معرفی سویه جدید مخمری *Candida* sp. strain MY2 با توان بالقوۀ سنتز سریع و برون سلولی نانوکریستالهای اکسید روی

مراحم آشنگرف

سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم، گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۲۳

چکیده

میکروارگانیسم های محتلف به عنوان نانوکارخانه های سبز به علت توان بالقوۀ فوق العاده خود قادر به ایجاد محیط سبز به منظور ایجاد نانوساختارهای کنترل شده هستند. نانوذرات اکسید روی با توجه به توان بالقوۀ بالا در انجام فرآیندهای درمانی اختصاصی، در مطالعات علوم زیستی، دارویی و پزشکی کاربرد فراوان دارند. در این پژوهش، غربالگری سویه های مخمری با امکان استفاده از آنها به عنوان بیوکاتالیزور در تولید برون سلولی نانوذرات اکسید روی مورد بررسی قرار گرفت. از میان ۷ سویه مخمری غربالگری شده از خاکهای معادن مس، سویه MY2 دارای توان بالقوۀ بالا در سنتز برون سلولی نانوذرات اکسید روی بود. سویه مذکور از نظر صفات فنوتیپی و مولکولی شناسایی و در جنس *Candida* (با شماره دسترسیKF560329) رده بندی شده است. تشکیل اولیه نانوذرات توسط آنالیز نوری UV-visible بررسی شد. الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات حاصل نشان داد که ذرات سنتز شده به صورت نانوکریستالهای اکسید روی هستند. مورفولوژی و توزیع اندازه نانوذرات به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning electron microscopy) و هیستوگرام پراکنش اندازه نانوذرات مشخص گردید. یافته های به دست آمده توان بالقوۀ بالای سویه مخمری *Candida* sp. strain MY2 در تولید سریع و برون سلولی نانوذرات اکسید روی را نشان می دهد به طوری که می توان از ترشحات این مخمر به عنوان بیوکاتالیزور ایمن و ارزان قیمت در تولید نانوکریستالهای اکسید روی با توزیع نسبتاً باریک اندازۀ ذرات (۵-۵۰ نانومتر) و متوسط اندازۀ ذرات ۲۳/۵ نانومتر پس از ۸ ساعت واکنش زیست تبدیلی بهره جست.

واژه های کلیدی: سنتز سبز، نانوذرات اکسید روی، برون سلولی، *Candida* sp. strain MY2

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۷۱۶۶۲۴۱۳۳ ، پست الکترونیکی: m.ashengroph@uok.ac.ir

مقدمه

با گذر از میکروذرات به دنیای نانوذرات، با افزایش نسبت سطح به حجم و ورود ذره به قلمرو کوانتومی می رسد. افزایش نسبت سطح به حجم که به تدریج با کاهش اندازه ذره رخ می‌دهد، باعث غلبه رفتار اتمهای واقع در سطح ذره به رفتار اتمهای درونی می‌شود که این امر خود عامل کلیدی تأثیر گذار بر خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و نوری نانوذرات خواهد بود و منجر به بروز ویژگیهایی از جمله واکنش پذیری بالا، پایداری شیمیایی و حرارتی بالا و همچنین توان بالقوۀ بالا در جذب و انتشار نور می گردد که منجر به کاربرد گسترده آنها در علوم مختلف زیست شناسی، پزشکی و پیراپزشکی، مکانیک، کاتالیزورها و انرژی شده است (۴، ۱۴و ۲۰). تمایل به تهیه ذرات با ابعاد نانو مبتنی بر اصول شیمی سبز و استفاده بالقوه از آنها با توجه به خصوصیات منحصر به فردشان روز به روز در حال افزایش است و بدین منظور انواع گوناگونی از ساختارهای زیستی از جمله گیاهان، جلبکها و

میکروارگانیسم هایی از قبیل باکتریها، کپکهای رشته ای و مخمرها جهت تهیه نانوذرات استفاده می شوند (۱۲). میکروارگانیسم ها با توجه به ویژگی های منحصربه فردشان از قبیل زیست تحت شرایط سخت و تنش زای محیطی، تنوع متابولیکی بالا، اختصاصیت سوبسترایی بالا، رشد سریع تر و همچنین مزایایی از قبیل امکان به کارگیری آنها تحت شرایط نسبتاً ملایم از نظر دما، pH و فشار و عملکرد مناسب آنها در سیستمهای دو فازی شامل آب و حلالهای آلی به عنوان بیوکاتالیزورهای مناسب و کارگران اصلی نانوکارخانه های دوستدار محیط زیست، برای تولید و تجمع ذرات حاوی فلز در اندازه های نانو از جایگاه ویژه ای برخوردار هستند (۵ و ۱۰). از نانوذرات اکسید روی در زمینه های متعددی از جمله در پوشش رسانای اکسیدی با قابلیت هدایت بالا برای سلولهای خورشیدی، حسگر های گازی، آشکار ساز های نوری ماوراء بنفش، جاذب شیمیایی، کاتالیستهایی برای هیدروژن دار کردن در فاز مایع، کاتالیستهایی برای تخریب نوری به جای نانو ذره های تیتانیوم، ساخت نیمه هادیها، فیلترکننده های اشعه ماوراء بنفش و در زمینه های علوم پزشکی و دارویی به عنوان یکی از پرکاربردترین نانوذرات برای مقابله با عفونتهای بیمارستانی ناشی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی استفاده می شوند (۶، ۱۵، ۱۹، ۲۴و ۲۶). برای تولید نانوذرات اکسید روی روشهای فیزیکوشیمیایی متنوعی از جمله چگالش از یک بخار، سل ژل، احیای فتوشیمیایی و الکتروشیمیایی، فرآیندهای حالت جامد نظیر آسیاب کردن و میکرو امولسیون وجود دارد (۱۳و ۲۱). به خوبی مشخص شده است نانوذرات سنتز شده با استفاده از روشهای فیزیکی و شیمیایی، علاوه بر آلودگیهای زیست محیطی به دلیل استفاده از حلالهای سمی و تحمیل هزینه های بالا از نظر توزیع اندازهٔ ذرات و پایداری، ذراتی بی کفایت بوده که این امر نقش میکروارگانیسم ها را به عنوان کارخانه های زیستی برای تهیه نانو ذرات پر رنگ تر می سازد (۱۰، ۱۲و ۱۶). گرچه در دو دهه گذشته مطالعات زیادی برای تولید میکروبی نانوذرات فلزی (طلا، نقره، روی، منگنز، مس، کروم و پلاتین)، نیمه هادیها (سولفید روی، سولفید کادمیوم، سولفید سرب و سولفید آهن) و اکسیدهای فلزی (زیرکونیوم، اکسید منگنز، مگنتیت و اکسید اورانیوم) صورت پذیرفته که منجر به شناسایی میکرواورگانیسم های مختلف شامل باکتریها، قارچهای رشته ای و مخمرهایی از قبیل *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas stutzeri*، *Lactobacillus* spp.، *Klebsiella* spp.، *Escherichia coli*، *Corynebacterium* spp.، *Rhodococcus* spp.، *Thermoanerobacter* spp.، *Shewanella* spp.، *Torulopsis* spp.، *Fusarium* spp.، *Morganella* spp.، *Aeromonas* spp.، *Acetobacter* spp. ، *Phaenerochate* spp.، *Verticillium* spp.، *Streptomyces* spp. و *Aspergillus* spp. شده است (۱۰، ۱۴و ۲۳). با این وجود در خصوص سنتز نانوذرات اکسید روی توسط سویه های مخمری تا به حال مطالعه ایی صورت نگرفته است. هدف از تحقیق حاضر غربالگری سویه های مخمری با امکان استفاده از آنها به عنوان کاتالیزورهای سبز در تولید برون سلولی نانوذرات اکسید روی بر پایه واکنش زیستی با محلول استات روی بود و یک سویه بومی مخمری از جنس *Candida*، جدا شده از خاک معدن مس سرچشمه کرمان، جهت تولید خارج سلولی نانوکریستالهای اکسید معرفی گردید.

مواد و روشها

مواد شیمیایی و محیطهای کشت مورد استفاده : نمک استات روی با درجه خلوص ۹۸ درصد از شرکت سیگما (St. Louis, Missouri, USA)، محیط کشت کلرامفنیکل رزبنگال آگار به صورت آماده از شرکت Quelab انگلستان، گلوکز، عصاره مخمر و باکتو پپتون جهت تهیه محیط کشت YPD (Yeast Peptone Dextrose) از کمپانی مرک (E. Merck, Darmstadt,

Germany)، آگار از شرکت دیفکو (Difco, MI, USA) و محیط کشت YNB (Yeast Nitrogen Base) از شرکت HiMedia هند تهیه گردید. مواد به کار گرفته شده در واکنش زنجیره ای پلیمرآز از شرکت سیناژن خریداری گردید.

جداسازی سویه های مخمری با توان بالقوۀ تحمل پذیری بالا نسبت به یون سمی روی: ۱۵ نمونه از خاکهای اطراف مجتمع مس سرچشمه کرمان جمع آوری شد. این نمونه ها از عمق ۵ تا ۱۰ سانتیمتری خاک برداشته شده بودند. ۱۰ گرم از هر کدام از نمونه های جمع آوری شده به ۱۵ ارلن هر کدام حاوی ۹۰ میلی لیتر آب پپتونه (۱۰ گرم در لیتر پپتون و ۵ گرم در لیتر نمک سدیم کلراید)۰/۱ درصد وزنی/حجمی، پس از سترون سازی در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، اضافه و سری رقت تهیه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از رقتهای تهیه شده بر روی محیطهای کشت کلرامفنیکل رزبنگال آگار که به آنها غلظت بالایی از استات روی (در غلظت نهایی ۱۰ میلی مولار) پس از استریل کردن از طریق پالایه های غشایی میلی پور با قطر منفذ ۰/۲ میکرونی افزوده شده بود، تلقیح شد (۷). محیطهای مذکور در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز گرمخانه گذاری شدند. سپس کلنیهای رشد یافته از نظر وجود مخمر بررسی شد. این بررسی شامل ریخت شناسی کلنی، تهیه لام و مشاهده در زیر میکروسکوپ نوری بود. سپس کلنیهای مخمری رشد یافته به محیطهای کشت YPD (گلوکز ۲۰ گرم در لیتر، پپتون ۲۰ گرم در لیتر و عصاره مخمر ۲۰ گرم در لیتر با pH برابر ۵/۶) به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت به منظور خالص‌سازی و نگهداری مخمرها انتقال داده شدند (۲).

غربالگری اولیه سویه های مخمری با توان بالقوۀ سنتز خارج سلولی نانوذره اکسید روی: با هدف انتخاب سویه مخمری مناسب با قابلیت سنتز برون سلولی نانوذرات اکسید روی، ابتدا یک لوپ از سویه های مخمری با قابلیت تحمل پذیری نسبت به یون سمی روی که به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد بر روی محیطهای کشت YPD آگار رشد داده شده بودند را به ۲۵ میلی لیتر محیطهای کشت مایع YPD (در ارلنهای ۱۲۵ میلی لیتری) تلقیح نموده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۸۰ و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. سپس ۲/۵ درصد (حجمی/حجمی) از سوسپانسیونهای مخمری تهیه شده به ارلنهای ۱۲۵ میلی لیتری حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط کشت مایع YPD در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد بر روی شیکر مدور (۱۸۰ دور در دقیقه)، به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. پس از جداسازی توده زیستی مخمری با استفاده از سانتریفیوژ یخچالی (g× ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) و سه بار شستشو با آب دو بار تقطیر استریل، ۵ گرم از توده زیستی مذکور در ارلنهای ۱۲۵میلی لیتری که حاوی ۲۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر استریل بود، ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتوردار شیکردار در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و دور ۱۸۰ در دقیقه قرار داده شد. پس از طی دوره گرمخانه گذاری، توده های زیستی مخمری با استفاده از سانتریفیوژ (g× ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) جدا شده و از مایع رویِیِ عاری از میسیلیوم مخمری به عنوان بیوکاتالیزور برای سنتز برون سلولی نانوذرات اکسید روی در مواجهه با محلول استات روی استفاده گردید (۸). برای این منظور به فلاسکهای ۱۲۵ میلی لیتری حاوی ۲۵ میلی لیتر از مایع رویِیِ برداشت شده مخمری، محلول استات روی در غلظت نهایی ۱ میلی مولار اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط مشابه گرمخانه گذاری شد. به طور همزمان از محلول استات روی (بدون تلقیح مایع رویی) به عنوان محیط کنترل استفاده گردید. بررسی اولیه سنتز برون سلولی نانوذرات اکسید روی در محلول واکنش زیستی با روش طیف سنجی UV-visible و از طریق بررسی پیک اختصاصی نانوذرات اکسید روی انجام شد (۸ و ۲۵).

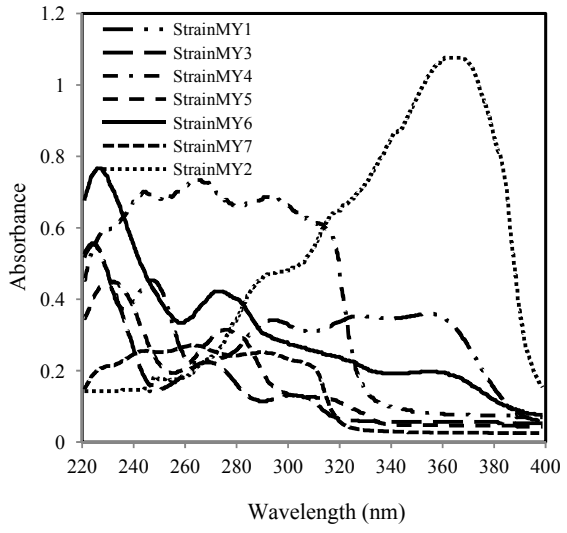
شناسایی فنوتیپی، بیوشیمیایی و ملکولی سویه مخمری MY2 : تشخیص اولیه سویه مخمری MY2 براساس ویژگیهای مورفولوژیک و بیوشیمیایی اعم از شکل میکروسکوپی سلول، خصوصیات رشد بر روی محیطهای کشت جامد، نحوه تولید مثل رویشی، توانایی جذب و تخمیر هیدراتهای کربن، رشد در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، رشد در ۱۰ درصد نمک سدیم کلراید، هیدرولیز ژلاتین و هیدرولیز اوره طبق روش پیشنهادی Kurtzman و Fell بررسی گردید (۹). در ادامه با هدف تعیین هویت دقیق سویه مخمری مذکور، از روش مولکولی و آنالیزهای فیلوژنتیکی استفاده گردید. برای این منظور، ابتدا DNA ژنومی سویه مخمری MY2 با استفاده از روش تخریب به کمک دانه های شیشه ای (Glass bead disruption) طبق روش پیشنهادی Yamada و همکارانش استخراج شد (۲۸). سپس از یک جفت پرایمر همگانی شامل forward primer ITS1 (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) و reverse primer ITS4 (5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´) که مربوط به قسمتی از مناطق حفاظت شده 18S rDNA در مخمرها می باشد، استفاده گردید (۲۷) محصول تکثیری ژن ITS1-5.8 S-ITS4 طبق روش Ashengroph و همکارانش شناسایی شد (۳). محصول خالص PCR برای تعیین توالی به کمپانی ماکروژن کره جنوبی (Macrogen, Seoul, Korea) ارسال گردید. نتایج تعیین توالی با استفاده از الگوریتم BLAST در سایت NCBI مقایسه و ردیف سازی شده و نزدیک ترین توالیها به آن به عنوان توالی مرجع انتخاب شد. در نهایت درخت فیلوژنتیکی با استفاده از مدل Kimura-2 Parameters با الگوریتم نزدیک ترین همسایه (Neighbor-Joining method) و به کمک نرم افزار MEGA 4 ترسیم و تفسیر گردید (۲۲).

تأیید نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط مخمرMY2 با استفاده از آنالیزهای طیف سنجی و میکروسکوپی : جهت تأیید خصوصیت نانوذرات تشکیل شده در محلول واکنش زیست تبدیلی توسط مخمر *Candida* sp. strain MY2، از آزمونهای متفاوت از جمله تستهای UV-visible (Analytik Jena's spectrophotometer SPECORD 210, Carel Zeiss Technology, Germany)، طیف سنج پراش اشعه ایکس (X-ray Diffractometer, D8ADVANCE, Bruker, Germany)، هیستوگرام و منحنی نرمال مربوط به دامنه پراکنش اندازه نانوذرات اکسید روی (*Malvern Instruments Ltd., Particle size analyzer* 2000**,** UK) و همچنین الکترومیکروگرافهای تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (KYKY-EM3200, KYKY Technology Development Ltd., China) استفاده گردید. به منظور تعیین طیف جذبی UV-vis محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، نمونه ها با سرعت ۵۰۰۰×g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، سانتریفیوژ شد و سپس ۲ میلی لیتر از محلول رویی حاصل از واکنش زیست تبدیلی در کوتهای کوارتزی ریخته و جذب آن در طول موجهای ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در ساعتهای صفرم، ۸، ۱۸ و ۲۴ از شروع واکنش زیستی خوانده شد. برای تصویر بردار SEM، نمونه ای از محلول، روی نوار کربن متصل به پایه SEM قرار گرفت و در ۶۰ درجه به مدت ۵ دقیقه خشک گردید. به منظور انجام آنالیز XRD، ابتدا سوپرناتانت عاری از توده زیستی مخمری از فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد و سپس با هدف رسوب نانوذرات اکسید روی، نمونه ها با سرعت ۱۵۰۰۰ ×g به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، سانتریفیوژ شد. پس از چندین مرتبه شستشوی رسوب حاصل با آب دو بار تقطیر استریل، نمونه ها در آون ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد.

نتایج

نتایج غربالگری اولیه مخمرهای با قابلیت سنتز برون

سلولی نانوذره اکسید روی: ۷ سویه مخمری (نامگذاری شده تحت عنوان MY1-MY7) با توان بالقوهٔ ذاتی تحمل پذیری بالا نسبت به یون سمی روی از خاکهای معادن مس سرچشمه کرمان، با استفاده از مشاهدات مورفولوژیکی و تستهای بیوشیمیایی اولیه، براساس تکنیک غنی سازی انتخابی غربالگری شدند. در بین مخمرهای جداسازی شده، سویه مخمری MY2 توان بالقوهٔ بالاتری در سنتز برون سلولی نانوذرات اکسید روی در غلظت ۱ میلی مولار محلول استات روی، در مقایسه با دو سویه دیگر (MY1 و MY6) دارا بود که با استفاده از آنالیز نمونه ها با UV-vis اسپکتروسکوپی تشخیص داده شد (شکل ۱). همانگونه که در شکل (۱) مشاهده می شود، بررسی مشاهدات طیف سنجی به وسیله اسپکتروفتومتری UV-vis، یک باند جذبی قوی، مربوط به پلاسمون رزونانس سطحی (Surface Plasmon Resonance) نانوذرات اکسید روی، را در طول موج ۳۶۵ نانومتر (پیک اختصاصی برای نانوذرات اکسید روی) در محلول زیستی واکنش حاصل از سوپرناتانت عاری از میسیلوم مخمر MY2 در مواجهه با استات روی را نشان داد که براساس منابع معتبر اثبات کننده وجود نانوذرات روی در محلول واکنش زیستی است (۸ و ۲۵). سویه مذکور به عنوان سویه برتر مورد مطالعات فنوتیپی و مولکولی جهت تعیین هویت قرار گرفت.



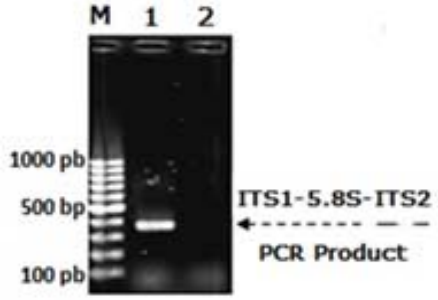
شکل ۱- طیفهای UV-visible اسپکتروسکوپی حاصل از واکنش مایعهای رویِی سویه های مخمری جدا شده با محلول استات روی (با غلظت نهایی ۱ میلی مولار) در شیکر انکوباتوردار با دور rpm ۱۸۰ و به دور از نور، در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت.

نتایج شناسایی سویه مخمری غربالگری شده MY2 : مخمر MY2 که براساس تستهای UV-visible دارای توان بالقوهٔ بالاتری در سنتز نانوذرات اکسید روی در مقایسه با دیگر مخمرهای جدا شده بود، انتخاب و براساس ویژگیهای تشخیصی متداول مخمرها مورد شناسایی قرار گرفت (۹). براساس نتایج بدست آمده از ویژگیهای میکروسکوپی، ماکروسکوپی و تستهای بیوشیمیایی، سویه مذکور به طور موقت از اعضای جنس *Candida* تشخیص داده شد. نتایج تستهای بیوشیمیایی سویه مخمری MY2 در جدول (۱) نشان داده شده است. براساس مشاهدات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و یافته های حاصل از نتایج تستهای بیوشیمیایی و مطابقت آنها با تستهای کلیدی شناسایی مخمرها (۹)، سویه مخمری مذکور دارای بیشترین شباهت با سویه های از جنس *Candida* می باشد.

جدول ۱- نتایج خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک سویه مخمری MY2 جداسازی شده

ویژگی	سویه MY2	ویژگی	سویه MY2
تخمیر گلوکز	منفی	مصرف منابع ازتی:	
مصرف منابع کربنی :		گلوکزآمین	منفی
سوکروز	منفی	ایمیدازول	منفی
گلیسرول	مثبت	رشد در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد	مثبت
استیل گلوکز آمین	منفی	رشد در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد	منفی
سیترات	مثبت	رشد در ۱۰ درصد نمک سدیم کلراید	مثبت
سلوبیوز	منفی	رشد در محیط عاری از ویتامین	مثبت
آرابینوز	مثبت ضعیف	هیدرولیز ژلاتین	منفی
لاکتوز	منفی	هیدرولیز اوره	منفی

به منظور شناسایی مولکولی سویه مخمری MY2 نواحی ژنی ITS1-5.8S-ITS2 توسط PCR تکثیر شد (شکل ۲).



شکل ۲- تکثیر ژن rDNA سویه مخمری MY2 با روش PCR و تشکیل محصول ۳۵۰ جفت بازی. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱: سویه MY2، ستون ۲: کنترل منفی.

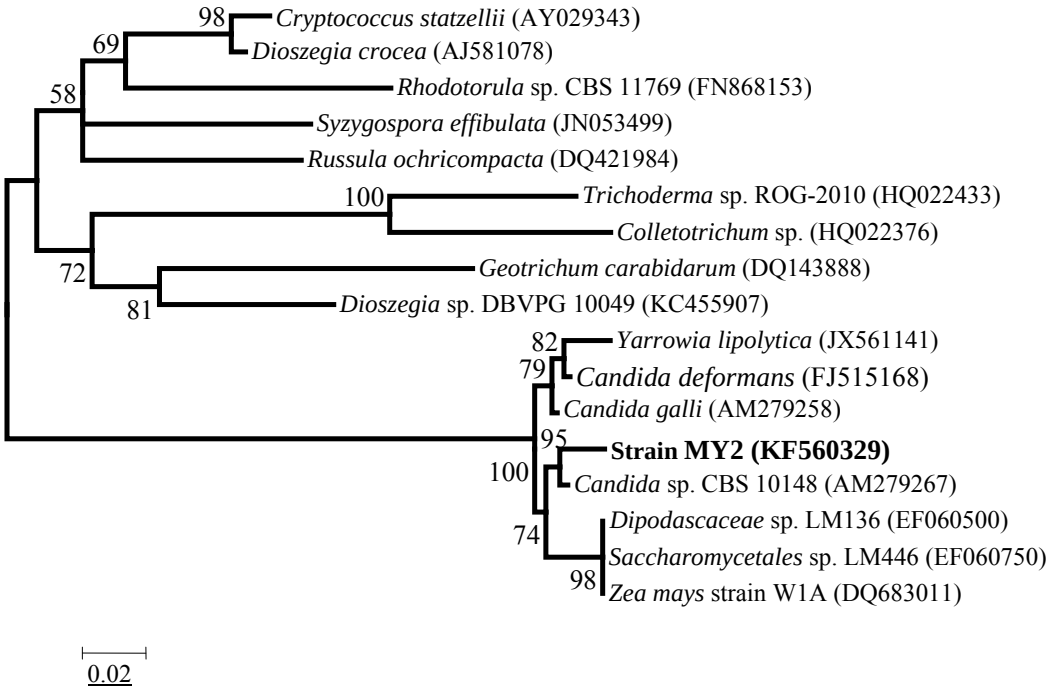
محصول PCR توالی یابی شده با استفاده از نرم افزار BLASTN در بانک اطلاعات ژنی NCBI با توالیهای موجود در بانک ژن مقایسه گردید که براساس نتایج دارای شباهت بیش از ۹۸ درصدی با سویه مخمری ثبت شده *Candida* sp. CBS 10148 با شماره دسترسی AM279267 بود که با نتایج مورفولوژیکی و بیوشیمیایی همسو بود. در نهایت با استفاده از نرم افزار MEGA4 درختچه فیلوژنی با هدف یافتن قرابت تکاملی سویه مخمر جداسازی شده MY2 ترسیم شد که در شکل (۳) قابل مشاهده است.

نتایج بررسیهای اسپکتروسکوپی و میکروسکوپی نانوذرات تولید شده توسط *Candida* sp. strain MY2 :

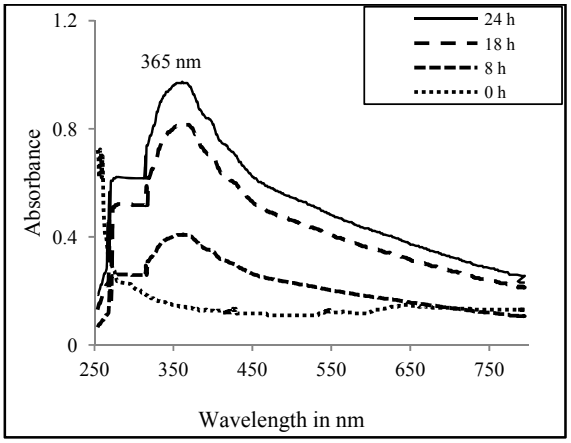
همان گونه که در شکل ۴ مشاهده می شود، سنتز نانوذرات اکسید روی توسط مخمر *Candida* sp. strain MY2 پس از ۸ ساعت از شروع واکنش مشاهده شده و ۲۴ ساعت بعد از واکنش زیستی به بیشترین مقدار خود رسیده و واکنش زیست تبدیلی کامل شده است.

در ادامه مطالعات میکروسکوپ الکترونی روبشی و آنالیز توزیع ذرات با هدف بررسی شکل و پراکنش اندازه نانوذرات اکسید روی سنتز شده به صورت برون سلولی توسط مخمر *Candida* sp. strain MY2 تعیین گردید. در شکل (۵A, B) الکترومیکروگرافهای تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی SEM و دامنه پراکنش اندازه نانوذرات مذکور نشان داده شده است.

میکروگرافهای حاصل، سنتز نانوذرات اکسید روی با پراکنش باریک اندازهٔ ذرات (۵-۵۰ نانومتر) و متوسط اندازهٔ ذرات ۲۳/۵ نانومتر را نشان داد. در نهایت جهت تأیید کریستالی بودن نوع نانوذره سنتز شده از روش پراش اشعه ایکس (XRD) استفاده گردید.

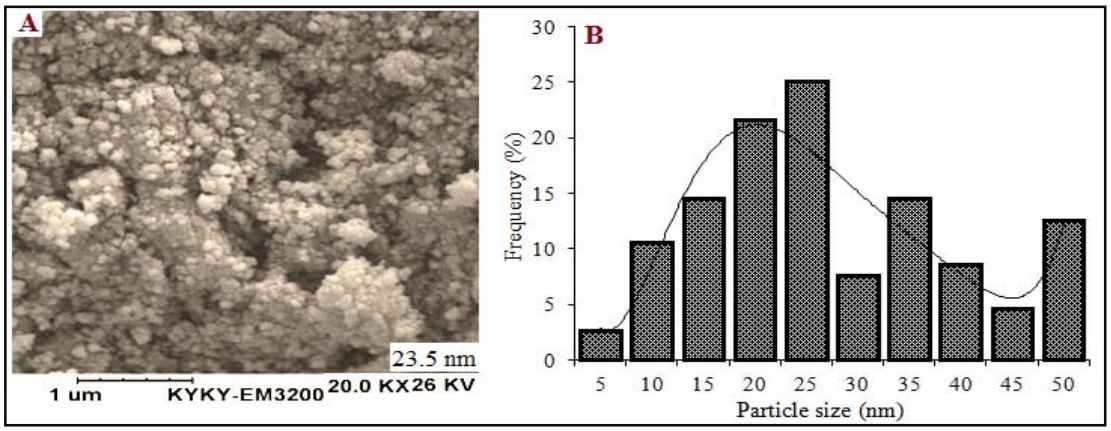


شکل ۳- درختچه فیلوژنتیکی سویه مخمری *Candida* sp. strain MY2 تولید کننده نانوذرات اکسید روی. اعداد داخل پرانتز مربوط به شماره قابل دستیابی در بانک ژن می باشد.

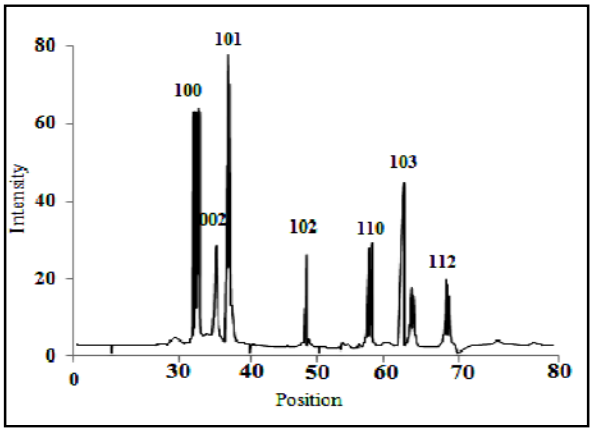


شکل ۴- طیفهای جذبی UV-vis حاصل از واکنش زیستی مایعهای رویی کشت مخمر *Candida* sp. strain MY2 با محلول استات روی با غلظت نهایی ۱ میلی مولار.

ناحیه پرتو ایکس در طیف الکترومغناطیس در محدوده بین پرتو گاما و فرابنفش قرار دارد. با استفاده از این ناحیه طیفی می توان اطلاعاتی در ارتباط با ساختار بلوری، تشخیص فازهای کریستالی و موقعیت آنها و همچنین جنس مواد مورد آزمایش به دست آورد. براساس یافته های به دست آمده که در شکل (۶) نشان داده شده است، نانوذرات بلوری اکسید روی در سطوح ۱۰۰، ۰۰۲، ۱۰۱،۱۰۲، ۱۱۰، ۱۰۳ و ۱۱۲ پیکهایی را نشان داد که با نمونه استاندارد نانوکریستالهای اکسید روی کاملاً همخوانی دارد (۸ و ۱۷).



شکل ۵- (A) تصویر SEM حاصل از نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط مایع رویِ کشتی *Candida* sp. strain MY2 و (B) هیستوگرام مربوط به دامنه پراکنش اندازه نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط مخمر MY2.



شکل ۶- الگوی پراش پودری نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط مایع رویِ کشت مخمر *Candida* sp. strain MY2.

بحث

علوم و فناوری نانو به عنوان یک رویکرد جدید علوم پایه و مهندسی که براساس دخل و تصرف در آرایش اتمها و مولکولها بنا شده است، تولید کارآمد مواد و دستگاهها و سیستمهای با کنترل ماده در مقیاس نانو و بهره برداری از ویژگیها و پدیده های نوظهوری است که در مقیاس نانو توسعه یافته اند (۲۹). به علت خواص منحصر به فرد الکتریکی، مغناطیسی و نوری نانوذرات فلزی روی، از این نانوذرات به عنوان یکی از پرکاربردترین نانوذرات فلزی به کار گرفته شده در ساخت واکنشگرهای قدرتمند، اپتیک، مکانیک، مغناطیس و انرژی، پزشکی و بهداشتی استفاده می شود (۱۲و ۲۴). با توجه به اینکه سنتز فیزیکوشیمیایی نانوذرات مذکور علاوه بر تحمیل هزینه های بالا، آلودگی ناشی از مواد شیمیایی به کار گرفته شده و تولید فرآورده های جانبی خطرناک را به دنبال دارد و همین امر کاربرد نانوذرات مذکور را در صنایع مختلف با مشکل مواجه می سازد (۱۱). بنابراین محققین با الهام از ساختارهای زیستی به توسعه فرآیندهای سنتزی تمیز و دوستدارمحیط زیست برای سنتز نانوذرات فلزی با استفاده از میکروارگانیسم های مختلف روی آورده اند. گرچه گزارشات متعددی از توان بالقوهٔ میکروارگانیسم های مختلف به ویژه باکتریها و کپکهای رشته ای در سنتز نانوذرات فلزی و شبه فلزی

وجود دارد (۱۰و ۱۴و ۲۳)، اما با این وجود، در ارتباط با سنتز میکروبی نانوذرات اکسید روی، مطالعات بسیار کمی صورت گرفته است که در این خصوص می توان به مطالعه Prasad و Jha در سنتز نانوذرات اکسید روی توسط باکتری *Lactobacillus sporogenes* از یک محلول کلریدی به منظور دستیابی به نانوذرات ۵ تا ۱۵ نانومتری (۱۷)، مطالعه Raliya و Tarafdar در سنتز نانوذره اکسید روی توسط قارچ *Aspergillus fumigatus* از محلول نیترات روی (۱۸) و مطالعه Jain و همکارانش در خصوص تولید برون سلولی نانوذرات اکسید روی توسط قارچ *Aspergillus aeneus* بعد از مواجهه با محلول نمکی استات روی پس از ۷۲ ساعت واکنش زیست تبدیلی اشاره نمود (۸). علی رغم مزایای سویه های مخمری نسبت به باکتریها و قارچهای رشته ای از جمله تنوع متابولیکی بالا، قابلیت رشد در دماهای پایین، pH های پایین و فعالیت آب پایین، فعالیت آنزیمی بالا به دلیل ترشحات قابل توجهی از آنزیمها و پروتئینها، ایمن بودن آنها، سهولت دسترسی به مقادیر زیاد بیومس سلولی، سهولت کار با آنها در آزمایشگاه، کشت ساده و ارزان قیمت در مقیاس صنعتی و دستکاری ژنتیکی آسان تر در مقایسه با قارچهای رشته ای، با این حال سنتز نانوذرات اکسید روی عمدتا در سویه های قارچی و باکتریایی صورت گرفته است. در این مطالعه برای اولین بار به کارگیری سویه های مخمری در تولید نانوذرات اکسید روی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که غربالگری و جداسازی سویه های مخمری با توان بالقوهٔ ذاتی تحمل پذیری به غلظتهای بالایی از یون سمی روی (۱۰ میلی مولار) و امکان سنتز برون سلولی نانوذرات اکسید روی میسر بوده به طوری که از میان ۷ سویه مخمری جدا شده، *Candida* sp. strain MY2 قادر به سنتز نانوذرات اکسید روی بود. در ادامه به منظور تأیید تولید برون سلولی نانوذرات اکسید روی توسط سویه مخمری مذکور، از **مایع** رویِی عاری از توده زیستی مخمری به عنوان کاتالیزور زیستی برای تهیه نانوذرات اکسید روی از محلول استات روی با غلظت ۱ میلی مولار استفاده شد. نتایج به دست آمده توان بالقوهٔ بالای سویه مخمری *Candida* sp. strain MY2 در تولید سریع و برون سلولی نانوذرات اکسید روی را نشان می دهد به طوری که می توان از ترشحات این مخمر به عنوان بیوکاتالیزور ایمن و ارزان قیمت در تبدیل زیستی محلول استات روی به نانوکریستالهای اکسید روی با توزیع نسبتاً باریک اندازهٔ ذرات (۵-۵۰ نانومتر) و متوسط اندازهٔ ذرات ۲۳/۵ نانومتر پس از ۸ ساعت واکنش زیست تبدیلی بهره جست که این مدت زمان کوتاه نشان دهنده سرعت بالای فرآیند سنتز نانوذره اکسید روی توسط سویه بومی مذکور می باشد. علاوه بر این سنتز نانوکریستالهای اکسید روی توسط مخمر *Candida* sp. strain MY2 به صورت خارج سلولی بوده است. مزیت تهیه برون سلولی نانوذره اکسید روی توسط مخمر بومی غربالگری شده در این است که تولید داخل سلولی نانو ذره مذکور پر هزینه بوده و نیاز به مراحل اضافی جهت استخراج نانوذرات از درون سلول دارد (۱). بنابراین به وسیله مخمر مذکور می توان به تولید سریع و برون سلولی نانوذرات اکسید روی، بدون نیاز به مراحل پیچیده استخراج، دست یافت. غربالگری میکروارگانیسم های بومی جدید با قابلیت تولید نانوکریستالهای فلزی می تواند جایگاه استفاده از روشهای میکروبی در تولید نانومواد را بهبود بخشیده و آینده مناسب تری را ترسیم نماید. با توجه به اینکه هدف اصلی از این تحقیق، تهیه زیستی نانوکریستالهای اکسید روی به صورت خارج سلولی برای مطالعات آسان تر و ایجاد شرایط مناسب برای تولید مطلوب نانوذرات روی بوده است، بنابراین امید می رود با بهینه سازی پارامترهای فیزیکوشیمیایی مؤثر بر فرآیند سنتز میکروبی نانوذرات مذکور، بررسی پایداری آنها و همچنین مطالعه مکانیسمهای میکروبی در احیای زیستی یونهای سمی روی به فرم عنصری آن البته در قالب نانوذره اکسید روی، علاوه بر ترویج روشهای مبتنی بر شیمی سبز، بتوان از ظرفیتهای بالقوه سویه مخمری بومی به عنوان زیست

واکنشگر زیستی ایمن، ساده و ارزان قیمت در مقیاسهای بزرگتر از مقیاس آزمایشگاهی (Scale up) بهره جست.

نتیجه گیری

پژوهش حاضر اولین گزارش به کارگیری سویه های مخمری در تولید نانوذرات اکسید روی است. به دلیل کاربردهای گسترده و ویژگیهای ارزنده نانوذرات روی در علم فناوری نانو، این تحقیق می تواند زمینه ساز مطالعات فراگیر در استفاده از روشهای زیستی با استفاده از سلولهای مخمری به عنوان کاتالیزورهای سبز کارآمد در تولید برون سلولی نانوکریستالهای اکسید روی را فراهم آورد.

تشکر و سپاسگزاری: این پروژه در قالب طرح پژوهشی به شناسه ۴/۴۲۳۸۰/۱۳۹۱ با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان انجام گرفته است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان نهایت سپاس و قدردانی به عمل می آید.

منابع

1. Ahmad, A. Senapati, S. Islam Khan, M. Kumar, R. Ramani, R. and Srinivas, V. and Sastry, M. (2003) Intracelluar synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* sp. Nanotechnology 14: 824-828.

2. Alonso, F.O.M. Oliveira, E.B.L. Dellamora-Ortiz, G.M. and Pereira-Meirelles, F.V. (2005) Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen leves. Brazilian J Chem Eng 22: 9-18.

3. Ashengroph, M. Nahvi, I. Zarkesh-Esfahani, H. and Momenbeik, F. (2011) *Candida galli* strain PGO6: a novel isolated yeast strain capable of transformation of isoeugenol into vanillin and vanillic acid. Curr microbiol 62: 990-998.

4. Bhattacharya, R. and Mukherjee, P. (2008) Biological properties of "naked" metal nanoparticles. Adv Drug Delivery Rev 60: 1289–1306.

5. Hagedorn, S. and Kaphammer, B. (1994) Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. *Annu Rev Microbiol* 48: 773-800.

6. Handy, R.D. Kammer, F. Lead, J.R. Hassellöv, M. Owen, R. and Crane, M. (2008) The Ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. Ecotoxicology 17: 287-314.

7. Hernandez, A. Martın, A. Aranda, E. Perez-Nevado, F. and Gordoba, M.G. (2007) Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. Food Microbiol 24: 346–351.

8. Jain, N. Bhargava, A. Tarafdar, J.C. Singh, S.K. and Panwar, J. (2013) A biomimetic approach towards synthesis of zinc oxide nanoparticles. Appl Microbiol Biotechnol 97: 859-869.

9. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (2000) The yeasts: a taxonomic study (4th revised and enlarged edition). Elsevier: Amsterdam; P. 1–525.

10. Li, X. Xu, H. Chen, Z. and Chen, G. (2011) Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. J Nano Mat 2011: 1-16.

11. Mandal, S. Phadtare, S. and Sastry, M.(2005) Interfacing biology with nanoparticles. Curr Appl Phys 5: 127-132.

12. Mandal, D. Bolander, M.E. Mukhopadhyay, D. Sarkar, G. and Mukherjee, P. (2006) The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. Appl Microbiol Biotechnol 69: 485–492.

13. Moghaddam, A.B. Nazari, T. Badraghi, J. and Kazemzad, M. (2009) Synthesis of ZnO nanoparticles and electro deposition of polypyrrole/ZnO nanocomposite film. Int J Electrochem Sci 4: 247–257.

14. Narayanan, K.B. and Sakthivel, N. (2010) Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv Colloid Interface Sci* 156: 1-13.

15. Park, S. Lee, J.H. Kim, H.S. Park, H.J. and Lee, J.C. (2009) Effects of ZnO nanopowder dispersion on photocatalytic reactions for the removal of Ag+ ions from aqueous solution. J Electroceram 22: 105–119.

16. Prabhu, S. and Poulose, E.K. (2012) Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. Nano Lett 2: 1-10.

17. Prasad, K. and Jha, A.K. (2009) ZnO Nanoparticles: Synthesis and Adsorption Study. Natural Science 1: 129-135.

18. Raliya, R. and Tarafdar, J.C. (2013) ZnO nanoparticle biosynthesis and its effect on phosphorous-mobilizing enzyme secretion and gum contents in cluster bean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.). Agric Res 2: 48–57.

19. Reeves, J.F. Davies, S.J. and Dodd, N. (2008) Hydroxyl radicals (OH & H_2O_2) are associated with Titanium Dioxide (Tio2) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. Mutat Res Fund Mol M 640: 113-122.

20. Salata, O.V. (2004) Applications of nanoparticles in biology and medicine. J Nanobiotech 2: 1-6.

21. Shokuhfar, T. Vaezi, M.R. Sadrnezhad, S.K. and Shokuhfar, A. (2008) Synthesis of zinc oxide nanopowder and nanolayer via chemical processing. Int J Nanomanuf 2: 149-162.

22. Tamura, K. Dudley, J. Nei, M. and Kumar, S. (2007) Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24: 1596–1599.

23. Thakkar, K.N. Mhatre, S.S. and Parikh, R.Y. (2009) Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomedicine NBM 6: 257-262.

24. Vaseem, M. Ahmad, U. and Yoon-Bong, H. (2010) ZnO nanoparticles: growth, properties, and applications. PhD. thesis; American Scientific Publishers; chapter 4; pp.1-36.

25. Waghmare, S.S. Deshmukh, A.M. Kulkarni, S.W. and Oswaldo, L.A. (2011) Biosynthesis and characterization of manganese and zinc nanoparticles. J Environ Res Technol 1: 64-69.

26. Wang, Z.L. (2008) Energy harvesting for self-powered nanosystems. Nano Res 1: 1-8.

27. White, T.J. Bruns, T. Lee, S. and Taylor, J.T. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A. Gelfand, D.H. Sninsky, J.J. White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. New York; Academic Press.

28. Yamada, Y. Makimura, K. Mirhendi, H. Ueda, K. Nishiyama, Y. Yamaguchi, H. and Osumi, M. (2002) Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. *Jpn J* Infect Dis 55: 122–125.

29. Ziegler, C. (2004) Cantilever-based biosensors. Anal Bioanal Chem 379: 946-959.

Fast and extracellular synthesis of zinc oxide nanocrystals using the novel isolated yeast strain *Candida* sp. MY2

Ashengroph M.

Biology and Biotechnology Dept., Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. of Iran

Abstract

Microorganisms as potent eco-friendly green nanofactories have the potential to control the size and shape of biological nanostructures. Zinc oxide nanoparticles have found much potential in pharmaceuticals, biological sciences, biomedical sciences and therapy diagnosis. In the current investigation, the native yeast strains screen as potent biocatalysts for extracelluar synthesis of ZnO nanoparticles. Using enrichment culture, 7 yeast strains isolated from collecting soil samples from Cooper mines. Among them, the strain MY2 had a great potential for extracellular synthesis of ZnO nanoparticles. The isolated yeast strain selected and identified as *Candida* sp. strain MY2 (GenBank accession number KF560329**)** based on phenotypic and molecular characteristics. The production of ZnO nanoparticles in bioconversion mixture was studied using UV-vis spectroscopy. The XRD analysis confirmed that the produced ZnO nanoparticles are in the form of nanocrystaline. Scanning electron microscopy (SEM) and Particle size analyzer were used to carry out surface morphology and size distribution characteristics of the produced nanoparticles. The results obtained in this investigation showed the potential of yeast strain of *Candida* sp. MY2 to produce fast and extracellular of ZnO nanoparticles and it can be used as safe and cost effective biocatalyst to catalysis ZnO nanoparticles with narrow particle size distribution in the range of 5-50 nm and an average size 23.5 nm after incubation for 8 hours.

Key words: Green synthesis, Zinc oxide nanoparticles, Extracellular, *Candida* sp. strain MY2.