

# سنتر بیولوژیکی نانوذره نقره از قارچ اسپرژیلوس فومیگاتوس و بررسی سمیت سلولی و خواص آنتی‌اکسیدانتی آن

فاطمه جلالیان<sup>۱</sup>، لیلا پیشکار<sup>۲\*</sup> (نویسنده مسئول) و صاحبعلی منافی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران،

fatemeh.jalalian993@gmail.com

۲\*- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران، Pishkar@iiu.ac.ir

۳- استادیار، گروه مهندسی مواد سرامیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران، ali\_manafi2005@yahoo.com

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۹

## Biological Synthesis of Silver Nanoparticles from *Aspergillus Fumigatus* and Its Antioxidant Properties

Fatemeh Jalalian<sup>1</sup>, Leila Pishkar<sup>2\*</sup> (Corresponding author) and Sahebali Manafi<sup>3</sup>

1- M.Sc Student, Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran,

fatemeh.jalalian993@gmail.com

2\*- Assistant Professor, Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr Iran, Pishkar@iiu.ac.ir

3- Assistant Professor, Department of Engineering, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran, ali\_manafi2005@yahoo.com

Received: August 2020 Accepted: November 2020

### Abstract

In this research, biological synthesis of silver nanoparticles from *Aspergillus fumigatus* fungus and cytotoxicity and its antioxidant properties was investigated. *Aspergillus fumigatus* mushroom was cultured in Sabouraud Dextrose Broth. For the production of silver nanoparticles, supernatant from the culture was exposed to a solution of silver nitrate with a final concentration of 1 mM. Approval of silver nanoparticles production was confirmed by spectrophotometry, X-ray diffraction and Transmission Electron Microscopy. Investigation of the toxicity of the solutions was investigated by MTT method. Images obtained from X-ray diffraction show that nanoparticles are spherical and the nanoparticle size is between 5- 40 nm. In this study, the IC50 antioxidant was 0.06 and IC50 was 70.68 cytotoxicity. The IC50 hole has the same cellular and antioxidant properties, so it can be concluded that the nanoparticles produced in this study have good antioxidants.

**Keywords:** Antioxidant properties, *Aspergillus fumigatus* fungus, Cytotoxicity, Silver nanoparticles

### چکیده

در این تحقیق، سنتز بیولوژیکی نانوذرات نقره با استفاده از قارچ اسپرژیلوس فومیگاتوس در آزمایشگاه بیوشیمیایی دانشگاه آزاد اسلامشهر انجام شده است و سپس، سمیت سلولی و خواص آنتی‌اکسیدانتی نانوذرات نقره سنتز شده مورد بررسی قرار گرفت. برای اینکار، ابتدا قارچ *Aspergillus Fumigatus* بر روی محیط‌های کشت سابوراد دکستروز براث کشت داده شد و بعد از کشت، سوپرناتانت حاصل از کشت، در معرض محلول نیترات نقره با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار قرار گرفته است و نانوذرات نقره سنتز شدند. سنتز و ویژگی‌های نانوذرات نقره با روش‌های مختلفی از جمله اسپکتروفوتومتری، پراش اشعه ایکس و میکروسکوپ الکترونی گذاره مورد تایید قرار گرفت. سپس بررسی سمیت محلول‌ها با روش MTT بررسی شد. نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که نانوذرات نقره سنتز شده به شکل کروی می‌باشد و اندازه نانوذرات بطور متوسط بین ۵ تا ۴۰ نانومتر است. در این تحقیق، همچنین IC50 آنتی‌اکسیدانتی ۰/۰۶ و IC50 سمیت سلولی ۷۰/۶۸ به دست آمد. چاهک IC50 سمیت سلولی و آنتی‌اکسیدانتی یکسان بوده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات تولید شده در این پژوهش از ویژگی آنتی‌اکسیدانتی خوبی برخوردار می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** خواص آنتی‌اکسیدانتی، سمیت سلولی، قارچ اسپرژیلوس فومیگاتوس، نانوذرات نقره

## مقدمه و کلیات

(2018b). در سال‌های اخیر نانوذرات نقره به دلیل خاصیت فیزیکی شیمیایی و بیولوژیکی خاص خود در زمینه‌های مختلف از قبیل برچسب زیستی، حسگرها، عوامل ضد میکروبی، فیلترها، میکرو الکترونیک و کاتالیزوری کاربرد فراوانی پیدا کرده اند (Guilger *et al.*, 2017; Logeswari *et al.*, 2013; Rastogi *et al.*, 2012). از آنجا که مقاومت به ترکیبات آنتی بیوتیکی توسط باکتری‌ها مشکل بزرگی در جهت درمان بیماران محسوب می‌شود و با توجه به اینکه نانوذرات نقره خاصیت باکتریوسایدی و باکتریواستاتیکی دارند مورد توجه محققان و دانشمندان قرار گرفته‌اند، زیرا نانوذرات نقره نه تنها به سطح غشا سلولی می‌چسبند بلکه به درون سلولها هم نفوذ می‌کنند و پس از نفوذ به داخل سلول باکتری آنزیم‌های آن را غیرفعال کرده و با تولید هیدروژن پراکسید باعث مرگ باکتری می‌شوند (Sambrook *et al.*, 2019; Cui *et al.*, 2012). این نانوذرات بر روی انسان تاثیرات سمی ندارد اما اثرات مهای بر رشد باکتری‌ها، ویروس‌ها و دیگر میکروارگانیسم‌های یوکاریوتی دارند. علاوه بر خواص متمایز آنها، هزینه تولید آنها نسبتاً کم است (Castro-Longoria *et al.*, 2011; Kathiresan *et al.*, 2004; Kittel, 2009). تولید نانو ذرات فلزی می‌تواند به دو صورت درون سلولی و برون سلولی رخ دهد. روش درون سلولی مبتنی بر انتقال یون‌های سمی به درون سلول میکروبی جهت تولید نانو ذرات است که در حضور آنزیم‌های درون سلولی سنتز نانو ذرات هدایت می‌شود، در حالیکه روش برون سلولی مبتنی بر به دام اندازی یون‌های فلزی در خارج از

فناوری نانو با سنتز و تثبیت مواد در مقیاس نانو در محدوده ۱-۱۰ nm قرار دارد. نانومواد دارای خواص فیزیکوشیمیایی مرتبط با ریشه و اندازه هستند که به طور معنی‌داری از خواص ماکروسکوپی آنها متفاوت است (Makarov *et al.*, 2014). امروزه فناوری نانو به کمک تشخیص و درمان بیماری‌ها آمده است به گونه‌ای که سبب شده تا سلول‌های سرطانی در حد نانومتر تشخیص داده شوند و با کمک فناوری نانو از بین برده شوند. در این میان قابلیت نانوساختارها برای ورود به سلول‌ها و آنالیز آنها، نویدبخش انجام این کار است که می‌تواند به پیدایش تغییرات بنیادی در نحوه برخورد با پدیده سرطان و رویکردهای مراقبت از آن کمک کند (Mishra *et al.*, 2011; Rajan *et al.*, 2015; Ghorbani *et al.* 2018a). یکی از مهمترین معیارهای فناوری نانو، توسعه روش‌های شیمیایی سبز، تمیز، غیرسمی و قابل قبول در محیط زیست است و سنتز بیولوژیکی نانوذرات را با استفاده از میکروارگانیسم‌های مختلف اعم از گونه‌های باکتری، قارچ‌ها و ماکروارگانیسم‌ها مثل گیاهان و جلبک‌ها فراهم می‌نماید. تعامل بین میکروارگانیسم‌ها و فلزات به خوبی ثبت شده است و توانایی میکروارگانیسم‌ها برای استخراج و یا انباشتن فلزات در حال حاضر در فرایندهای بیوتکنولوژی مانند بیو لیچینگ و بیولوژیک استفاده می‌شود (Castro-Longoria *et al.*, 2011). این فرآیندهای بیولوژیک در مقایسه با روش‌های مصنوعی فیزیکی و شیمیایی، هزینه پایین و عملکرد بالا، ایمن و بی خطر هستند (Elamawi *et al.*, 2018; Mishra *et al.*, 2011; Ghorbani *et al.*

به بیوستنز نانوذرات نقره شده، هنوز مشخص نشده است. مطالعات قبلی، نقش احتمالی فرم کاهش یافته‌ای از نیکوتین آمید آدنین دی نوکلوتید وابسته به نیترات ردوکتاز را در کاهش یون نقره به نقره فلزی پیشنهاد کرده است (Guilger *et al.*, 2017). فیروبلاست از سلول‌های اصلی بافت‌های هم‌بندی بوده که عملکرد آن در تولید بستر و رشته‌ها در این بافت است و چنانچه فیروبلاست تحت تاثیر مواد مختلف قرار گیرد، باعث نقص بافت‌های بدن می‌گردد (Rezaei *et al.*, 2014). از اینرو در تحقیق حاضر بیوستنز خارج سلولی نانوذرات نقره با استفاده از قارچ *Aspergillus fumigatus* انجام شده و سمیت سلولی و خواص آنتی‌اکسیدانی نانو ذرات تهیه شده روی سلول‌های فیروبلاست مورد بررسی قرار گرفته است.

#### فرآیند پژوهش

**مواد و دستگاه‌های مورد استفاده:** قارچ اسپرژیلوس فومیگاتوس (PTTC 5009) از کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شد. محیط کشت سابوراد دکستروز براث، نیترات نقره ( $AgNO_3$ ) و دی متیل سولفوکسید (DMSO) از شرکت شیمیایی مرک آلمان، سلول فیروبلاست غیرسرطانی از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، محلول EDTA - Trypsin (Ethylenediaminetetraacetic acid)، پنی‌سیلین و استرپتومایسین از شرکت گیبکو ایران تهیه شدند. برای بررسی فازهای تشکیل شده در ذرات نانو نقره تهیه شده به صورت کیفی از آنالیز XRD استفاده شده است. دستگاه مورد استفاده از شرکت Philips آلمان می‌باشد. لامپ بکار رفته در

سلول بوده که احیای یون‌های فلزی در حضور آنزیم‌های برون سلولی انجام می‌شود (Rezaei *et al.*, 2013). نتایج مطالعات اخیر نشان می‌دهد که قارچ‌ها پتانسیل خوبی برای ترکیبات فعال بیولوژیکی را در مقایسه با باکتری نشان می‌دهند که نشان می‌دهد که استفاده از قارچ‌ها بدلیل مزایایی از قبیل زیست سازگاری، تحمل زیاد به نوسانات دما، پروسه تولید آسان در مقیاس بالا، بازده اقتصادی، فرآیند تصفیه آسان و تولید بالای پروتئین‌ها جهت احیاء نانوذرات فلزی مناسب‌ترین روش تولید برای مقادیر زیاد است (Sajjadi *et al.*, 2009; Logeswari *et al.*, 2015). قارچ‌ها مقدار زیادی از آنزیم‌ها را ترشح می‌کنند و در هر محیط رشد می‌کنند تا به عنوان انتخاب مناسب برای بیوستنز نانوذرات مورد توجه قرار گیرند. در مقایسه با باکتری‌ها، قارچ‌ها مقدار زیادی از مواد زیست فعال را ترشح کرده‌اند، که قارچ‌ها را برای تولید مقادیر زیاد مناسب‌تر می‌کند. علاوه بر این، بیوستنز خارج سلولی با استفاده از قارچ همچنین می‌تواند پردازش پایین دست را بسیار آسان تر از باکتری‌ها کند (Li *et al.*, 2011). بسیاری از مطالعات تاکنون با استفاده از گونه‌های مختلف قارچ برای بیوستنز نانوذرات نقره مانند *Aspergillus*، *Trichoderma*، *Penicillium*، *Fusarium* و *Cladosporium* انجام شده است (Guilger *et al.*, 2017; Cui *et al.*, 2012; Rautaray *et al.*, 2004; Alsammarraie *et al.*, 2018). قارچ‌های متعددی می‌توانند نیتروژن را به عنوان منبع نیتروژن به آمونیاک توسط آنزیم‌های نیترات ردوکتاز و نیتريت ردوکتاز تبدیل کنند. مکانیسم واکنش دقیق که منجر

و با غلظت نهایی ۱ میلی مولار از محلول نیترات نقره به عنوان کنترل منفی در شرایط مشابه قرار داده شد. شرایط بهینه سنتز مانند pH، دما، زمان و غلظت نیترات نقره مورد بررسی قرار گرفت و در هر مرحله توسط اسپکتروفوتومتر نانودراپ بررسی شده و با توجه به پیک‌های بدست آمده بهینه‌ترین شرایط برای تولید نانوذرات بدست آمد. سپس نانوذرات نقره در شرایط بهینه pH=۹، غلظت ۵/۳ میلی مولار از نیترات نقره و در دمای ۳۰°C تهیه و نمونه در گرم‌خانه شیکردار با ۱۵۰ دور بر دقیقه به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت و نانو ذرات سنتز شده درون میکروتیوب‌های استریل شده با دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و از سوپر ناتانت جدا شده و مجدداً با بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) شستشو داده شده و با دور ۱۴۸۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. جهت سترون نمودن محلول‌های مرحله قبل درون میکروتیوب‌های استریل در ۳ روز متوالی به مدت ۳۰ دقیقه با بخار آب استریل و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفتند. نهایتاً نانو ذرات توسط خشک کن، خشک شدند و برای انجام کشت سلولی مورد استفاده قرار گرفتند (Sambrook et al., 2019).

**کشت سلول رده فیرو بلاست:** پس از خالص‌سازی و استریلیزاسیون محلول، به منظور بررسی اثر آنها در کشت سلول، از سلول‌های رده NIH3T3 خریداری شده از انستیتو پاستور ایران استفاده شد و آزمون سمیت سلولی با روش MTT انجام شد. به منظور کشت سلول‌ها ابتدا محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) تهیه و

این دستگاه Ka مربوط به کاتد مس ایجاد می‌کند. برای بررسی مورفولوژی سطح نانو ذرات سنتزی از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) شرکت Philips آلمان استفاده شده است. همچنین از دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Hydrobios برای بررسی پلاسما سطحی نانو ذرات استفاده شده است.

### روش کار

**تهیه محیط کشت:** برای کشت قارچ از محیط سابوراد دکستروز آگار استفاده شد. پودر آگار طبق دستورالعمل در مقدار معینی آب با حرارت دادن حل شده، سپس اتوکلاو گردید و پس از خنک شدن تا دمای حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد به این محیط آنتی بیوتیک جنتامایسین برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها اضافه گردید. قارچ‌های خریداری شده در محیط سابوراد دکستروز براث کشت داده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. کشت قارچ پس از ۷۲ ساعت صورت گرفت سپس قارچ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد.

**تولید نانوذرات نقره:** سوپر ناتانت قارچ به کمک سانتریفیوژ جدا شده و در مجاورت محلول نیترات نقره با غلظت ۱ میلی مولار در شیکر انکوباتور در دمای ۳۰ °C به مدت ۲۴ ساعت به منظور تولید نانوذرات نقره قرار داده شد. با تغییر رنگ نمونه به قرمز قهوه‌ای بعد از ۲۴ ساعت تولید نانوذرات نقره بوسیله اسپکتروفوتومتری نانودراپ و توسط جذب در طول موج ۳۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر مورد تایید قرار گرفت. محلول در ابتدا ۱:۱۱ رقیق شد و از محیط کشت خالص به عنوان بلانک استفاده شد. علاوه بر این نمونه حاوی محیط کشت نوترینت برات استریل

و جهت رسیدن به تراکم تک لایه سلول‌ها، پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در معرض ۰.۵٪ CO<sub>2</sub> در گرم‌خانه قرار گرفت. پس از رسیدن به ۸۰٪ درصد رشد سلول‌ها، محیط کشت خارج شده و ابتدا سطح سلول‌ها به وسیله بافر PBS شستشو داده شد. مجدداً در تمام چاهک‌ها محیط کشت به میزان ۱۰۰ μl وارد و به چاهک شماره ۲، ۱۰۰ μl از محلول مورد آزمون وارد شد. پس از مخلوط نمودن محلول مورد آزمون در محیط کشت، ۱۰۰ μl از آن برداشته و به چاهک سوم افزوده شد. در مرحله بعد ۱۰۰ μl از چاهک سوم پس از به هم خوردن محیط برداشته شد و به چاهک ۴ اضافه شد. این عمل تا چاهک ۱۰ انجام شد و به این ترتیب میزان محلول مورد آزمون در هر چاهک به ترتیب به صورت نصف بود. چاهک شماره ۱۱ تنها حاوی سلول بوده و به عنوان شاهد باقی ماند. پلیت مجدداً در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید و پس از ۲۴ ساعت سمیت سلولی با استفاده از رنگ تترازولیوم تعیین گردید. در این حالت رنگ تترازولیوم به میزان ۱۰ μl با غلظت ۵ mg/ml به تمام چاهک‌ها از جمله شاهد اضافه و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. بعد از ۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، تترازولیوم از چاهک‌ها خارج شد و به میزان ۱۰۰ ماکرولیتتر DMSO به چاهک‌ها افزوده شد و به مدت ۲۰ دقیقه پلیت در شیکر، کاملاً شیک شد. نهایتاً میزان بقای سلولی در دستگاه ELISA reader موجود در نانودراپ در طول موج ۵۴۰ nm ثبت گردید (Pagliacci et al., 1993). سپس بر اساس میزان جذب هر چاهک و مقایسه آن با شاهد،

به وسیله فیلتراسیون استریل شد و سپس به آن ۰.۵٪ سرم جنین گاو دکمپلمانه و ۰.۱٪ محلول پنسیلین-استرپتومایسین افزوده گردید. سپس نمونه سلولی در فلاسک T25 به همراه محیط کشت فوق وارد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور کشت سلولی به همراه ۰.۵٪ CO<sub>2</sub> انکوبه گردید. پس از به دست آمدن تراکم سلولی ۰.۸٪ (Cell density) نمونه در معرض تریپسین-EDTA قرار گرفته و پس از ۳ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور کشت سلولی به همراه ۰.۵٪ CO<sub>2</sub> و مشاهده سلول‌های کنده شده از کف پلیت نمونه در دور ۵۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و سپس رسوب سلولی به وسیله افزودن محیط کشت حل و تریپسین‌زدایی شد. سوسپانسیون سلول‌ها به وسیله لام نئوبار (Neobar) شمارش شدند. برای این منظور سوسپانسیون سلول‌ها را به داخل میکروتیوب انتقال داده و سپس به میزان ۲۰ ماکرولیتتر از رنگ تریپان بلو تهیه شده به سوسپانسیون اضافه شد و اجازه داده شد تا سلول‌های مرده کاملاً رنگ بگیرند. سپس سلول‌ها در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست مشاهده گردید. در این مرحله شمارش سلول‌های زنده صورت پذیرفت و در صورتیکه سلول‌های زنده تقریباً بالای ۹۰٪ باشند سلول‌ها قابل قبول بوده و جهت انجام آزمون سمیت سلولی مورد استفاده قرار گرفتند.

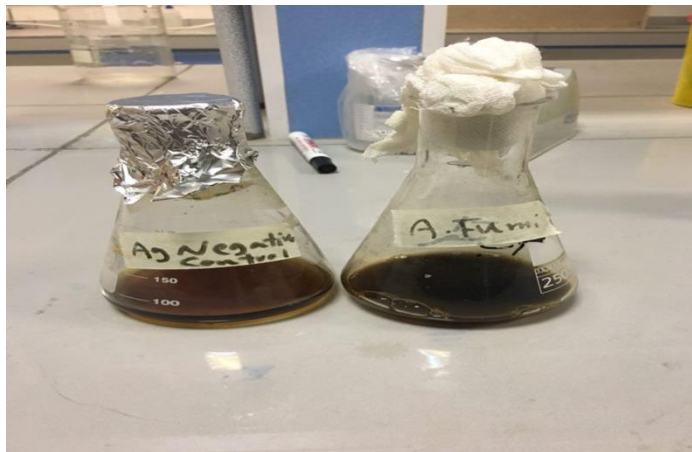
**انجام آزمون سمیت سلولی با روش MTT:** برای این منظور در هر چاهک از پلیت کشت سلول ۹۸ خانه‌ای که به وسیله اسیدآمینو ال-لایزین (L-lysine) کوت شده بود، به میزان ۱۰۰۰۰ سلول فیبروبلاست به همراه ۲۰۰ μl از محیط کشت DMEM وارد شد

### نتایج و بحث

تولید نانو ذرات نقره: تصویر شماره ۱ نانو ذره تولید شده و تست منفی آن را نشان می دهد. تولید نانوها به صورت برون سلولی است و تغییر رنگ مشاهده شده بیانگر توانایی کاهش یونهای  $Ag^+$  به  $Ag^0$  توسط آنزیمها و مواد مترشحه از درون قارچ به محیط کشت می باشد. تولید نانو ذرات با تغییر رنگ محیط از زرد به قرمز قهوه ای همراه بود. پس از مشاهده تغییر رنگ، نمونه ها توسط اسپکتروفوتومتر نانو دراپ در دامنه طول موج  $400-600$  nm بررسی شدند که حداکثر پیک جذب مشاهده شده برای نانو ذرات نقره طول موج  $450-400$  nm بوده است. شکل شماره ۲ اسپکتروفوتومتری تولید شده توسط قارچ مذکور را نشان میدهد. تصاویر حاکی از تایید تولید نانو ذرات نقره می باشد.

میزان  $IC_{50}$  به دست آمد و پس از آن میزان جذب نانو ذرات نقره توسط اسپکتروفوتومتر نانو دراپ در طول موج  $400$  تا  $600$  نانومتر تعیین شد.

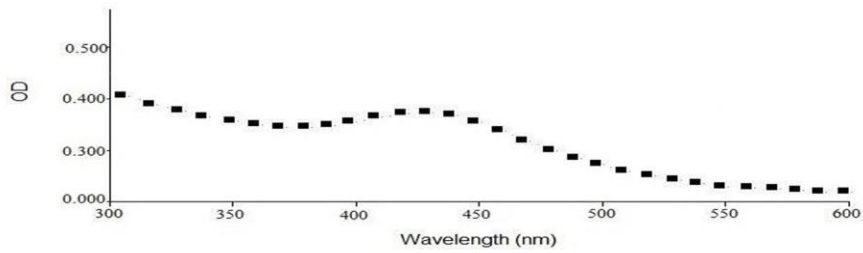
**بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی:** ابتدا  $5$  لوله آزمایش برداشته، سپس  $1$  cc آب مقطر در همه ی لوله ریخته شد. در ادامه به لوله اول  $1$  cc محلول نانو ذرات اضافه شد. در ادامه کار،  $100$  میکرو لیتر از محلول اول برداشته شده و به محلول دوم اضافه شد. لوله اول  $30$  دقیقه در تاریکی گذاشته شد. در ادامه به همین ترتیب از لوله دوم  $100$  cc محلول برداشته و به لوله سوم اضافه شد. این مراحل تا لوله پنجم تکرار شد. سپس جذب نوری نمونه شاهد که محلول DPPH و متانول می باشد قرائت شده و جذب نوری هر کدام به تفکیک خوانده شد. در ادامه  $IC_{50}$  خاصیت آنتی اکسیدانی محاسبه شد.



شکل ۱- تصویر سمت راست نانو ذره تولید شده و تصویر سمت چپ تست منفی نانو ذره

Fig 1- images of synthesised (right) and non-synthesised (left) nanoparticles

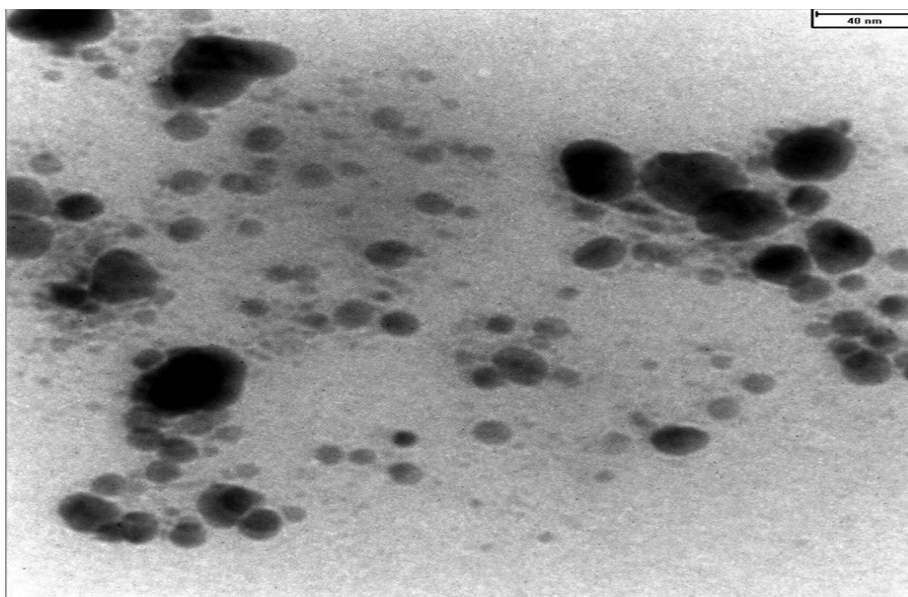
سنتز بیولوژیکی نانوذره نقره از ... ۷



شکل ۲- جذب UV-Vis نانو ذرات نقره تهیه شده توسط قارچ *Aspergillus Famigatus*  
Fig 2- UV-Vis adsorption of silver nanoparticles prepared by *Aspergillus Famigatus* fungi

تصاویر حاکی از تولید نانوذرات نقره به شکل  
کروی با اندازه ۴۰-۵ نانومتر می باشد.

تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM-  
Transmission electron microscopy): نتایج  
میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM در تصویر  
شماره ۳ آورده شده است.



شکل ۳- تصویر TEM نانو ذرات نقره  
Fig 3- TEM image of silver nanoparticles

میانگین اندازه این ذرات براساس معادله شرر (معادله ۱) ۳۲-۷۸ nm بدست آمد.

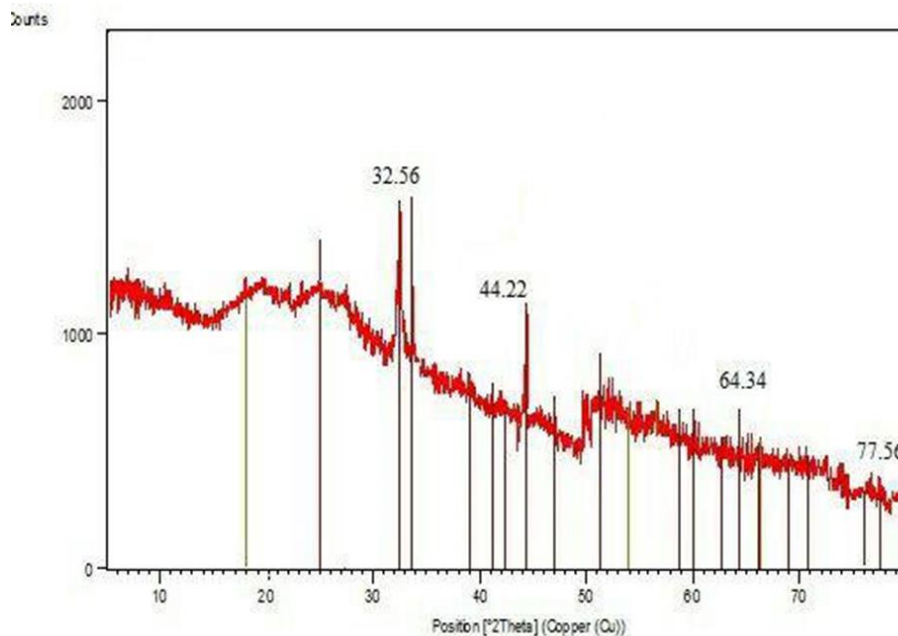
معادله ۱

$$d = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta}$$

که در آن  $d$  اندازه متوسط ذرات بر حسب آنگستروم،  $\lambda = 0.154060$ ،  $k = 0.89$  بر حسب نانومتر و  $\beta$  عرض کامل پیک در نصف ارتفاع می باشد.

بررسی الگوی پراش اشعه ایکس نانو ذرات نقره (XRD- X-ray diffraction): طیف به دست

آمده از پراش اشعه ایکس در شکل شماره ۴ آورده شده است. موقعیت پیک های  $77.56^\circ$ ،  $64.34^\circ$ ،  $44.22^\circ$ ،  $32.56^\circ$  و  $20^\circ$  که به ترتیب متناسب با صفحات کریستالی (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱) می باشد، سنتز نانو ذرات نقره اثبات می شود. همچنین



شکل ۴- طیف پراش اشعه ایکس نانو ذرات نقره

Fig 4- X-ray diffraction spectrum of silver nanoparticles

IC50 برای هر نمونه مشخص شده است. تست ها دو مرتبه تکرار شده اند و اعداد میانگین دو داده را نشان می دهند. IC50 جذب نوری چاهکی است که دارای بیشترین غلظت عددی نزدیک به نیمی از جذب نمونه شاهد است. چاهک شماره ۱۱ فاقد نانو ذره است و چاهک شماره ۱۰ حاوی کمترین مقدار نانو ذره می باشد.

سمیت نانو ذرات نقره با روش MTT: سمیت نانو ذرات نقره بر روی رده سلولی فیرو بلاست وجود داشت که برای هر نانو ذره این میزان متفاوت بود. جدول شماره ۱ نتایج جذب بدست آمده از اسپکتروفوتومتر پس از رنگ آمیزی با تترازولیم را نشان می دهد. هر چه جذب نوری بالاتر باشد یعنی سلول ها توانایی نجات بالاتری داشته اند. میزان های



جدول ۱- نتایج سمیت نانوذرات نقره بر روی رده سلولی فیبروبلاست

Table 1- Toxicity of silver nanoparticles on fibroblast cell line

شماره چاهک	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
SNPs	۰/۲۶۴	۰/۳۲۲	۰/۵۱۹ IC50	۰/۸۴۳	۰/۸۴۹	۰/۷۹۴	۰/۹۲۰	۱/۰۷۱	۱/۱۶۵	۱/۱۵۰

چاهک IC50 سمیت سلولی و آنتی اکسیدانی یکسان بوده پس می توان نتیجه گرفت که نانو ذره تولید شده در این پژوهش از آنتی اکسیدانی خوبی برخوردار می باشد.

بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی: خاصیت آنتی اکسیدانی بر حسب غلظت در جدول شماره ۲ آورده شده است. در این تحقیق IC50 آنتی اکسیدانی ۰/۰۶ و IC50 سمیت سلولی ۷۰/۶۸ به دست آمد.

جدول ۲- بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی

Table 2- Evaluation of antioxidant properties

غلظت	درصد آنتی اکسیدانی
۰/۰۰۲	۲۳/۵۶
۰/۵	۵۸۹
۰/۲۵	۲۴۹/۵
۰/۱۲	۱۴۱/۳۶
۰/۰۶	۷۰/۶۸
۰/۰۳	۳۵/۳۴

دهنده و تثبیت کننده توسط مولکول های تولید شده توسط موجودات زنده جایگزین می شود. این ترکیبات کاهش و یا تثبیت کننده در باکتری ها، قارچ ها، مخمرها، جلبک ها و یا گیاهان وجود دارد (Castro-Longoria *et al.*, 2011). سنتز نانو ذرات در مقادیر بالاتری از گونه های قارچی جنبه های مثبت مانند محیط زیست و سازگاری را نشان می دهد. آنزیم های سلولی اضافی به طور بالقوه و به راحتی از قارچ ها در مقدار زیادی تولید می شوند. امکان استفاده از قارچ ها در سنتز نانوذرات، شامل سهولت دست زدن و امکان اقتصادی است. برای سنتز نانوذرات قارچ های رشته ای نقش مهمی دارند (Rastogi *et al.*, 2012). هفتاد درصد از گونه های قارچی برای

امروزه نانوذرات نقره به عنوان محصولی مهم در نانوتکنولوژی به عنوان کاندیدای جذاب برای رساندن بسیاری از مولکول های دارویی کوچک یا بیو مولکول های بزرگ و پرو تئین ها به شمار می رود. کشف این خاصیت ذرات نقره باعث شد تا امروزه در زیست شناسی و نانوبیوتکنولوژی از اهمیت بالایی برخوردار باشد (Makarov *et al.*, 2014). این نانوذرات بر روی انسان تاثیرات سمی ندارد اما اثرات مهای بر رشد باکتری ها، ویروس ها و دیگر میکروارگانیسم های یوکاریوتی دارند. علاوه بر خواص متمایز آنها، هزینه تولید آنها نسبتا کم است (Makarov *et al.*, 2014; Elamawi *et al.*, 2018). در مورد سنتز بیولوژیکی نانوذرات نقره، عامل کاهش

بررسی استراتژی یک گونه *Aspergillus fumigatus* که قادر به رشد روی زبانه‌های سیانید فلزی برای مقابله با نقره بود، پرداختند. نتایج نشان داد که در محلول آبی ۱ میلی مولار از نیترات نقره، قارچ قادر به کاهش و جذب نقره به سلول به شکل نانوذرات بود که تغییرات رنگ زیست توده و مشاهدات میکروسکوپ الکترونی را نشان می‌دهد. تولید نانوذرات نقره خارج سلولی نیز پس از انکوباسیون قبلی قارچ در محیط استریل و دوبار تقطیر ۷۲ ساعته در محلول فیلتراسیون رخ داده است، بنابراین نشان می‌دهد که شرایط کشت ممکن است بر تشکیل نانوذرات تاثیر گذارد. طیف‌سنجی جذب اتمی نشان داد که شرایط کشت مطلوب برای جذب نقره در  $pH = 8/5$  است (Sabatini et al., 2016). جهت تأیید تولید نانوذرات توسط میکروارگانیسم مورد آزمون، چندین روش مورد استفاده قرار گرفت که یکی از آنها استفاده از روش ساده اسپکتروفوتومتری بود. از طریق روش اسپکتروفوتومتری به دلیل رزونانس پالسمون سطحی ذرات، می‌توان تولید نانوذرات نقره را در محیط کشت میکروارگانیسم‌ها پیگیری نمود. پس از ایجاد تغییر رنگ در محیط واکنش، بررسی اسپکتروفوتومتری نانو دراپ انجام شد که نانوذرات تولیدی دارای بیشینه جذب در دامنه  $550\text{nm} - 500\text{nm}$  بودند. آزمون دیگری که جهت تأیید تولید نانوذرات مورد استفاده قرار گرفت، پراش اشعه ایکس بود. این آزمون یک روش غیر تخریبی با چند کاربرد است که اطلاعات جامعی درباره ترکیب شیمیایی و ساختار کریستالی مواد طبیعی و صنعتی ارائه می‌دهد. به کمک الگوی پراش اشعه ایکس،

بیوستز نانوذرات فلزی استفاده شده‌اند، که در بین قارچ‌های غیربیماری‌زا از گونه‌های تریکودرما نیز برای بیوستز نانوذرات فلزی استفاده شده است. در میان قارچ‌های مختلف، اسپرژیلوس فومیگاتوس، تنها قارچی است که بیشترین توانایی تولید نانوذرات متفاوت را دارا می‌باشد. در تحقیق حاضر سنتز نانو ذرات نقره از قارچ *Aspergillus Fumigatus* انجام شد و صحت تشکیل نانو ذرات با توجه به پیک جذبی در ناحیه  $600 - 400$  نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ تایید شد. با بررسی شرایط مختلف سنتز با توجه به پیک‌های جذبی توسط دستگاه،  $pH = 9$ ، غلظت  $5/3$  میلی مولار از نیترات نقره و دمای  $30$  درجه سانتیگراد شرایط بهینه تعیین شد. میکروسکوپ TEM اندازه نانو ذرات در نمونه تولید شده در شرایط بهینه شده را در محدوده  $5 - 40\text{nm}$  نشان داد. رنجبر نوازی و همکاران در سال (۲۰۱۰) نانوذرات نقره را با استفاده از قارچ *Aspergillus fumigatus* سنتز کردند. اثر سه متغیر مستقل از جمله محتوای گلوکز محیط کشت،  $pH$  اولیه و غلظت هاگ‌های اولیه بر بیوستز نانوذرات نقره را مورد بررسی قرار دادند. این متغیرها بر مورفولوژی سلول، توده سلولی، اندازه و مورفولوژی نانوذرات نقره و میزان کاهش یون نقره تاثیر می‌گذارد. در نتیجه، شرایط کشت مطلوب برای بیوستز نانوذرات نقره شامل یک غلظت گلوکز  $16$  گرم در لیتر،  $pH = 4/5$  و غلظت اسپور  $10 \times 1/10$  اسپور در لیتر بود. میکروسکوپ TEM نشان داد که اندازه نانوذرات در نمونه تولید شده در شرایط بهینه شده در محدوده  $19 - 7\text{nm}$  است. Sabatini و همکاران (۲۰۱۵) به

- molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biomaterials*. 33(7): 2327–33.
- 3) Elamawi, R.M., Al-Harbi, R.E. and Hendi, A.A. 2018. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 28(1):28.
  - 4) Ghorbani, A., Razavi, S.M., Ghasemi Omran, V.O. and Pirdashti, H. 2018a. *Piriformospora indica* alleviates salinity by boosting redox poise and antioxidative potential of tomato. *Russian Journal of Plant Physiology*. 65(6):898–907
  - 5) Ghorbani, A., Razavi, S.M., Ghasemi Omran, V.O. and Pirdashti, H. 2018b. *Piriformospora indica* inoculation alleviates the adverse effect of NaCl stress on growth, gas exchange and chlorophyll fluorescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Biology*. 20(4):729–736
  - 6) Guilger, M., Pasquoto-Stigliani, T., Bilesky-Jose, N., Grillo, R., Abhilash, P.C. and Fraceto, L.F. 2017. Biogenic silver nanoparticles based on *trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. *Scientific Reports*. 7:44421.
  - 7) Kathiresan, K., Manivannan, S., Nabeel, M.A. and Dhivya, B. 2009. Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*. 71(1):133–7.
  - 8) Kittel C. *Introduction to Solid State Physics*. 8 edition. Hoboken, NJ: Wiley; 2004. 704 p.
  - 9) Li, G., He, D., Qian, Y., Guan, B., Gao, S. and Cui, Y. 2011. Fungus-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *aspergillus*

ساختار کریستالی نانو ذرات نقره سنتزی تایید شد. نتایج کشت سلولی روی رده فیروبلاست نشان می‌دهد که نانو ذرات نقره دارای اثرات سمی اندکی هستند در غلظت نسبتاً بالا موجب از بین رفتن سلول‌ها می‌شوند. سمیت مذکور وابسته به دز نانوذرات سنتزی است، که می‌توان با استفاده از دزهای غیر سمی از نانو ذرات از آنها در بدن استفاده نمود (Pagliacci *et al.*, 1993).

### نتیجه گیری کلی

با توجه به اینکه تولید نانوذرات به روش‌های گوناگون، روش بیولوژیکی که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفته است به دلیل نداشتن آلودگی زیستی مقرون به صرفه‌تر از روش‌های شیمیایی و فیزیکی می‌باشد. نتایج بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که این نانوذرات به شکل کروی بوده و ماکزیمم اندازه آن ۴۰ نانومتر و مینیمم اندازه آن به ۵ نانومتر می‌رسد. با توجه به کوچک بودن اندازه نانوذرات امید است بتوان از این ذرات کوچک برای درمان سرطان استفاده کرد. با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی ۷۰/۶۸٪ و سمیت سلولی ۰/۵۱۹ این نوع نانوذره می‌توان اظهار کرد که نانوذره‌ی تولید شده درصد آنتی‌اکسیدانی خوبی را داراست.

### منابع

- 1) Alsammarrarie, F.K., Wang, W., Zhou, P., Mustapha, A. and Lin, M. 2018. Green synthesis of silver nanoparticles using turmeric extracts and investigation of their antibacterial activities. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*. 171:398–405.
- 2) Cui, Y., Zhao, Y., Tian, Y., Zhang, W., Lü, X. and Jiang, X. 2012. The

- Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials. *Industrial Crops and Products*. 70:356–373.
- 17) Rastogi, L., Kora, A.J. and Arunachalam, J. 2012. Highly stable, protein capped gold nanoparticles as effective drug delivery vehicles for amino-glycosidic antibiotics. *Materials Science and Engineering: C*. 32(6):1571–1577.
  - 18) Rautaray, D., Sanyal, A., Adyanthaya, S.D., Ahmad, A. and Sastry, M. 2004. Biological synthesis of strontium carbonate crystals using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Langmuir*. 20(16):6827–33.
  - 19) Rezaei, A., Pourali, P. and Yahyayi, B. 2014. Assessment of the cytotoxicity of gold nanoparticles produced by *Bacillus cereus* on hepatocyte and fibroblast cell lines. *Journal of Cellular and Molecular Researches*. 29(3):291-301.
  - 20) Sabatini, L., Battistelli, M., Giorgi, L., Iacobucci, M., Gobbi, L. and Andreatti, E. 2016. Tolerance to silver of an *Aspergillus fumigatus* strain able to grow on cyanide containing wastes. *Journal of Hazardous Materials*. 306:115–123.
  - 21) Sajjadi, G., Shojaiee, A., Fazeli, M.R., Amini, J. and Jamalifar, H. 2009. Study of ability *Fusarium Oxysporum* in extracellular biosynthesis of silver nanoparticle *in vitro*. *Journal of Microbial World*. 2(1):44-7.
  - 22) Sambrook, J., Maniatis, T. and Fritsch, E.F. 1987. *Laboratory CSH. Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  - terreus*. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(1):466-476.
  - 10) Logeswari, P., Silambarasan, S. and Abraham, J. 2013. Ecofriendly synthesis of silver nanoparticles from commercially available plant powders and their antibacterial properties. *Scientia Iranica*. 20(3):1049–54.
  - 11) Logeswari, P., Silambarasan, S. and Abraham, J. 2015. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. *Journal of Saudi Chemical Society*. 19(3):311-317.
  - 12) Longoria, E., Vilchis-Nestor, A.R. and Avalos-Borja, M. 2011. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*. 83(1):42–8.
  - 13) Makarov, V.V., Love, A.J., Sinitsyna, O.V., Makarova, S.S., Yaminsky, I.V. and Taliansky, M.E. 2014. Green Nanotechnologies: Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. *Acta Naturae*. 6(1):35–44.
  - 14) Mishra, A., Tripathy, S.K., Wahab, R., Jeong, S.H., Hwang, I. and Yang, Y.B. 2011. Microbial synthesis of gold nanoparticles using the fungus *Penicillium brevicompactum* and their cytotoxic effects against mouse mayo blast cancer C 2 C 12 cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 92(3):617–630.
  - 15) Pagliacci, M.C., Spinozzi, F., Migliorati, G., Fumi, G., Smacchia, M. and Grignani, F. 1993. Genistein inhibits tumour cell growth *in vitro* but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts: a further pitfall in the use of the MTT assay for evaluating cell growth and survival. *European Journal of Cancer*. 29(11):1573–7.
  - 16) Rajan, R., Chandran, K., Harper, S.L., Yun, S.I. and Kalaichelvan, P.T. 2015.