

تولید زیستی نانوذرات طلا با استفاده از باکتری *Streptomyces sp. ERI-3*

ندا فقری زنون^۱، مجتبی صلوتی^{۲*}، لیلا دولتیاری^۳

۱- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه و پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه و پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران

۳- کارشناسی ارشد، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه و پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران

*زنجان، کدپستی ۴۵۱۵۶۵۸۱۴۵

saloutim@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۰/۴/۸، پذیرش: ۹۰/۵/۱۷)

چکیده- ساخت نانوذرات به روش‌های شیمیایی، به دلیل آلودگی ناشی از مواد شیمیایی پیش‌ساز و تولید محصولات جانبی خطرناک، کاربرد پزشکی نانوذرات را با مشکل مواجه می‌سازد. روش‌های فیزیکی سنتز نانوذرات نیز کم‌بازده و پرهزینه‌اند. بنابراین، نیاز فزاینده‌ای جهت ارائه روش‌های سنتزی کم‌هزینه، غیرسمی و بی‌خطر برای محیط زیست وجود دارد و این نقش روش‌های زیستی سنتز نانوذرات را پررنگ‌تر می‌سازد. در بررسی حاضر، روشی ساده و زیست‌سازگار برای بیوسنتز نانوذرات طلا با استفاده از سویه باکتریایی *Streptomyces sp. ERI-3* ارائه می‌شود. بدین منظور باکتری *Streptomyces sp. ERI-3* از معدن مس سونگون اهر جداسازی شد. بیومس حاصل از این ایزوله با محلول HAuCl_4 در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، بر روی شیکر مدور (۲۰۰ دور در دقیقه)، به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. اسپکتروسکوپی UV-vis، پراش اشعه ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) جهت بررسی تولید نانوذرات طلا استفاده شد. نانوذرات حاصل بیشینه جذب را در طول موج ۵۴۰ نانومتر (طول موج اختصاصی نانوذرات طلا) اسپکتروسکوپی UV-vis نشان دادند. آنالیز XRD نانوذرات حاصل اثبات کرد که ذرات سنتز شده به صورت نانوکریستال‌های طلایند. تصاویر به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی TEM سنتز نانوذرات طلا، به دو صورت متصل به سطح سلول و خارج سلول، با ابعاد ۱۰۰-۲۰ نانومتر و به اشکال کروی را نشان دادند.

کلیدواژگان: نانوذرات طلا، تولید زیستی، *Streptomyces sp. ERI-3*

۱- مقدمه

از دهه ۱۹۷۰، محققان در حال تلاش جهت ارائه سیستم‌های قادر به انتقال هدفمند مواد به نواحی خاصی از بدن، برای تشخیص و درمان بسیاری از بیماری‌ها به ویژه سرطان‌ها، هستند. عدم سمیت سلولی نانوذرات طلا برای بافت‌های سالم، آن‌ها را به کاندیداهای مناسبی برای کاربردهای درمانی در شرایط درون‌تنی^۱ تبدیل می‌سازد. ویژگی‌های بی‌نظیر نانوذرات طلا از قبیل اندازه‌هسته، نسبت بالای سطح به حجم و آسان بودن عملکردی کردن آن‌ها با هر نوع مولکول زیستی، امکان هدف‌گیری، انتقال و تنظیم فرایندهای تحویل دارو را فراهم می‌آورد [۱-۳]. نانوذرات طلا همچنین می‌توانند به‌عنوان سیستم‌های انتقال ژن برای درمان بیماری‌های ژنتیکی عمل کنند [۴-۷].

تولید نانوذرات طلا با استفاده از روش‌های شیمیایی، علاوه بر تحمیل هزینه‌های بالا، آلودگی‌های زیست‌محیطی بسیاری را به همراه دارد. روش‌های فیزیکی تولید نانوذرات طلا نیز، علاوه بر سختی مسیر فرایند، دارای بازده تولید کم است. از سوی دیگر، با توجه به کاربرد رو به رشد نانوذرات طلا، ضرورت تولید انبوه این نانوذرات توسط روش‌های زیستی حس می‌شود [۸، ۹]. سیستم‌های زیستی از قبیل گیاهان، جلبک‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و باکتری‌ها قادر به تولید نانوذرات طلا هستند. در زمینه تولید زیستی نانوذرات، باکتری‌ها بیشترین اهمیت را به خود اختصاص داده‌اند. از مزایای استفاده از باکتری‌ها جهت تولید نانوذرات سهولت کار با آن‌ها و دستکاری ژنتیکی آسان به دلیل فقدان هسته مشخص است. بررسی‌های به‌عمل آمده

تاکنون نشان داده‌اند که توده زیستی حاصل از چند جنس باکتریایی از جمله *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Shewanella algae*، *Escherichia Rhodopseudomonas capsulate*، *Thermomonospora sp.*، *Lactobacillus sp.*، *coli* و *Rhodococcus sp.* قادر به سنتز نانوذرات طلا هستند [۹-۱۳]. با این حال بررسی‌های صورت گرفته در زمینه تولید نانوذرات طلا با استفاده از توده زیستی باکتریایی محدود بوده و نیاز به تحقیقات گسترده‌تری دارد.

جنس استرپتومایسس متعلق به راسته اکتینومیسیتال‌ها بوده و به طور گسترده‌ای در خاک یافت می‌شود. این جنس منبع بالقوه‌ای برای تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر متابولیت‌های ثانویه در نظر گرفته می‌شود که ناشی از توانایی در ترشح مقادیر زیادی از آنزیم‌های خارج سلولی است [۱۴]. بنابراین، استفاده از استرپتومایسس‌ها جهت سنتز نانوذرات بسیار جالب توجه خواهد بود. تولید زیستی نانوذرات طلا با استفاده از باکتری‌های استرپتومایسس در سال ۲۰۰۸ توسط آقای ساپکال و همکارانش بدون ذکر گونه باکتری گزارش شده است [۱۵]. هدف از تحقیق حاضر، تولید نانوذرات طلا با استفاده از توده زیستی سویه ERI-3 *Streptomyces sp.* به‌منظور معرفی یک سویه بومی در ایران، جهت تولید نانوذرات طلا بوده است.

۲- مواد و روش‌ها**۲-۱- مواد شیمیایی و محیط‌های کشت**

محلول HAuCl_4 از شرکت سیگما-آلدریچ (Sigma-Aldrich) خریداری شد. کلیه مواد شیمیایی و سایر مواد مورد نیاز برای ساخت محیط‌های کشت از شرکت مرک (Merck) خریداری شد.

1. In vivo

۲-۲- جداسازی باکتری استرپتومایسس

نمونه برداری از معدن مس سونگون اهر، واقع در شمال غرب ایران، صورت پذیرفت. جهت جداسازی جنس استرپتومایسس از نمونه های خاک معدن، رقت های اولیه و ثانویه تهیه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از رقت ثانویه در محیط کشت افتراقی استرپتومایسس (استارچ کازئین آگار^۲ محتوی ۱۰ گرم نشاسته، ۰/۳ گرم کازئین، ۰/۰۲ گرم کربنات کلسیم، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن، ۲ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۲ گرم نترات پتاسیم، ۰/۰۵ گرم سولفات منیزیم، ۲ گرم کلرید سدیم و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر استریل در pH ۷) کشت شد. بعد از ۵ تا ۷ روز گرمخانه گذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، باکتری های استرپتومایسس براساس ویژگی های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی جداسازی شدند [۱۶].

۲-۳- شناسایی مولکولی ایزوله

DNA ژنومی ایزوله مورد نظر بدین ترتیب جداسازی شد؛ ژن 16S rRNA با استفاده از DNA taq پلیمرز و پرایمرهای 27f (51 AGT TTG ATC CTG GCT) و 31 (51 ACG GCT ACC TTG CAG) و 31 (TTA CGA CTT) طی روش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) تکثیر یافت. شرایط برای چرخه حرارتی بدین ترتیب بود؛ تخریب DNA هدف در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای یک دقیقه، دمای اتصال پرایمر در دمای ۵۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و نهایتاً پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه در پایان چرخه، مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و سپس در دمای ۴ درجه

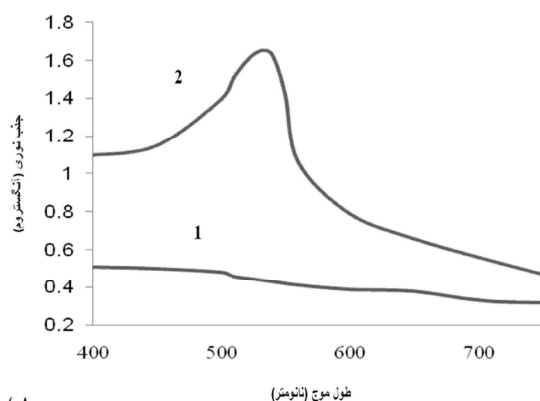
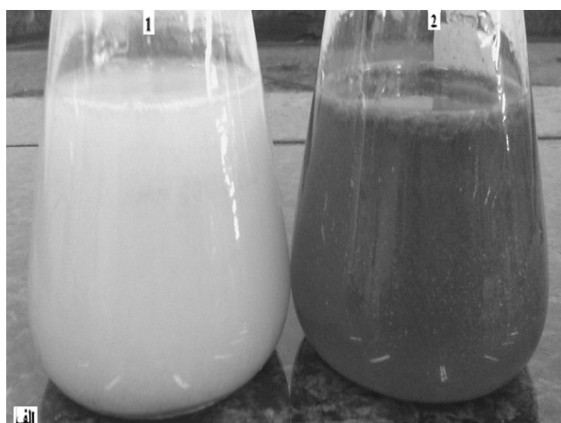
سانتی گراد نگهداری شد [۱۷]. فرآورده حاصل از PCR با استفاده از برنامه توالی یابی خودکار (Genetic Analyser 3130, Applied Biosystem, USA) توالی یابی شد. توالی به دست آمده با استفاده از نرم افزار NCBI BLAST موجود در سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/website> از نظر میزان تشابه با سایر گونه های باکتریایی موجود در بانک ژنومی مقایسه شد.

۲-۴- تولید زیستی نانوذرات طلا

توده زیستی باکتری طی رشد ایزوله در ارلن مایرهای ۵۰۰ میلی لیتری محتوی محیط MGYB برات (۳ گرم عصاره مالت، ۱۰ گرم گلوکز، ۳ گرم عصاره مخمر و ۵ گرم پپتون در یک لیتر آب مقطر استریل در pH ۷) تهیه شد [۱۸]. نمونه ها داخل گرمخانه متحرک^۳ در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. سپس، توده زیستی حاصل از رشد باکتری با استفاده از سانتریفیوژ (۶۰۰۰×g) در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه از محیط مایع جداسازی شد. توده زیستی حاصل سه بار با آب مقطر استریل شستشو داد شد، تا هرگونه اجزای محیط کشت از آن جدا شود. محلول ۱ میلی مولار H₂AuCl₄ (شرکت سیگما) با استفاده از آب مقطر دیونیزه تهیه و pH آن با محلول NaOH ۰/۱ مولار در ۷ تنظیم شد [۱۰]. حدود ۲ گرم از وزن خیس توده زیستی در ارلن مایر ۵۰۰ میلی لیتری جمع آوری و ۱۰۰ میلی لیتر از محلول H₂AuCl₄ به آن اضافه شد. سپس نمونه ها در گرمخانه متحرک، در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت، گرمخانه گذاری شدند.

2. Starch casein agar (S.C.A)

3. Shaker-incubator



ب

شکل ۱ الف) تغییر رنگ بیوس *Streptomyces sp. ERI-3* قبل (۱) و بعد (۲) از ۷۲ ساعت شیک-انکوباسیون، ب) اسپکتروفتومتری نمونه‌ها قبل از معلق شدن باکتری در محلول طلا (۱) و بعد از معلق شدن در محلول طلا (۲) به مدت ۴۸ ساعت

نتایج آنالیز XRD نیز تشکیل نانوذرات طلا توسط *Streptomyces sp. ERI-3* را اثبات کرد، به طوری که مقایسه منحنی XRD حاصل از بررسی حاضر با نمونه استاندارد نشان داد که ذرات طلای تشکیل شده در این بررسی به شکل نانوکریستالی بودند. همان گونه که در شکل ۲ نشان داده می شود، نانوذرات طلا در سطوح ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰ و ۳۱۱ به ترتیب پیک‌هایی با مقادیر $38/26^\circ$ ، $44/60^\circ$ ، $64/67^\circ$ و $77/54^\circ$ را نشان دادند.

۲-۵- شناسایی نانوذرات طلا

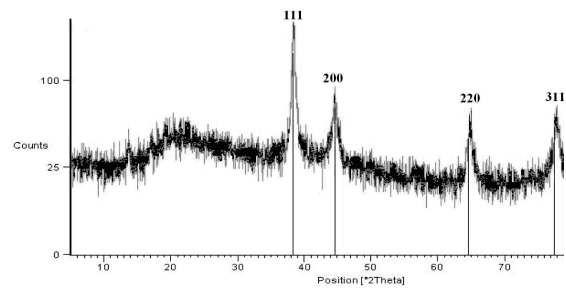
در مرحله اول، تولید نانوذرات طلا با مشاهده تغییر رنگ مخلوط سوسپانسیون سلولی و محلول HAuCl_4 مشخص شد. سانتریفیوژ نمونه‌ها با سرعت $15000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به منظور تعیین طیف جذبی محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-vis (Shimadzu, UV Pharma spec 1700) انجام شد. آنالیز XRD نمونه‌های خشک شده در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت یز با استفاده از دستگاه پراش اشعه ایکس (Phillips 1800) انجام شد. بعد از آماده‌سازی زیستی نمونه‌ها [۱۹]، نانوذرات سنتز شده با میکروسکوپ الکترونی عبوری (Phillips EM 208S) از نظر مکان تولید، شکل و اندازه نانوذرات بررسی شدند.

۳- یافته‌ها

کلنی‌های خالص به دست آمده از رشد استریپتومایسس جداسازی شده از معدن مس سونگون بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی به عنوان *Streptomyces sp. ERI-3* شناسایی شد [۱۶، ۱۴]. توده زیستی به دست آمده از رشد این ایزوله قادر به احیای HAuCl_4 به نانوذرات طلا بود که با ایجاد تغییر رنگ مخلوط واکنش از زرد-سفید به قرمز-ارغوانی شناسایی شد (شکل ۱ الف). آنالیز نمونه‌ها با اسپکتروفتومتری UV-vis پیک جذبی را در طول موج ۵۴۰ نانومتر (پیک اختصاصی برای نانوذرات طلا) نشان داد که نشان دهنده تولید نانوذرات طلا توسط ایزوله جداسازی شده بود (شکل ۱ ب).

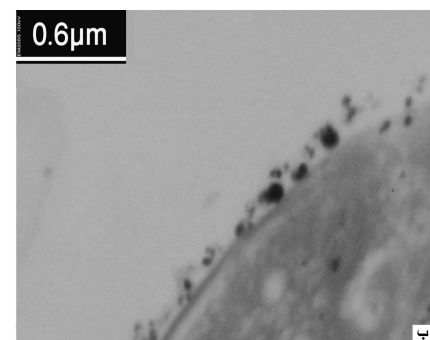
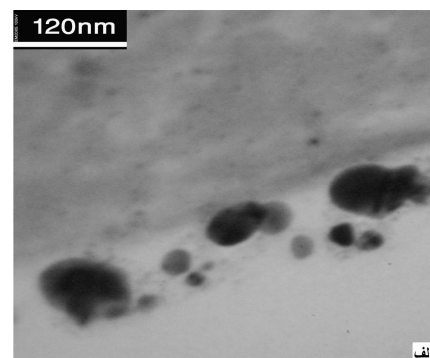
۴- بحث

تولید نانوذرات طلا از طریق سیستم‌های زیستی، به‌ویژه باکتریایی، از بهترین روش‌های تولیدی زیست‌سازگار به‌شمار می‌آید [۸، ۹]. در تحقیق حاضر، سعی شده است، با بهره‌گیری از باکتری‌های استرپتومایسس جداشده از معدن مس سونگون ایران، یک سویه بومی برای تولید نانوذرات طلا، که دارای کاربردهای فراوان در زمینه‌های مختلف مخصوصاً بخش پزشکی هستند، عرضه شود. در این بررسی، مخلوط توده زیستی باکتریایی و محلول طلا در ابتدا دارای رنگ سفید مایل به زرد بود، اما با سپری شدن مدت زمان ۴۸ ساعت رنگ مخلوط واکنش به قرمز ارغوانی تغییر پیدا کرد. نتایج تحقیقات مندل و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نیز نشان می‌دهد که توده زیستی باکتری باسیلوس سوبتیلیس، بعد از مواجهه با محلول HAuCl_4 می‌تواند در مدت ۴۸ ساعت یون‌های طلا را به نانوذرات طلا احیا کند و سپس آن‌ها را در دیواره سلولی خود انباشته سازد [۹]. سرعت تولید نانوذرات طلا توسط این باکتری گرچه قابل مقایسه با باکتری مورد بررسی در تحقیق حاضر است، اما باکتری *Streptomyces sp. ERI-3* با تولید خارج سلولی نانوذرات از این نظر ارجح است. در تحقیقات دیگری نیز گرچه گزارش شده است که چند جنس باکتریایی مانند شوانلا آگه‌آ، سودوموناس آیروزینوزوا و ردوسودوموناس کپسولاتا قادر به تولید خارج سلولی نانوذرات طلا در طی تماس توده زیستی خود با محلول HAuCl_4 هستند، اما سرعت تولید نانوذرات در این باکتری‌ها کمتر از باکتری مورد مطالعه ماست، [۱۳، ۱۸]. در تحقیق دیگری نیز، توسط احمد و همکارانش، اکتینومیسست گرمادوست ترمومونوسپورا نیز بعد از ۱۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری تغییر رنگ، از رنگ سفید مایل به



شکل ۲ آنالیز XRD حاصل از نمونه‌های سنتزکننده نانوذرات طلا

تصاویر به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی TEM نیز سنتز نانوذرات طلا، به صورت خارج سلولی و متصل به سطح سلول، با ابعاد ۱۰۰-۲۰ نانومتر و اشکال کروی را نشان داد (شکل ۳ الف و ب).



شکل ۳ میکروگراف‌های TEM به‌دست آمده از نانوذرات تولیدشده توسط *Streptomyces sp. ERI-3* (الف) نانوذرات سنتز شده به صورت خارج سلولی (ب) نانوذرات سنتز شده به صورت متصل به سطح سلول

pH، مدت زمان گرمخانه‌گذاری و دما، بتوان کل تولید نانوذرات طلا توسط *Streptomyces sp. ERI-3* را به حالت خارج سلولی و بازده بیشتر سوق داد [۱۳].

۵- مراجع

- [1] Daniel, M. C. and Astruc, D., (2004) "Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties and applications toward biology, catalysis and nanotechnology", *Chem. Rev.*, Vol. 104, pp. 293-346.
- [2] Jianrong, C., Yuqing, M., Nongyue, H., Xiaohua, W. and Sijiao, L., (2004) Nanotechnology and biosensors. *Biotech Advances*. 22, 505-518.
- [3] Gade, A., Ingle, A., Whiteley, C. & Rai, M. (2010) "Mycogenic metal nanoparticles: progress and applications", *Biotech. Lett.*, 32, 593-600.
- [4] Hirsch, L. R., Stafford, R. J., Bankson, J. A., Sershen, S. R., Rivera, B., Price, R. E., Hazle, J. D., Halas, N. J. and West, J. L., (2003) "Nanoshell mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100, 13549-13554.
- [5] Sinha, R., Kim, G. J., Nie, S. and Shin, D. M., (2006) "Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery", *Mol. Cancer. Ther.*, 5(8), 1909-1917.

زرد به قرمز ارغوانی، به معنای تولید نانوذرات طلا را نشان داده است که این مدت زمان طولانی نشان دهنده آهستگی فرایند سنتز نانوذرات طلا توسط این باکتری است [۱۰].

تولید نانوذرات طلا با روش اسپکتروسکوپی UV-vis نیز به آسانی قابل بررسی است، به طوری که با استناد بر طیف‌های به دست آمده از اسپکتروسکوپی UV-vis و ایجاد پیک جذبی در طول موج ۵۴۰ نانومتر (طول موج اختصاصی نانوذرات طلا) تولید نانوذرات طلا توسط باکتری *Streptomyces sp. ERI-3* تایید شد. تشکیل چنین پیک جذبی در مورد باکتری‌های دیگر تولیدکننده نانوذرات طلا نیز گزارش شده است [۹-۱۳]. در آنالیز XRD نمونه‌ها نیز پیک‌های حاصل با پیک‌های مربوط به نانوکریستال‌های طلا هماهنگی نشان می‌دهد [۱۱، ۲۰].

استفاده از تکنیک میکروسکوپ الکترونی روشی سودمند برای تعیین اندازه، شکل و مکان سنتز نانوذرات است. تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی TEM سنتز نانوذرات طلا به صورت خارج سلولی و متصل به سطح سلول توسط باکتری *Streptomyces sp. ERI-3* را نشان داد. مزیت تولید خارج سلولی نانوذرات طلا توسط باکتری ایزوله شده در تحقیق حاضر در این است که سنتز داخل سلولی نانوذرات هزینه‌بر بوده و نیاز به یک مرحله اضافی جهت استخراج نانوذرات از درون سلول دارد [۱۲]. بنابراین، چنانچه از نتایج بررسی حاضر برمی‌آید، با استفاده از باکتری *Streptomyces sp. ERI-3* تولید سریع و خارج سلولی نانوذرات طلا، بدون نیاز به مراحل پیچیده استخراج، می‌تواند صورت گیرد. به نظر می‌رسد، با اعمال تغییراتی در شرایط واکنش توده زیستی *Streptomyces sp. ERI-3* و محلول HAuCl_4 از نظر

- Rhodopseudomonas capsulate. *Mat Lett.*, 61, 3984-3987.
- [12] Ahmad, A., Senapati, S., Islam Khan, M., Kumar, R., Ramani, R., Srinivas, V. and Sastry, M., (2003) "Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* sp. *Nanotech.* 14, 824-828.
- [13] Mollazadeh Moghaddam, K., (2010) "An Introduction to microbial metal nanoparticle preparation method", *Journal of Young Investigators*, 19, 1-6.
- [14] Valan Arasu, M., Duraipandiyan, V., Agastian, P. and Ignacimuthu, S. (2009) "In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India)", *Med. Mycology.*, 19, 22-28.
- [15] Sapkal, M. R. and Deshmukh A. M., "Biosynthesis of gold nanoparticles by *Streptomyces* species", *Research Journal of Biotechnology*(2008), 3, 36-39.
- [16] Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, eight ed, Williams and Wilkins, Baltimore, 1974.
- [17] Enticknap, J. J., Kelly, M., Peraud, O. and Hill, R. T. (2006) "Characterization of a culturable alpha proteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via
- [6] Kathiresan, M. A., Manivannan, S., Nabeel, M. A. and Dhivya, B., (2009) "Studies by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment", *Colloids Surf. B.*, 71, 133-137.
- [7] Simon-Deckers, A., Burn, E., Gouget, B., Carriere, M. and Sicard-Roselli, C., (2008) "Impact of gold nanoparticles combined to X-ray irradiation on bacteria", *Gold Bulletin*, 41(2), 187-194.
- [8] Mohanpuria, P., Rana, N. K. and Yadav, S. K. (2008) "Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications", *Nanopart. Res.*, 10, 507-517.
- [9] 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.
- [10] Ahmad, A., Senapati, S., Islam Khan, M., Kumar, R. and Sastry, M., (2003) "Extracellular biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by a novel extremophilic actinomycete, *Thermomonospora* sp. *Langmuir.* 19, 3550-3553.
- [11] Shiyong, H., Zhirui, G., Yu, Z., Song, Z., Jing, W. and Ning, G. (2007) Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria

- [19] Gericke, M. and Pinches, A., (2006) "Microbial production of gold nanoparticles", *Gold Bulletin*, 39(1), 22-28.
- [20] Southamand, G. and Beveridge, T., (1996) "The occurrence of sulfur and phosphorus within bacterially derived crystalline and pseudocrystalline octahedral gold formed in vitro", *Geochimica et Comochimica Acta*, 60(22), 4369-4376.
- sponge larvae", *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3724-3732.
- [18] Karbasian, M., Atyabi, S. M., Siadat, S. D., Momen, S. B. and Norouzian D., (2008) "Optimizing Nano-silver Formation by *Fusarium oxysporum* PTCC 5115 Employing Response Surface Methodology", *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 3, 433-437.