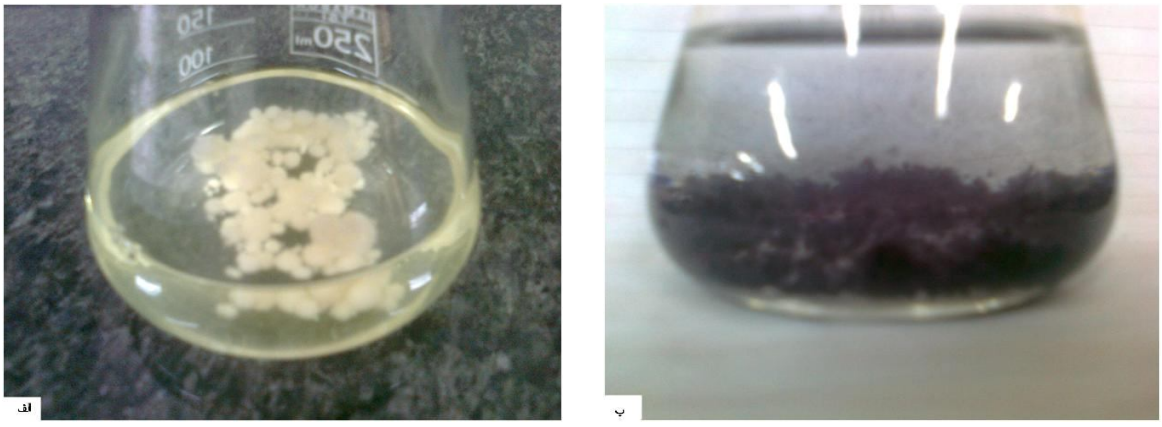
مشاهدات دستگاهی جهت تائید سنتز نانوذرات طلا: برای اطمینان از وجود نانوذرات طلا از اسپکتروفتومتری UV-vis (Shimadzu, UV Pharma Spec 1700) استفاده شد. پس از لیز کردن قارچ‌ها با استفاده از دترجنت، حدود ۳ میلی‌لیتر از سوپرناتانت محلول واکنش در کووت ریخته شد و جذب آن در طول موج‌های ۴۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر خوانده شد (۱۶). جهت مقایسه، طیف سنجی محلول طلا نیز به عنوان شاهد در همان طول موج‌ها انجام گردید. جهت تائید کریستالی بودن نوع فلز تولید شده از روش پراش اشعه‌ی X (XRD, Philips PW 1800) استفاده شد. برای این منظور بیومس ارغوانی رنگ به مدت ۲۴ ساعت در فور با دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، خشک گردید و سپس پودر حاصل مورد بررسی قرار گرفت (۹). برای پی بردن به محل تولید نانوذرات طلا در قارچ‌ها و هم‌چنین برای تعیین شکل و اندازه‌ی نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM, Philips Model EM 208S) استفاده شد (۱۶). آماده سازی نمونه برای میکروسکوپ TEM به صورت زیر انجام شد. بیومس قارچ قادر به تولید نانوذرات طلا، به منظور فیکس اولیه در گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد قرار داده شد و سپس دو بار با بافر فسفات شستشو داده شد. زمان شستشو بار اول، ده دقیقه و بار دوم، یک ساعت

به طول انجامید. برای تثبیت ثانویه، نمونه به مدت یک ساعت به همراه تتروکسیدازسیوم (اسمیوم) در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از یک ساعت، با بافر فسفات شستشو داده شد. نمونه با الکل‌هایی با درجات ۲۵، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۳×۱۰۰ آب گیری و سپس سه بار و هر بار به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در اکسید پروپیلن قرار داده شد. در مرحله‌ی بعدی، نمونه در درجات مختلف رزین و اکسید پروپیلن با نسبت‌های ۱:۳ و ۱:۱ و ۳:۱ قرار داده شد. سپس در رزین خالص به مدت ۲ تا ۳ ساعت قرار گرفته، بعد از این مدت، قالب‌گیری انجام شد. بعد از قالب‌گیری، قالب به مدت ۳-۲ روز متوالی در فور قرار داده شد. برش‌های نازکی از نمونه‌ی در قاب گرفته شده با دستگاه اولترامیکروتیوم تهیه و سپس یکی از برش‌ها بر روی گرید مسی با مش (سوراخ) ۲۰۰ قرار داده شد. در آخرین مرحله، برش‌ها با یوراسیل استات ۲ درصد و سیترات سرب ۲ درصد رنگ آمیزی شدند (۱۷).

تعیین گونه قارچ‌ها: پس از طی دوره انکوباسیون، قارچ‌های قادر به تولید نانوذرات طلا با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و پارامترهای مربوط به رشد در محیط کشت‌های مالت اکسترکت آگار (Malt Extract Agar) و یا اوتمیل آگار (Oatmeal Agar) تعیین گونه گردیدند.

یافته‌ها

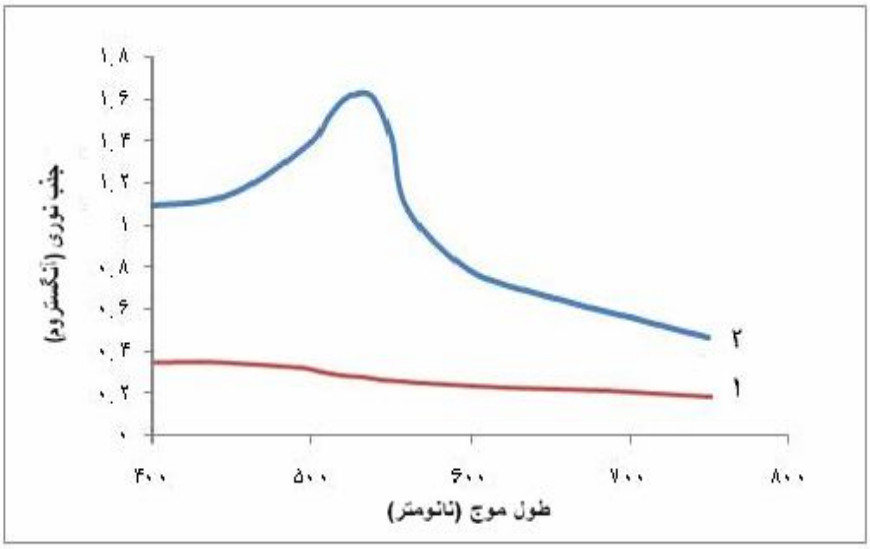
طی کشت خاک در محیط‌های مختلف، ۸ نوع قارچ شامل آلترناریا، تریکودرما، کلادوسپوریوم، موکور، آلشریا، رایزوپوس، کرایزوسپوریوم و نیگروسپورا از معدن مس اهر جدا شدند که از بین آن‌ها فقط قارچ رایزوپوس قادر به تولید نانوذرات طلا شد. بیومس این قارچ که ۴۸ ساعت بعد از انکوباسیون در محیط MYPG تشکیل یافته بود، با محلول آبی یون‌های طلا مخلوط شد. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، رنگ سوسپانسیون حاصل بعد از ۲۰ ساعت از زرد به ارغوانی تغییر پیدا کرد. نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیکی و پارامترهای مربوط به رشد در محیط کشت، نشان داد که قارچ مورد نظر رایزوپوس اوریزا است.



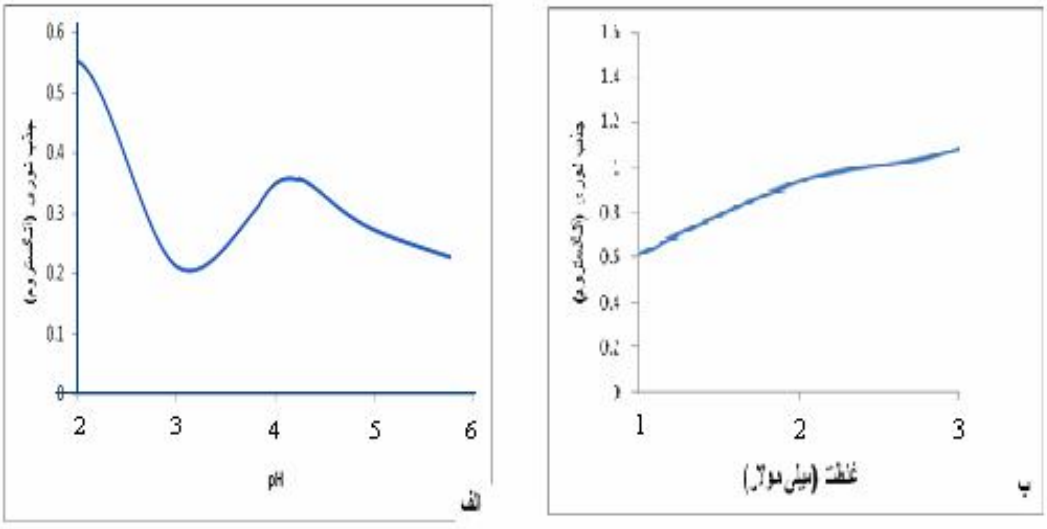
شکل ۱: بیومس قارچ رایزوپوس اوریزا در محلول $HAuCl_4$، در ابتدای واکنش (الف) و ۲۰ ساعت بعد از واکنش (ب)

طیف UV به دست آمده از نمونه‌ی قارچی رایزوپوس اوریزا، بعد از کامل شدن واکنش، نشان داد که باندهای جذبی قوی در طول موج ۵۴۰ نانومتر متمرکز شده‌اند که اثبات کننده‌ی حضور نانوذرات طلا در محلول ارغوانی رنگ می‌باشد

(نمودار ۱). بررسی‌های انجام شده در مورد بهینه سازی شرایط تولید نانوذرات طلا نشان داد که بیشترین میزان تولید نانوذرات طلا در pH ۲ و غلظت ۳ میلی مولار محلول کلرید طلا اتفاق می‌افتد (نمودار ۲).



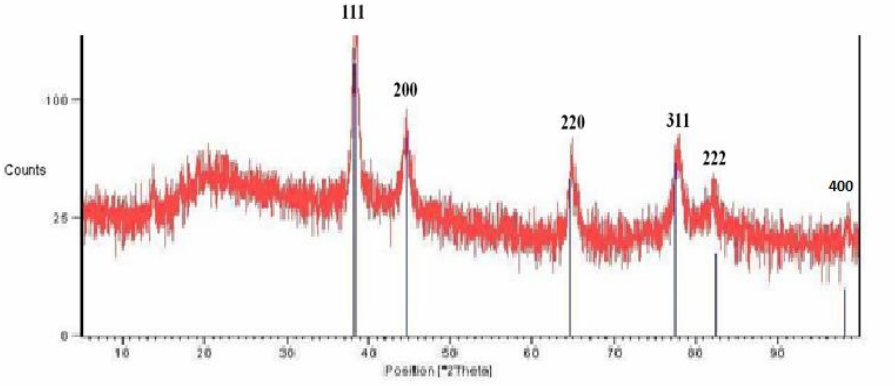
نمودار ۱: طیف حاصل از طیف سنجی UV-vis گزارش شده از بیومس قارچ رایزوپوس اوریزا قبل (منحنی ۱) و بعد از (منحنی ۲) مواجه شدن با محلول $HAuCl_4$ یک میلی مولار و pH ۲.



نمودار ۲: منحنی جذب نوری میزان تولید نانوذرات طلا توسط قارچ رایزوپوس اوریزا در pH (الف) و غلظت (ب) های مختلف محلول طلا

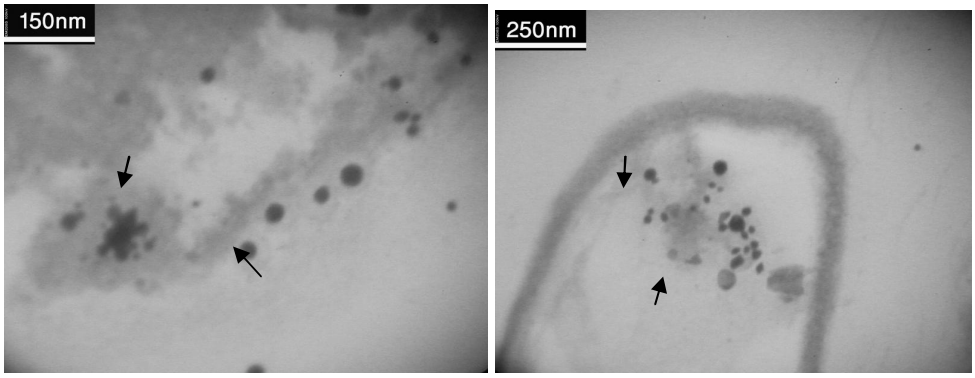
بعد از آنالیز قارچ مورد نظر با روش XRD، نمودار ۳ به دست آمد. طی مقایسه‌ی نمودار به‌دست آمده از قارچ رایزوپوس اوریزا با نمودار استاندارد طلا مشخص شد که هر دو نمودار صد درصد با هم، هم‌خوانی دارند و

همگی در نقـاط معینـی ماننـد (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱) و (۲۲۲) پیک دادهانـد. پـس اطمینـان حاصـل شـد کـه فلـز تولید شده نانوکریستال‌های طلا می‌باشد.



نمودار ۳: الگوی XRD گزارش شده از نانوذرات طلای تولید شده توسط قارچ رایزوپوس اوریزا.

در تصاویر تهیه شده با بزرگنمایی‌های مختلـف بـه وسـیله‌ی میکروسکوپ الکترونـی TEM از قـارچ رایزوپـوس اوریـزا مشخص شد که نانوذرات تولید شـده توسـط ایـن قـارچ بـه صورت داخل سلولی و خـارج سـلولی، بـا گـستره انـدازه‌ی ۱۰ تا ۷۰ نانومتر و به شکل‌هـای کـروی و سـه گـوش و بـا مونودیسپرسیتی بالا بودند (شکل ۲).



شکل ۲ : عکس‌های TEM تهیه شده از نانوذرات طلای سنتز شده به صورت داخل سلولی (عکس سمت چپ) و خارج سلولی (عکس سمت است) از قارچ رایزوپوس اوریزا.

بحث

امـروزه فنـاوری سـبز (بیوتکنولـوژی) بـه دلیـل پـاک و غیرسمی بودن برای محیط زیست اهمیت فراوانی یافته است. میکروارگانیـسم‌هـای بـسیاری ماننـد بـاکتری‌هـا، قـارچ‌هـا، اکتینومیست‌ها و مخمرها قادر به تولید نانوذرات فلزی هـستند که از بین آن‌هـا، قـارچ‌هـا بـه خـاطر توانـایی‌شـان در سـنتز آنزیم‌های فراوان و هم‌چنین سنتز نانوذرات بی‌خطر و پربازده که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می‌باشند، کاندید مناسـبی برای سنتز نانوذرات فلزی هستند (۱۱و ۸). بیشتر مطالعاتی که

در سال‌های اخیر راجع به تولید نانوذرات طلا در دنیا صورت گرفته است؛ درباره‌ی سنتز آن‌ها توسط باکتری‌هایی مانند استرپتومایسس، سودوموناس، شوانلا و گیاهانی از قبیل یونجه، برگ شمعدانی و سویا بوده است. در تحقیقاتی هم که درباره‌ی تولید نانوذرات به وسیله‌ی قارچ‌ها انجام شده است اغلب از قارچ‌های مانند فوزاریوم، ورتیسیلیوم، پنی‌سیلیوم و آسپرژیلوس برای سنتز نانوذرات فلزی مانند مس، کادمیوم، نقره و طلا استفاده شده است (۱۹و۱۸). در این بررسی از بین ۸ نوع قارچ جداسازی شده از معدن مس اهر، تنها قارچ رایزوپوس قادر به سنتز نانوذرات طلا شد. نتایج نشان داد که این قارچ قادر به تولید داخل سلولی و خارج سلولی نانوذرات طلا به اشکال مختلف و در سایز ۱۰تا ۷۰ نانومتر می‌باشد. تحقیق حاضر، اولین گزارش در مورد سنتز نانوذرات طلا توسط رایزوپوس گونه اوریزا می‌باشد. شاید علت این‌که بقیه‌ی قارچ‌ها نتوانستند نانوذرات طلا را تولید کنند این بود که آن‌ها آنزیم‌های لازم برای تبدیل یون‌های طلا به نانوذرات طلا را نداشتند.

تولید نانوذرات طلا با استفاده از قارچ رایزوپوس برای اولین بار توسط بینوپیرا در سال ۲۰۱۰ انجام شد (۲۰). او توانست نانوذرات طلا را به کمک سلول‌های فیلتر شده‌ی غیرفعال این قارچ به صورت خارج سلولی در PH ۷ سنتز کند. اندازه‌ی ذرات سنتز شده ۲۵ تا۳۰ نانومتر و به شکل کروی بودند. در تحقیق حاضر نانوذرات طلا به صورت داخل سلولی و خارج سلولی با استفاده از بیومس زنده‌ی قارچی و با سایز ۱۰تا ۷۰ نانومتر و به شکل‌های کروی و سه گوش و به صورت منفرد تولید شدند. هم‌چنین در طی مقایسه‌ای که بین تحقیق حاضر و مطالعات شانکر و همکارانش انجام شد، مشاهده شد که شانکر موفق شده بود با استفاده از قارچ اندوفیت کلوتوتریکتوم که از برگ شمعدانی جدا سازی شده بود، نانوذرات طلا را تولید کند. شانکر برای نگهداری قارچ تولید کننده از روش اسلاید کالچر کردن در محیط پتیتو دکستروز آگار استفاده کرده بود،، ولی در بررسی حاضر برای حفظ قارچ‌های تولید کننده‌ی نانوذرات، از روش نگهداری در آب مقطر و دمای انجماد ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده شد. نگهداری قارچ‌ها با روش کشت مجدد روش خوبی برای حفظ آن‌ها نیست چون ممکن است طی ساب کالچر کردن متوالی، قارچ‌ها دچار جهش شوند و خاصیت تولید کنندگی نانوذرات را از دست بدهند. علاوه بر آن این روش تنها برای نگهداری قارچ‌ها به مدت یک ماه مناسب می‌باشد. در صورتی که در روش‌های به کار برده شده در تحقیق حاضر، قارچ‌های تولیدکننده‌ی نانوذرات طلا به مدت یک سال حفظ می‌شوند بدون آن‌که تغییری در عملکردشان صورت بگیرد (۲۱).

نتایج حاصل از بهینه‌سازی شرایط تولید نانوذرات نشان داد که استفاده از pH ۲ و غلظت ۳ میلی مولار محلول طلا منجر به تولید بیشترین مقدار نانوذرات در کمترین زمان ممکن می‌شود. به طوری که با افزایش pH محلول طلا از ۲ به سمت pH ۶ میزان تولید نانوذرات کاهش و زمان تولید آنها نیز افزایش می‌یابد (دیرتر تولید می‌شوند). به عنوان مثال در غلظت یک میلی‌مولار و PH ۵، نانوذرات طلا بعد از ۷۲ ساعت تولید شدند، ولی در همین غلظت و PH ۲، زمان تولید نانوذرات به ۵۲ ساعت کاهش یافت و به بیست ساعت رسید. مطلب فوق گویای آن است که در شرایط اسیدی توانایی قارچ برای بیوسنتز نانوذرات طلا افزایش می‌یابد. بر عکس pH، با افزایش غلظت محلول $HAuCl_4$ سرعت تولید نانوذرات توسط رایزوپوس اوریزا افزایش می‌یابد. در طی انجام مراحل فوق (تغییر pH و غلظت) محل تولید نانوذرات در قارچ هم‌چنان به صورت داخل سلولی و خارج سلولی بود و تغییر نکرد.

نتیجه گیری

طی بررسی‌های انجام شده مشخص شد قارچ رایزوپوس اوریزا، قادر به تولید نانوذرات طلا هست.

بیشتر نانوذرات تولیدی توسط این قارچ به صورت مونودیسپرس و به شکل‌های کروی و سه گوش بودند و گستره‌ی اندازه آن‌ها بین ۱۰تا۷۰ نانومتر بود.

References

1- Han G, Craig TM, Rotello MV. Stability of gold nanoparticle-bound DNA toward biological, physical, and chemical agents, *J Chem Biol Drug Des*. 2006; 67: 78-82.

2- Sadowski Z, Maliszewska IH, Grochowalska B, Polowczyk I, Kozlecki T. Synthesis of silver nanoparticles using microorganisms. *Materials Science-Poland*. 2008; 26: 419-32.

3- Marie-Christine D, Didier A. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, qunantum-size-related properties and applications toward biology, catalysis and nanotechnology. *J Chemical Reviews*. 2004; 104: 293-306.

4- Mandal S, Phadtare S, Sastry M. Interfacing biology with nanoparticles. *Current Applied Physics*. 2005; 5: 127-32.

5- Gade A, Ingle A, Whiteley Ch, Rai M. Mycogenic metal nanoparticles: progress and applications. Biotechnology Letters. 2010; 32: 593-600.

6- Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Nanopart Res*. 2008; 10: 507-17.

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

8- Chen JC, Lin ZH, Ma X. Evidence of the production of silver nanoparticles via pretreatment of Phoma sp. *Letters in applied microbiology*. 2003; 37: 105-8.

9- Caesar-Ton TC, Cochran VL. Role of a saprophytic basidiomycete soil fungus in aggregate stabilization. *J. National Soil Erosion Research Laboratory*. 2001; 575-9.

10- Zhang X, Xiaoxiao H, Kemin W, Yonghong W, Huimin L, Weihong T. Biosynthesis of size-controlled gold nanoparticles using fungus Penicillium sp. *J Nanoscience Nanotechnol*. 2009; 9: 5738-44.

11- Ranjbar Navazi Z, Pazouki M, Halek FS. Investigation of culture condition for biosynthesis of silver nanoparticles using Aspergillus fumigates. *Iranian J Biotechnol*. 2010; 8: 56-61.

12- Khadivi Derakhshan F, Dehnad AR, Salouti M. Biosynthesis of gold nanoparticles by Rhodococcus secies isplated from Ahar copper mine. *Quarter J Biol Sci*. 2010; 3: 37-44.

13- Kuster E, Williams ST. Selection of media for isolation of Streptomyces sp. Nature. 1964; 202: 928-29.

14- Avinash I, Mahendra R, Aniket G, Manisha B.

Fusarium solani: a novel biological agent for the extracellular synthesis of silver nanoparticles. *J Nanopart Res*. 2009; 11: 2079-85.

15- Shankar SS, Sastry M, Absar A, Pasricha R, Islam KM, Kumar R. Immobilization of biogenic gold nanoparticles in thermally evaporated fatty acid and amine thin films. *J Colloid Interface Sci*. 2004; 247: 69-75.

16- Shiying H, Zhirui G, Zhang Y, Zhang S, Wang J, Ning G. Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria Rhodopseudomonas capsulate. *J Materials Letters*. 2007; 61: 3984-7.

17- Murali S, Absar A, Islam Khan M, Kumar R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Current science*. 2003; 85: 25-9.

18- Prashant M, Nisha R, Sudesh K. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future application. *J Nanoparticle Research*. 2007; 10: 507-17.

19- Singaravelu G, Arockiamary S, Kumar V, Govindaraju K. A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, Sargassum wightii Greville. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2007; 57: 97-101.

20- Binupriya AR, Sathishkumar M, Yun S. Biocrystallization of silver and gold ions by inactive cell filtrate of Rhizopus stolonifer colloids and surfaces B. *Biointerfaces*. 2010; 79: 531-34.

21- Shiv SS, Ahmad A, Renu P, Sastry M. Bioreduction of chloroaurat ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes. *J Materials Chem.* 2003; 13: 1822-26.

Intra-Extra Biosynthesis of Gold Nanoparticles by Fungus Rhizopus Oryza

Sheikhlou Z[1], Salouti M[1], Farahmandkia Z[2], Mahmazi S[1], Einlou A[1]

[1]Dept. of Microbiology, Faculty of Sciences, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

[2]Dept. of Environmental Health, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Corresponding Author: Salouti M, Dept. of Microbiology, Faculty of Sciences, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

Email: saloutim@yahoo.com

Received: 31 May 2011 **Accepted:** 19 Sep 2011

Background and Objectives: Gold nanoparticles have found many applications in cancer diagnosis and therapy, drug and gene delivery and DNA and protein characterizations. Fungi are extremely good candidates in the synthesis of metal nanoparticles because of their ability to secrete large amounts of enzymes. The aim of this study was biosynthesis of gold nanoparticles by a fungus.

Materials and Methods: The sampling was performed from the Ahar copper mine. The biomasses of isolated fungi were incubated with $HAuCl_4$ solution in a shaker-incubator for 72 hr, and the strains that were able to produce gold nanoparticles were identified. The production of gold nanoparticles was studied with UV-vis spectroscopy, X-ray diffraction (XRD) and transmission electron microscopy (TEM).

Results: Among the eight types of fungi that were isolated from the Ahar copper mine, only *Rhizopus oryza* was able to synthesize gold nanoparticles. The synthesis of gold nanoparticles was confirmed by observing the characteristic peak at 540 nm using UV-vis spectroscopy. The XRD analysis confirmed that the produced gold nanoparticles are in the form of nanocrystaline. Transmission electron microscopy images showed that *Rhizopus oryza* produces gold nanoparticles with good monodispersity in spherical and trigonal shapes both intra- and extracellularly.

Conclusion: Fungus *Rhizopus oryza* is able to produce gold nanoparticles in the size range of 10-70 nm. This biologic method has the potential to replace chemical and physical methods currently used for gold nanoparticles production.

Keywords: Gold nanoparticles, Biosynthesized, Rhizopus oryza