تولید زیستی نانوذرات نقره با استفاده از قارچ *Fusarium oxysporum* جدا شده از نخود (*Cicer arietinum*)

Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Fusarium oxysporum* Isolated from Pea (*Cicer arietinum*)

افسانه قبولی[۱]، سهیلا میرزایی[۲*] و مصطفی درویش‌نیا[۳]

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۴/۰۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۶

چکیده

یکی از اهداف مهم نانوفناوری توسعه‌ی روش‌های ایمن، سازگار با محیط زیست و کم هزینه برای تولید نانوذرات است و قارچ‌ها به علت ترشح مقادیر زیاد آنزیم و پروسه‌های پایین دست آسان‌تر گزینه‌های مناسبی برای این انتخاب می‌باشند. هدف از این مطالعه تولید خارج سلولی نانوذرات نقره با استفاده از جدایه‌های قارچ *Fusarium oxysporum* جدا شده از نخود بود. برای این منظور ۱۵ جدایه از قارچ مورد بررسی قرار گرفت. عصاره‌ی سلولی قارچ پس از تیمار با محلول ۳-۱۰ مولار نیترات نقره، از بی‌رنگ به قهوه‌ای تغییر یافت که اولین نشانه مبنی بر تشکیل نانوذرات نقره می‌باشد. پس از تولید نانوذرات نقره در مخلوط واکنش، بررسی‌های بیشتر با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتر UV-Vis، XRD و FTIR انجام شد. داده‌های اسپکتروفتومتر وجود پیک در ۴۲۰ نانومتر را نشان داد که مختص نانوذرات نقره است. طیف‌سنجی هر ۲۴ ساعت یک بار به‌مدت چهار روز ادامه یافت تا در نهایت جدایه F3 که طی این مدت بیش‌ترین جذب و پایداری را از خود نشان داده بود به‌عنوان جدایه‌ی برتر انتخاب و آزمایش‌های تکمیلی روی آن انجام شد. پهن‌شدگی باندها در الگوی XRD بر اندازه‌ی کوچک نانوذرات دلالت داشت. آنالیز FTIR پایداری نانوذرات تولید شده توسط بیومولکول‌ها تا پنج ماه پس از شروع واکنش را تأیید کرد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات نقره، سنتز خارج سلولی، XRD، FTIR، *Fusarium oxysporum*

---

۱ و ۲. به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

۳. استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد

*: نویسنده مسوول Email: smirzaei@basu.ac.ir

این مقاله بخشی از پایان‌نامه‌ی کارشناسی‌ارشد نگارنده‌ی اول، ارائه شده به دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان به راهنمایی خانم دکتر سهیلا میرزایی می‌باشد.

مقدمه

نانوتکنولوژی به‌عنوان یک دانش بین‌رشته‌ای که روز بـه روز در حـال توسـعه و گسـترش اسـت، کاربردهـای بی‌شـماری در زمینـه‌های مختلفـی ماننـد پزشـکی، کشـاورزی، الکترونیـک و صـنایع غـذایی دارد *ناتاراجـان* و همکـاران؛ *کومـار* و همکـاران (Natarajan *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2012). نـانوذرات ازجمله پرکاربردترین نانومحصولات شناخته می‌شـوند و از بـین آن‌ها نانوذرات فلزی و به خصوص نانوذرات نقره اهمیت ویـژه‌ای دارند. به همین دلیل روش‌های تهیه نانوذرات مسـأله‌ی مهمـی در این تکنولوژی است. روش‌های شیمیایی و فیزیکـی مـدت‌ها برای این منظور به‌کار گرفته شده‌اند. این روش‌ها قادر به تولیـد مقدار زیادی نانوذرات در زمان نسبتاً کوتاه هستند؛ امـا معمـولاً فشار و دمای بالایی نیاز دارند و انرژی زیادی مصـرف می‌کننـد. این روش‌ها هم‌چنین به‌دلیل استفاده از مواد شیمیایی، معمـولاً منجر به باقی ماندن مقداری از واکنش‌گرهای سمی شده و ایـن امر استفاده از آن‌ها در کاربردهای زیسـتی را محـدود می‌سـازد *مندال* و همکاران؛ *موهانپوریا* و همکاران؛ *پاراشار* و همکاران؛ *دار* و همکاران (Mandal *et al.*, 2006; Mohanpuria *et al.*, 2008; Parashar *et al.*, 2009; Dar *et al.*, 2013). به همین علت نیاز به یک روش ایمن و دوسـتدار محـیط احسـاس می‌شـود. علـم بیولوژی کمک خـوبی در ایـن راسـتا بـوده و میکروارگانیسـم‌ها توانایی بالایی را در تولیـد نـانوذرات نشـان داده‌انـد. باکتری‌هـا، قارچ‌ها، مخمرها و ویروس‌ها ازجمله موجودات استفاده شـده در ایـن زمینـه هسـتند *دوران* و همکـاران؛ *اینگـل* و همکـاران؛ *کریشـناراج* و همکـاران؛ *رودابـاق* و همکـاران (Duran *et al.*, 2007; Ingle *et al.*, 2009; Krishnaraj *et al.*, 2012; Raudabaugh *et al.*, 2013).

قارچ‌ها ازجمله عوامل بیولـوژیکی هسـتند کـه بسـیار مـورد توجه قرار گرفته‌اند *ساداوسکی* و همکـاران (Sadowski *et al.*, 2008). در مقایسه با باکتری‌ها، قارچ‌ها مقادیر فراوانی پـروتئین تولید می‌کنند که این پروتئین‌ها قـادر بـه هیـدرولیز یون‌هـای فلزی هستند، هم‌چنین جداسازی و کشت قارچ آسان اسـت. از سوی دیگـر قارچهـا توانـایی زیـادی در رشـد و تحمـل فلـز در مقایسـه بـا جمعیت‌هـای باکتریـایی دارنـد و حجـم بـالایی از نانوذرات را تولید کرده و به سبب کـاهش هزینـه‌های مـالی بـه باکتری‌ها ترجیح داده می‌شوند. بـه‌علاوه، دسـت ورزی بیـومس قارچی نسـبت بـه روش‌هـای مصـنوعی از پیچیـدگی کمتـری برخوردار است *تاکار* و همکاران؛ *سنگاپا* و *تیاگاراجان* (Thakkar *et al.*, 2010; Sangappa and Thiagarajan, 2012).

قارچ *Fusarium oxysporum* یـک قـارچ سـریع‌الرشـد و در دسترس است؛ هم‌چنین کشت و رشد آن آسان بوده و به مـواد و شرایط خاص نیـاز نـدارد. از سـوی دیگـر ایـن قـارچ یکـی از قارچ‌های بسیار شناخته شده در زمینه‌ی تولید زیستی نانوذرات محسوب می‌شود و گزارش‌های زیادی مبنی بر تولیـد نـانوذرات نقـره بـا اسـتفاده از ایـن قـارچ وجـود دارد/حمـد و همکـاران؛ *محمدیان* و همکاران (Ahmad *et al.*, 2003; Mohammadian *et al.*, 2007). در این پژوهش توانـایی جدایـه‌های ایرانـی ایـن قارچ به‌دست آمده از نخود مورد مطالعه و بررسی قرار گرفـت و سعی شد تا بهترین جدایه به‌منظور تولید سـریع‌تر نـانوذرات بـا اندازه‌ی کوچک‌تر شناسایی شود.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه های قارچی

به‌منظور بررسی توانایی جدایه‌های مختلف، ۱۵ جدایه‌ی خالص قارچ که از نخود جدا شده بود از دانشگاه لرستان تهیـه گردیـد. جدایه‌ها از بخش‌های مختلف نخود و از شهرستان‌های متفـاوت به‌دست آمده بود. مشخصات جدایه‌های مذکور در جـدول یـک ارائه گردیده است.

بیوسنتز نانوذرات نقره

برای تهیه‌ی بیومس از محیط‌کشـت PDB (Potato Dextrose Broth) استفاده شد. قارچ‌های کشت شده در شیکر انکوباتور بـا دمای ۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قـرار گرفتند. پس از گذشت هفت روز، توده‌ی میسلیومی صاف شـده و چندین بار با آب‌مقطـر اسـتریل شستشـو گردیـد تـا بقایـای محیط‌کشت از آن‌ها پاک شود. سپس پـنج گـرم از بیـومس بـه ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر استریل افزوده گردید و مجـدداً به‌مدت سه روز در همان شرایط شیک شدند. پس از این مـدت، با استفاده از کاغذ صافی واتمن شـماره یـک عصـاره از بیـومس جدا شد.

جهت سنتز نانوذرات نقره، به عصاره‌ی به‌دست آمده نیتـرات نقره افزوده شد به‌طوری‌که غلظت نهایی مخلوط واکنش به یک میلی‌مولار برسد. به‌علت حساس بودن واکنش بـه نـور، ارلن‌هـا تحت شرایط تاریکی شـیک شـدند. نمونـه‌ی شـاهد نیـز بـدون افزودن نیترات نقره در همان شرایط قرار گرفت.

پودر لازم جهـت آزمایش‌هـای XRD (X-Ray Diffraction) و FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) از طریق خشک نمودن عصاره‌ی قارچی تغییر رنـگ یافتـه در آون با دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد (به‌مدت ۳-۴ روز) تهیه گردید.

جدول ۱: مشخصات جدایه‌های استفاده شده جهت تولید نانوذرات نقره

Table 1: Specifications of the isolates used to produce silver nanoparticles

کد جدایه Isolate code	گونه قارچ Fungus species	اندام گیاهی Plant organ	محل جمع‌آوری Collection region
F1	*Fusarium oxysporum*	ساقه Stem	الشتر Aleshtar
F2	*F. oxysporum*	طوقه Crown	الشتر Aleshtar
F3	*F. oxysporum*	ساقه Stem	بروجرد Borujerd
F4	*F. oxysporum*	طوقه Crown	بروجرد Borujerd
F5	*F. oxysporum*	ساقه Stem	نورآباد Nurabad
F6	*F. oxysporum*	ساقه Stem	نورآباد Nurabad
F7	*F. oxysporum*	ساقه Stem	پلدختر Pol-e Dokhtar
F8	*F. oxysporum*	طوقه Crown	پلدختر Pol-e Dokhtar
F9	*F. oxysporum*	ریشه Root	زاغه Zaghe
F10	*F. oxysporum*	طوقه Crown	کوهدشت Kuhdasht
F11	*F. oxysporum*	طوقه Crown	کوهدشت Kuhdasht
F12	*F. oxysporum*	ساقه Stem	الیگودرز Aligudarz
F13	*F. oxysporum*	ریشه Root	دورود Dorud
F14	*F. oxysporum*	طوقه Crown	ویسیان Veisian
F15	*F. oxysporum*	ریشه Root	ویسیان Veisian

ارزیابی نانوذرات نقره‌ی تولید شده

مشاهدات چشمی

اولین نشانه‌ی تشکیل نانوذرات نقره، تغییر رنگ در مخلوط واکنش است. تغییر رنگ محیط از بی‌رنگ به قهوه‌ای روشن نشان‌دهنده تشکیل خارج سلولی نانوذرات نقره می‌باشد.

طیف‌سنجی نور مرئی- فرابنفش

جهت تأیید تشکیل نانوذرات در محلول کلوئیدی از طیف‌سنجی نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis (Variancaryconc 100) استفاده شد. برای این منظور نمونه‌ها پس از گذشت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از شروع واکنش مورد بررسی قرار گرفتند.

پس از مشاهده‌ی تغییر رنگ، در فواصل زمانی ذکر شده مقداری از نمونه برداشته شد و جذب به‌وسیله‌ی طیف‌سنج فرابنفش- مرئی در دقت یک نانومتر و در محدوده‌ی ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد تا از ایجاد نانوذرات اطمینان حاصل شده و میزان افزایش یا کاهش جذب و هم‌چنین پایداری آن‌ها بررسی شود.

پراش اشعه‌ی ایکس (XRD)

به‌منظور تعیین ماهیت نانوذرات نقره‌ی تولید شده و هم‌چنین تخمین نسبی اندازه‌ی نانوذرات حاصل، از روش پراش اشعه‌ی ایکس (با استفاده از دستگاه APD2000, ITAL STRUCTURE) استفاده شد. مخلوط واکنش خشک شده‌ی حاوی نانوذرات نقره برای آنالیز XRD بین زوایای $\theta 2$ از ۱۰ تا ۹۰ بررسی گردید.

طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)

آنالیز FTIR با استفاده از دستگاه طیف‌سنج مدل Perkin Elmer Spectrum انجام شد. نمونه‌ها در محدوده‌ی طول موج ۵۵۰-۴۰۰۰cm^{-1} مورد بررسی قرار گرفتند. این روش برای مشخص نمودن برهم‌کنش نانوذرات با پروتئین و هم‌چنین حضور پروتئین به‌عنوان عامل پایدارکننده که نانوذرات نقره را احاطه می‌کند، انجام شد.

عصاره‌ی قارچی پودر شده با برمید پتاسیم (KBr) به نسبت ۱:۱۰۰ مخلوط شده و تحت فشار قرار گرفت تا به‌صورت یک دیسک به قطر دو میلی‌متر درآید. از دیسک حاصل در پروسه‌ی ارزیابی نمونه‌ها توسط FTIR استفاده شد.

پایداری نانوذرات نقره‌ی تولید شده

آن‌چه که علاوه‌بر تولید نانوذرات اهمیت دارد، پایداری نانوذرات تولید شده است. پایداری نانوذرات تولید شده با اندازه‌گیری میزان جذب در طی ماه‌های نگهداری بررسی شد. برای این منظور محلول‌های واکنش تحت شرایط تاریکی در انکوباتور نگهداری شدند و نانوذرات سنتز شده پس از گذشت پنج ماه با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-Vis مورد بررسی قرار گرفتند. این کار با طیف‌سنجی نمونه‌ها در طول موج ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

تولید زیستی نانوذرات به‌عنوان یک روش سبز برای تولید نانوذرات شناخته می‌شود و استفاده از قارچ‌ها یکی از مرسوم‌ترین این روش‌ها است. پس از افزودن محلول نیترات نقره به عصاره‌ی قارچی، آنزیم‌ها و پروتئین‌های موجود در عصاره با یون‌های Ag^+ واکنش داده و آن‌ها را به‌صورت خنثی درمی‌آورند. این واکنش سبب تغییر رنگ در مخلوط واکنش شده و به سنتز خارج سلولی نانوذرات اشاره دارد.

در این پژوهش ۱۵ جدایه‌ی قارچ *F. oxysporum* به‌منظور بیوسنتز خارج سلولی نانوذرات نقره مورد بررسی قرار گرفتند. شدت تغییر رنگ در جدایه‌های مختلف متفاوت بود که نشان‌دهنده‌ی توانایی متفاوت جدایه‌ها در تولید نانوذرات بود. با این حال طیف‌سنجی برای تمام نمونه‌ها در طول موج ۲۰۰- ۸۰۰ نانومتر به‌وسیله‌ی اسپکتروفتومتر نور مرئی - فرابنفش انجام گرفت. داده‌های اسپکتروفتومتر نیز نشان داد که قابلیت برخی جدایه‌ها بیشتر از سایرین است. به همین علت آزمایش برای جدایه‌های F3، F6، F10، F14 و F15 که بهترین نتایج را از خود نشان داده بودند تکرار شد و در نهایت جدایه‌ی F3 به‌عنوان جدایه‌ی برتر انتخاب گردید و آزمایشات تکمیلی روی آن انجام گرفت.

نتایج حاصل از ارزیابی نانوذرات نقره‌ی تولید شده توسط جدایه‌ی F3

مشاهدات چشمی

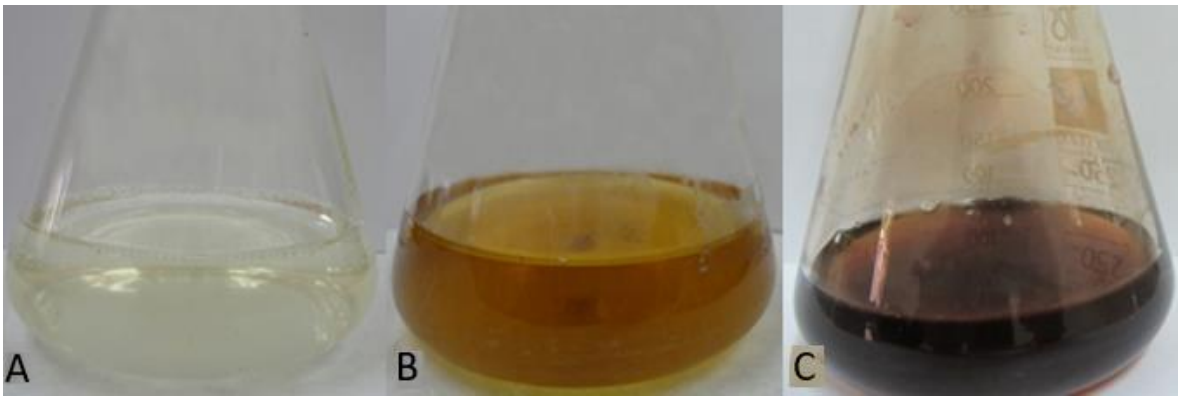
جدایه‌ی F3 قارچ *F. oxysporum* حضور نانوذرات نقره یا به عبارتی احیای Ag^+ از $AgNO_3$ به Ag^0 را نشان داد. نتایج حاکی از این بود که پس از تیمار با محلول یک میلی‌مولار نیترات نقره، به‌تدریج و با گذشت زمان رنگ مخلوط واکنش از بی‌رنگ به قهوه‌ای و در نهایت قهوه‌ای تیره تغییر کرد؛ درحالی‌که در نمونه‌ی شاهد (بدون یون‌های نقره) هیچ تغییر رنگی مشاهده نگردید (شکل ۱). این نتایج نشان داد که تبدیل یون‌های نقره به‌صورت خارج سلولی اتفاق می‌افتد. *دوران* و همکارن در سال 2005 نیز نانوذرات نقره را به‌صورت خارج سلولی با استفاده از همین قارچ تولید کردند و به این نتیجه رسیدند که آنزیم نیترات ردوکتاز مسئول احیای یون‌های نقره و در نتیجه تشکیل نانوذرات نقره است *دوران* و همکاران (Duran *et al.*, 2005). نتایج مشابهی با سایر استرین‌های قارچ *F. oxysporum* استفاده شده برای تولید نانوذرات گزارش شده است/*حمد* و همکاران، 2003؛ *دوران* و همکاران، 2007؛ *کوربکندی* و همکاران (Korbekandi *et al*. 2013).

آنالیز طیف‌سنجی نور مرئی- فرابنفش

آنالیز اسپکتروفتومتریک نور مرئی - فرابنفش یکی از روش‌های ساده و بسیار مورد استفاده برای مشخص نمودن وجود نانوذرات نقره در مخلوط واکنش است. شکل ۲ طیف‌های UV-Vis ثبت شده در زمان‌های مختلف پس از شروع واکنش را نشان می‌دهد و به خوبی گویای این واقعیت است که با افزایش دوره‌ی انکوباسیون میزان جذب در ۴۲۰ نانومتر که مرتبط با نانوذرات نقره است، افزایش می‌یابد. همان‌گونه که در تصویر مشخص است، تفاوت جذب بین روز اول و دوم ملموس نبود؛ اما در روز سوم شدت جذب به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت. افزایش در شدت جذب می‌تواند ناشی از افزایش مقدار نانوذرات تشکیل شده باشد. این پیک مشابه نتایج به‌دست آمده برای نانوذرات نقره‌ی تولید شده با *F. solani*/*ینگل* و همکاران (2009) و *F. oxysporum*/*حمد* و همکاران (2003)؛ *دوران* و همکاران (2005)؛ *کوربکندی* و همکاران (2013) بود. یک باند جذبی نیز در ۲۹۰ نانومتر قابل رؤیت بود که مشخص شده است به‌علت القای الکترونیک در تریپتوفان و تیروزین آزاد در پروتئین‌ها به‌وجود می‌آید *باینزا و دسوزا* (Bhainsa and D'souza, 2006).

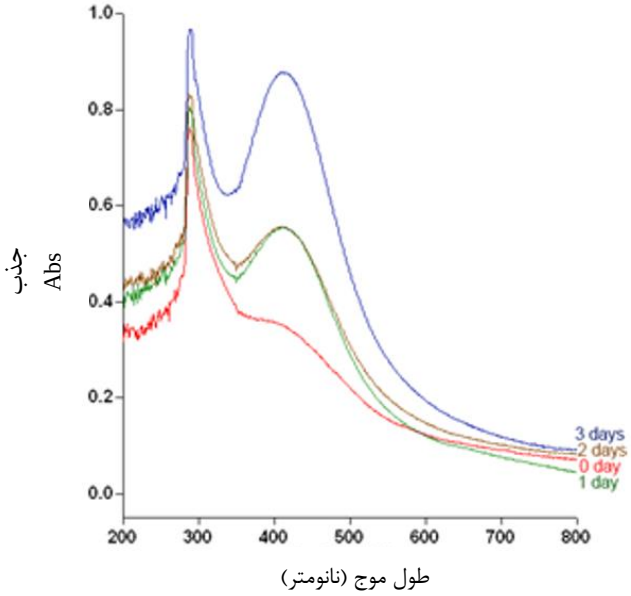
آنالیز پراش اشعه‌ی ایکس (XRD)

طیف‌های حاصل از پراش اشعه‌ی ایکس اطلاعات دقیقی در مورد ساختار و نوع ماده‌ی مورد بررسی ارائه می‌دهند. پهنای باند در الگوی XRD به‌دست آمده، نشان‌دهنده‌ی کوچکی اندازه‌ی نانوذرات تشکیل شده بود. به‌طوری‌که وقتی اندازه‌ی نانوذرات تولید شده کوچک باشد، پهنای پیک زیاد می‌شود (شکل ۳).



شکل ۱: عصاره‌ی سلولی قارچ *Fusarium oxysporum* (جدایه‌ی F3) بدون نیترات نقره (A) و در حضور نیترات نقره پس از ۲۴ ساعت (B) و ۴۸ ساعت (C)

Fig. 1: *Fusarium oxysporum* cell extract (isolate F3). Without UV-Vis spectra (A) and with $AgNo_3$ after 24 (B) and 48 (C) hour



شکل ۲: طیف‌های UV-Vis ثبت شده در زمان‌های مختلف برای واکنش عصاره‌ی سلولی قارچ *Fusarium oxysporum* (جدایه‌ی F3) با محلول نیترات نقره یک میلی‌مولار

Fig. 2: UV-Vis spectra of *Fusarium oxysporum* (isolate F3) cell extract treated with $AgNo_3$ (1mM) at different times

آنالیز طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)

به نظر می‌رسد پروتئین‌ها از عوامل اصلی در تشکیل و پایداری نانوذرات هستند. گروه‌های آمین آزاد در سیستئین باقیمانده در پروتئین‌ها به نانوذرات می‌پیوندند و در نتیجه پایداری نانوذرات را رقم می‌زنند (*مندال* و همکاران، 2006؛ *کومار* و همکاران، 2012). FTIR ملاکی برای حضور پروتئین‌ها به‌عنوان عوامل پوششی که سبب افزایش پایداری نانوذرات تولید شده می‌شوند فراهم می‌نماید. در این پژوهش نیز برای مشخص نمودن برهم‌کنش پروتئین- نانوذره از روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز استفاده شد.

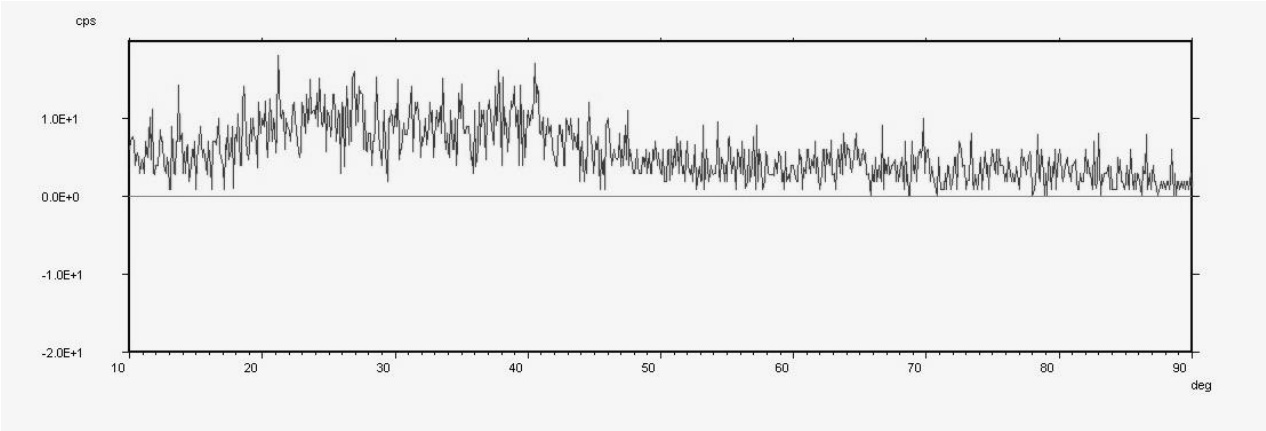
آنالیز FTIR وجود پنج پیک را در محدوده‌ی ۴۰۰۰-۵۵۰ cm^{-1} نشان داد که به‌ترتیب در ۱۰۲۹/۳۶، ۱۳۸۳/۷۳،

۱۶۲۹/۹۵، ۱۶۵۹/۸ و ۳۴۳۳/۶۶ cm^{-1} قرار داشتند. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، حداکثر جذب مربوط به پیک در محدوده‌ی ۳۴۳۳ cm^{-1} بود که به باندهای جذبی وابسته به O-H کششی حاصل از گروه‌های کربوکسیلیک اسید مربوط می‌باشد *قاسمی نژاد* و همکاران (Ghaseminezhad *et al.*, 2012). طیف در ۱۶۵۰ cm^{-1} به آمید I نسبت داده می‌شود *احمد* و همکاران (2003) که پیک ۱۶۵۹ cm^{-1} به‌دست آمده در این پژوهش به آن شباهت داشت. پیک در ۱۶۲۹ cm^{-1} وجود گروه‌های پیوند آمیدی را نشان داد. این پیک مشابه پیک به‌دست آمده در ۱۶۲۶ cm^{-1} آزمایشات *کومار* و همکاران (2012) بود. طیف در محدوده‌ی ۱۳۵۰-۱۳۹۰ cm^{-1} مربوط به باقیمانده از NO_3^- در محلول است *هوانگ* و همکاران؛ *گجبهی* و همکاران (Huang *et al.*, 2007; Gajbhiye *et al.*, 2009) که پیک به‌دست آمده در ۱۳۸۳ cm^{-1} مشابه این نتایج بود. وجود باند در ۱۰۲۹ cm^{-1} پیک‌های جذب C-O یا C-O-C- را نشان داد که مشابه کار *هوانگ* و همکاران (2007) بود. طیف در محدوده‌ی ۹۹۰-۱۱۰۰ cm^{-1} به ارتعاشات منحرفی C-OH ناشی از پروتئین‌ها اشاره دارد *قاسمی نژاد* و همکاران (2012) که پیک ۱۰۲۹ cm^{-1} نیز در این محدوده قرار داشت.

نتایج به‌دست آمده وجود گروه‌هایی همچون O-H، C-O، C-O-C، C-OH و گروه‌های پیوند آمیدی را نشان داد. این عوامل، پوششی روی نانوذرات تشکیل داده و باعث پایداری آن‌ها می‌گردند. به‌نظر می‌رسد وجود باندهای جذبی وابسته به O-H کششی حاصل از گروه‌های کربوکسیلیک اسید نقش مهمی در این زمینه دارد.

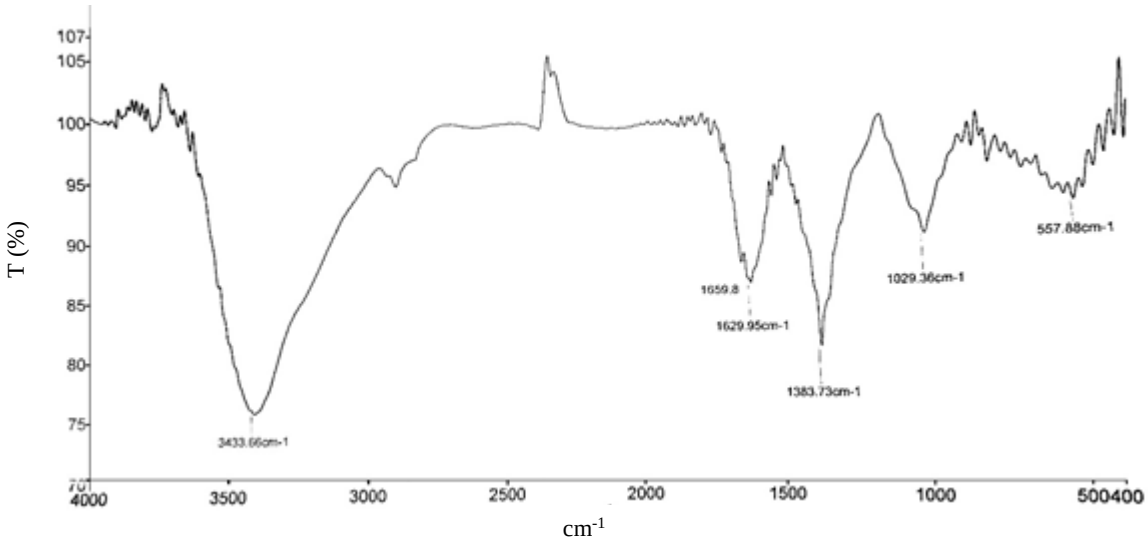
بررسی پایداری نانوذرات نقره‌ی تولید شده

برای استفاده‌ی هرچه بهتر از نانوذرات تولید شده، پایداری آن‌ها امر بسیار مهمی است که به اندازه‌ی سرعت تشکیل و مقیاس نانوذرات اهمیت دارد. برای بررسی پایداری نانوذرات تولید شده توسط جدایه‌ی F3 قارچ *F. oxysporum*، مقداری از عصاره‌ی تغییر رنگ یافته در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شد. پس از گذشت پنج ماه نمونه از نظر ته‌نشینی نانوذرات مورد بررسی قرار گرفت. هیچ شواهدی مبنی بر وجود رسوب و ته‌نشینی نانوذرات در ظرف نگهداری دیده نشد که این امر بر پایداری بالای نانوذرات تولیدی اشاره دارد. آنالیز طیف‌سنجی نور مرئی – فرابنفش از این نمونه نیز نشان داد که با وجود گذشت پنج ماه از شروع واکنش، همچنان جذب بالایی در محدوده‌ی ۴۲۰ نانومتر وجود دارد. این موضوع بیانگر پایداری نانوذرات تولید شده می‌باشد (شکل ۵). *باساواراجا* و همکاران (Basavaraja *et al.*, 2008) تولید خارج سلولی نانوذرات نقره‌ی بسیار پایدار و کریستالی را با استفاده از قارچ *F. semitectum* گزارش کردند.



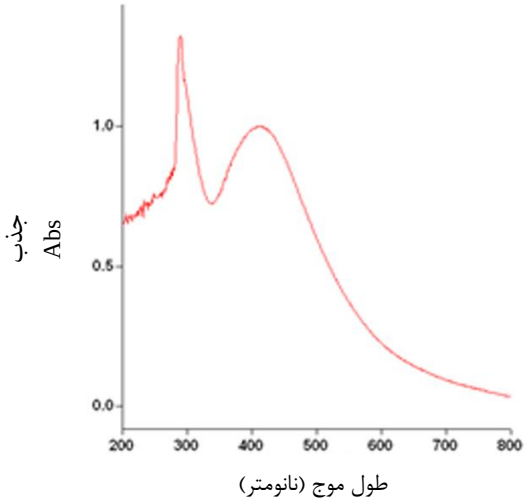
شکل ۳: طیف پراش اشعه‌ی *X* نانوذرات سنتز شده به‌وسیله‌ی قارچ *Fusarium oxysporum* (جدایه‌ی F3)

Fig. 3: X-ray diffraction of silver nanoparticles synthesized using *Fusarium oxysporum* (isolate F3)



شکل ۴: طیف‌های FTIR ثبت شده از پودر نانوذرات نقره‌ی سنتز شده توسط قارچ *Fusarium oxysporum* (جدایه‌ی F3)

Fig. 4: FTIR spectrum of silver nanoparticles synthesized using *Fusarium oxysporum* (isolate F3)



شکل ۵: طیف‌های UV-Vis ثبت شده برای واکنش عصاره‌ی سلولی قارچ *Fusarium oxysporum* (جدایه‌ی F3) با محلول نیترات نقره‌ی یک میلی‌مولار پنج ماه پس از شروع واکنش

Fig. 5: UV-Vis spectra of *Fusarium oxysporum* (isolate F3) cell extract treated with $AgNo_3$ (1mM), 5 months after nanoparticles biosynthesis

نانوذرات نقره از مهم‌ترین و پرکاربردترین نانوذرات فلزی هستند که کاربردهایی در زمینه‌های برچسب‌های زیستی، کاتالیست در برهم‌کنش‌های شیمیایی، مواد ضدمیکروبی و فیلترها دارند *سوندرامورتی* و همکاران؛ *ناتاراجان* و همکاران، 2010 (Sundaramoorthi *et al.*, 2009). کاربرد نانوذرات نقره در این شاخه‌ها وابسته به توانایی تولید نانوذرات با ترکیب شیمیایی مختلف و هم‌چنین شکل، اندازه و Monodispersity مختلف است. به‌علاوه این ذرات باید از نظر شیمیایی پایدار باشند، مثلا اکسیداسیون ناقص یا رسوب ناخواسته اتفاق نیفتد *باینزا* و *دسوزا*، 2006؛ *سوندرامورتی* و همکاران، 2009؛ *لی* و همکاران (Li *et al.*, 2011).

بیوسنتز نانوذرات براساس محل تشکیل نانوذرات، به‌صورت درون‌سلولی و خارج سلولی صورت می‌گیرد *کومار* و همکاران؛ *چوداساما* و همکاران؛ *لی* و همکاران، 2011 (Kumar *et al.*, 2007; Chudasama *et al.*, 2010). تولید خارج سلولی نانوذرات، سبب کاهش هزینه‌های استخراج و بررسی آسان آن‌ها می‌شود، از سوی دیگر پروسه‌های پایین‌دست در این روش آسان‌تر و ساده‌تر است. هم‌چنین عصاره‌ی سلولی سبب کنترل بهتر اندازه و Polydispersity نانوذرات می‌شود و از این‌رو کارآیی بهتری نسبت به تولید داخل سلولی دارد (*ناتاراجان* و همکاران، 2010؛ *کومار* و همکاران، 2012). نانوذرات تشکیل شده داخل بیومس به یک مرحله‌ی اضافی

برای آزاد کردن نانوذرات از بیومس به‌وسیله‌ی تیمار فراصوتی یا واکنش با شوینده‌های مناسب نیاز دارند *شارما* و همکاران (Sharma *et al.*, 2010). بنابراین تمرکز روی فرآیندهای خارج سلولی است.

در بعضی از روش‌های شیمیایی، پایدارکننده (سورفاکتانت) برای جلوگیری از تراکم نانوذرات نقره به محلول اولیه اضافه می‌گردد، درحالی‌که در روش‌های بیولوژیکی هیچ نیازی به افزودن عامل پایدارکننده نیست (*تاکار* و همکاران، 2010). به همین دلیل در این مطالعه، سنتز و توصیف نانوذرات نقره با استفاده از قارچ گزارش و بحث شده است.

نتیجه‌گیری کلی

براساس داده‌های به‌دست آمده مشخص گردید که اکثر جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* قابلیت احیای یون‌های نقره به‌صورت خارج سلولی را دارند. اما هدف از این پژوهش تعیین بهترین جدایه به‌منظور استفاده‌ی بهینه از مواد و وسایل برای تولید نانوذرات نقره بود. پس از تکرار آزمایش‌ها در نهایت جدایه‌ی F3 به‌عنوان جدایه‌ی برتر که بهترین واکنش را در ترکیب عصاره‌ی قارچی با نیترات نقره داشت، انتخاب گردید. آنالیزهای بیشتر روی این جدایه نشان داد که نانوذرات تولید شده به‌وسیله‌ی این قارچ به‌علت پوشش‌دهی توسط پروتئین‌ها پایداری زیادی دارند به‌طوری‌که حتی پس از گذشت پنج ماه هیچ شواهدی مبنی بر تجمع نانوذرات دیده نشد. *موهنپوریا* و همکاران نیز به این نتیجه رسیدند که نانوذرات تولید شده‌ی خارج سلولی به‌وسیله‌ی پروتئین‌ها و عوامل ترشح شده به‌وسیله‌ی قارچ پایدار می‌شوند *موهانپوریا* و همکاران (Mohanpuria *et al.*, 2008).

هم‌چنین بر مبنای نتایج XRD می‌توان بیان کرد که نانوذرات تولیدی از ابعاد کوچکی برخوردارند. از آن جایی‌که با کاهش اندازه‌ی نانونقره فعالیت ضدمیکروبی آن افزایش می‌یابد، به‌نظر می‌رسد نانوذرات تولید شده توسط این جدایه خاصیت ضدمیکروبی بالایی از خود نشان دهند.

استفاده از قارچ‌های بومی نه تنها روشی سبز و دوست‌دار محیط‌زیست است، بلکه سبب صرفه‌جویی در هزینه‌ها می‌شود. در این پژوهش سعی شد علاوه‌بر تولید بهینه‌ی نانوذرات با استفاده از جدایه‌های بومی، پایداری آن‌ها نیز مدنظر قرار گیرد تا بتوان ذراتی با خصوصیات مطلوب تهیه نمود؛ به‌طوری‌که هم از لحاظ انرژی و هم از لحاظ اقتصادی مقرون به‌صرفه باشد.

منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱-۲ متن انگلیسی مراجعه شود.