

## بررسی اثر ضدقارچی نانوذرات نقره بیوستتز شده توسط ساکارومیسس سرویسه بر علیه میکروسپوروم کانیس

بهین امیدی\*

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۱۷

### چکیده

امروزه متدها و روش‌های مختلفی برای تولید نانوذرات نقره مورد استفاده قرار می‌گیرد اما هر یک از این روش‌ها دارای معایب زیادی هستند. روش‌های شیمیایی اکثراً سمی و ناپایدارند و روش‌های فیزیکی گران و کم بازده هستند اخیراً محققین با استفاده از سیستم‌های بیولوژیکی مانند میکروارگانسیم‌ها و گیاهان نانوذرات نقره تولید کرده‌اند این روش ارزان و بی‌خطر و پایدار است. در این تحقیق از ساکارومیسس سرویسه به عنوان یک بیوراکتور استفاده شد. همچنین در این تحقیق اثرات ضد قارچی نانوذرات نقره بیوستتز شده بر علیه میکروسپوروم کانیس بررسی شد. سوپرناتانت مخمر به محلول  $10^{-3} M$  نیترات نقره اضافه شد و در آنکوباتور  $30^{\circ}C$  درجه و دور  $250\ rpm$  قرار داده شد. تغییرات رنگ آن مورد بررسی قرار گرفت، سپس توسط دستگاه‌های  $VIS\ UV$ ،  $FTIR$ ،  $XRD$ ،  $TEM$  بیوستتز نانوذرات نقره اثبات شد. نانوذرات حاصل به روش دیسک و چاهک گذاری و محاسبه قطر هاله عدم رشد و  $MIC80$  و  $TMFC$  بر علیه میکروسپوروم کانیس بررسی شد و با داروهای مؤثره مقایسه گردید. نتایج نشان داد که ساکارومیسس سرویسه توانایی بیوستتز نانوذرات نقره با سایز  $27$  نانومتر را داشته و این نانوذرات نقره با غلظت  $0.29 \pm 0.23 \mu g/ml$  اثر کشندگی بر میکروسپوروم کانیس دارد. این پژوهش در واقع گزارشی است از امکان بیوستتز نانوذرات نقره توسط یکی از میکروارگانسیم‌های ایمن و غیر پاتوژن که نانوذرات بیوستتز شده آن می‌تواند مورد استفاده در پزشکی و داروسازی قرار گیرد.

**کلمات کلیدی: نانوذرات نقره، بیوستتز، ساکارومیسس سرویسه، میکروسپوروم کانیس**

\* نویسنده مسئول: بهین امیدی

آدرس: گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران.. تلفن:

پست الکترونیک [omidi9092@yahoo.com](mailto:omidi9092@yahoo.com)

## مقدمه

بیماری‌های جلدی قارچی (Cutaneous mycosis) عفونت‌هایی هستند که در اثر حمله گروهی از قارچ‌ها به نام درماتوفیت‌ها (Dermatophytes) ایجاد می‌گردد (۱۸). اخیراً درماتوفیتوزیس با وجود بالا رفتن سطح بهداشت، به دلایل متعددی رو به افزایش است. یکی از این دلایل می‌تواند نگهداری حیواناتی مانند سگ و گربه باشد. این بیماری از دسته بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوانات محسوب می‌شود. مهم‌ترین درماتوفیت ایجاد کننده این بیماری در حیواناتی مانند سگ و گربه، میکروسپوروم کانیس (*Microsporum canis*) می‌باشد که می‌تواند به راحتی به انسان منتقل گردد. این قارچ در گروه حیوان دوست‌ها قرار دارد و در مقایسه با بیماری ناشی از درماتوفیت‌های انسان دوست، بیماری را با شدت بیشتری نشان می‌دهد. در سال‌های اخیر ابتلا به درماتوفیتوزیس ناشی از میکروسپوروم کانیس شیوع بالایی داشته است (۱۸). از طرف دیگر باید به این نکته نیز توجه داشت که مقاومت‌های دارویی نیز رو به افزایش است و این مساله باعث ایجاد نگرانی‌هایی در درمان بیماری‌های قارچی شده است. به این منظور محققان در پی جایگزین کردن داروهای جدید هستند که ضمن اثربخشی، عوارض جانبی کمتری داشته باشد. یکی از این موارد استفاده از نانوذرات فلزی است. فناوری نانو از مباحث عمده مجامع علمی امروز است که نوید پیشرفت‌های سریع در تمام زمینه‌های علمی و صنعتی را می‌دهند (۵). علم نانو تکنولوژی کاربرد علوم مختلف را برای کنترل مواد در سطح مولکولی فراهم کرده است. طبق تعریف موسسه ملی نانو تکنولوژی، نانو عبارت از اندازه حقیقی بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر می‌باشد (۹). این خصوصیت باعث فراهم شدن پدیده‌هایی بی نظیر با کاربردهای جدید

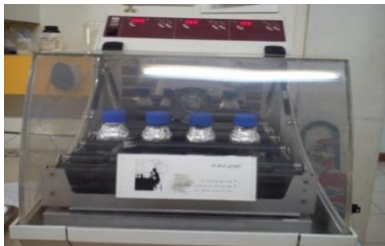
می‌باشد. یکی از ویژگی‌های بسیار جالب نانوذرات مربوط به افزایش نسبت سطح به حجم آن‌ها است که این مساله باعث تولید نیروی محرکه عظیمی جهت انتشار، خصوصاً در دماهای بالا می‌باشد همچنین این نسبت بالا، دمای ذوب نانوذرات را کاهش می‌دهد، نرخ کاهش نقطه ذوب در ذرات خیلی کوچک بسیار شدیدتر است. از دیگر ویژگی‌های نانوذرات، نزدیک شدن ابعاد ماده به اندازه‌های مولکولی و اتمی است (۵). فناوری نانو یکی از فناوری‌های روز دنیا است که در عرصه‌های مختلف صنایع الکترونیک، کشاورزی، بهداشت، داروسازی، دارورسانی، صنایع غذایی، نفت، انرژی، پوشاک، فناوری کامپیوتر، سخت افزار، فضاوری و صنایع شیمیایی وارد شده است. درخشش این فناوری در نانو تکنولوژی پزشکی نیز با فراهم آوردن امکان تشخیص سریع تر بیماری‌ها و دارورسانی هدفمند به خوبی مشهود است (۲۱). در این میان نانوذرات فلزی مانند طلا، نقره، تیتانیوم و مس به علت کاربرد وسیع آن‌ها در پزشکی، داروسازی، الکترونیک، نساجی و صنایع غذایی بسیار مورد توجه هستند (۲۲). در نانو تکنولوژی تولید نانوذرات به دو روش از بالا به پایین و از پایین به بالا صورت می‌گیرد. در روش اول کوچک کردن ذرات بزرگ به روش‌های مختلف صورت می‌گیرد اما در روش دوم با در کنار هم قرار گرفتن اتم به اتم یا مولکول به مولکول نانوذرات پدید می‌آیند (۴). در تولید نانوذرات نقره به روش دوم، از تکنیک‌های مختلف استفاده می‌گردد. یکی از معمول‌ترین روش‌ها استفاده از روش‌های شیمیایی بخصوص روش‌های احیا شیمیایی است. روش‌های فیزیکی مختلفی مانند استفاده از پرتوهای مختلف و لیزر نیز مورد استفاده قرار گرفته است (۹). اما اکثر این روش‌ها با محدودیت‌هایی از جمله ناپایدار بودن، گران



## بررسی اثر ضدقارچی نانوذرات نقره بیوستنز شده... ۲۹

ساکارومیسس سرویسیه (5269):  
*PTCC Saccharomyces cerevisiae* بوده است که به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. مخمر به محیط سابرو دکستروزبراث محتوی کلرامفنیکل منتقل شد و در انکوباکتور ۲۸-۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت قرار داده شد.

**مراحل بیوستنز نانوذرات نقره:** ابتدا محلول نیترات نقره یک میلی مولار تهیه شد و pH محلول را ۵/۶ تنظیم گردید. درون فائل مقدار ۱۰۰ سی سی از نیترات نقره یک میلی مولار ریخته و ۱۰ سی سی از سوپرناتانت مخمر اضافه شد، به این محلول یک سی سی پلی ونیل پیرولیدن به عنوان پایدار کننده نیز اضافه شد، سپس دور فائل را با فویل پوشانده و درون شیکر انکوباتور قرار داده شد. رنگ ابتدایی محلول بی رنگ می‌باشد تغییر رنگ به سمت قهوه‌ای نشان دهنده انجام واکنش می‌باشد. در نتیجه تغییر رنگ محلول در روز اول هر ۲ ساعت و در روزهای بعدی، هر روز بررسی شد.



نگاره ۱- آزمون بیوستنز نانوذرات نقره توسط ساکارومیسس سرویسیه

### اثبات بیوستنز نانوذرات نقره

**بررسی تغییر رنگ:** اولین نشانه تولید و سنتز نانوذرات نقره، تغییر رنگ محلول از بی رنگ به سمت قهوه‌ای می‌باشد. این تغییرات در قسمت نتایج نمایش داده شده است.

بودن، کم بازده بودن و سمی بودن همراه هستند بنابراین نمی‌توان از آن‌ها در اهداف پزشکی و داروسازی و دارورسانی استفاده کرد. نانویوتکنولوژی زیر مجموعه‌ای از علم نانوتکنولوژی است که از موجودات زنده مانند باکتری‌ها (۲۰ و ۸، ۴)، جلبک‌های سبز، قارچ‌ها (۳، ۱)، اکتینومیست‌ها (۲۳) و عصاره گیاهان (۲۴، ۱۶) در جهت سنتز نانوذرات استفاده می‌کند. این روش را بیوستنز یا سنتز سبز نامیده می‌شود. این روش پاک، ساده، پایدار، دوستدار طبیعت و غیر سمی است (۲۲ و ۲۱، ۹، ۵). تحقیقات زیادی در سنتز سبز انجام شده است اما بسیاری از میکروارگانیسم‌های استفاده شده، دارای خاصیت بیماری‌زایی هستند در نتیجه می‌تواند با خطراتی همراه باشد. در این تحقیق از مخمر ساکارومیسس سرویسیه (*Saccharomyces cerevisiae*) استفاده شده است. ساکارومیسس سرویسیه میکروارگانیسمی غیر بیماری‌زا است و از مهم‌ترین پرکاربردترین مخمرهای صنعتی است که در صنایع مختلفی مانند تهیه نان، تولید الکل، تولید سرکه، تولید اسیدهای مختلف و غیره از آن‌ها استفاده می‌گردد. ضمناً به عنوان پروتئین تک یاخته (single cell protein) نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. استفاده از این مخمر در بیوستنز نانوذرات نقره به عنوان یک بیوراکتور باعث می‌شود تا بتوان از نانوذرات نقره حاصل شده با اطمینان در پزشکی و داروسازی استفاده کرد. در این تحقیق در نهایت اثرات ضد قارچی نانوذرات نقره بیوستنز شده بر علیه میکروسپوروم کانیس که یک درماتوفیت حیوان دوست است مورد بررسی قرار گرفته است.

### مواد و روش کار

**نحوه آماده‌سازی ساکارومیسس سرویسیه:**  
 میکروارگانیسم مورد استفاده در این پژوهش

داده شد و در زیر نور UV قرار گرفت تا گریدها خشک شوند. گریدهای آماده شده توسط میکروسکوپ الکترونی TEM مورد بررسی قرار گرفت.

**تعیین غلظت نانوذرات نقره توسط Atomic Absorption Assay:** غلظت‌های مشخص از نانوذرات نقره استاندارد توسط دستگاه خواننده شد و منحنی استاندارد رسم شد و نمونه‌های مورد آزمایش توسط دستگاه بررسی شدند و غلظت نانوذرات بیوسنتز شده مشخص گردید. روش دیگری که می‌توان استفاده کرد اندازه‌گیری میزان یون نقره در محلول اولیه نترات نقره یک میلی مولار و مقایسه مقدار یون نقره موجود در محلول نهایی می‌باشد که در این روش نیز مقادیر مشخص و دقیق یون نقره توسط دستگاه خواننده شده و مقادیر نسبت به آن‌ها گزارش شد.

**بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات نقره: قارچ میکروسپوروم کانیس (PTCC: 5069)** به روی محیط سابورود کستروز آگار حاوی کلرامفنیکل و سیکلوهمگزامید (SCC) کشت داده شد سپس در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۰-۷ روز قرار داده شد.

**تعیین اثر ضدقارچی نانوذرات نقره به روش انتشار دیسک: Disk diffusion** در این پژوهش از محیط کشت سابورود کستروز آگار محتوی کلرامفنیکل و سیکلوهمگزامید برای میکروسپوروم کانیس استفاده شد. سوسپانسیون قارچی معادل نیم مک فارلند تهیه گردید و توسط سواپ استریل به روی سطح محیط کشت کشیده شد. سپس توسط پیت پاستور استریل در مرکز پلیت چاهک ایجاد شد. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بیوسنتز شده و نانوذرات نقره استاندارد در این چاهک ریخته شد. برای

**بررسی به روش اسپکتروفتومتری:** یکی از روش‌های تحلیل نانوذرات مطالعه طیف جذبی آن‌ها در محدوده طول موج نور مرئی و فرابنفش است. به این منظور نمونه‌های تهیه شده در طول موجهای بین ۳۰۰ تا ۶۵۰ نانومتر بررسی شدند. بلانک استفاده شده آب مقطر حاوی یک سی سی پلی ونیل پیرولیدن ۲۰ گرم در لیتر بود. دستگاه اسپکتروفتومتری استفاده شده Cecil model CE 7250 بوده است.

**بررسی توسط دستگاه FTIR:** به این منظور محلول حاوی نانو ذرات به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردیده و در مرحله بعد رسوب را با آب مقطر استریل شستشو شده و دوباره سانتریفیوژ شده. رسوب حاصل که حاوی نانوذرات نقره است به مدت ۱۸ ساعت در دستگاه فریزدرایر قرار داده شد و پودر حاصل با KBr به صورت قرص در آمده و توسط دستگاه مورد بررسی قرار گرفت. دستگاه استفاده شده Thermo Nicolet model: nexus 870 بوده است.

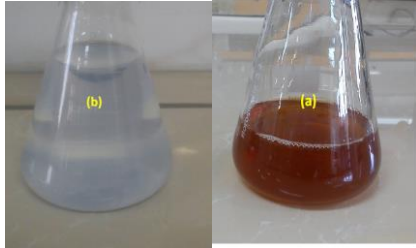
**بررسی توسط دستگاه XRD:** به این منظور محلول حاوی نانو ذرات به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردیده و در مرحله بعد رسوب را با آب مقطر استریل شستشو داده و دوباره سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل که حاوی نانوذرات است به مدت ۱۸ ساعت در دستگاه فریزدرایر قرار داده شد و پودر حاصل توسط دستگاه مورد بررسی قرار گرفت. دستگاه استفاده شده Seifert بوده است.

**بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی:** برای تعیین اندازه و شکل نانوذرات تولید شده از میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد. نمونه‌های تهیه شده در آزمایشات، به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه در دستگاه سونیکاتور قرار داده شد. سپس یک قطره از محلول را روی گریدهایی که با Formvar کوت داده شده بودند قرار



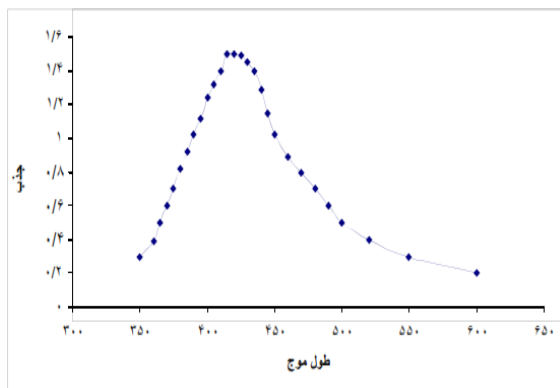
### بررسی اثر ضدقارچی نانوذرات نقره بیوستنز شده... ۳۱

به قهوه‌ای است. تغییر رنگ محلول‌ها نشان می‌دهد ساکارومیسیس سرویسیه توانایی بیوستنز نانوذرات نقره را دارند.



نگاره ۲- تغییر رنگ ایجاد شده توسط سوپرناتانت ساکارومیسیس سرویسیه

**بررسی اسپکتروفتومتری:** گام دوم برای اثبات تولید و سنتز نانوذرات نقره استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری UV-VIS و خواندن جذب محلول‌ها بین ۳۵۰ تا ۶۵۰ نانومتر می‌باشد. پیک در ناحیه ۴۱۰-۴۵۰ نانومتر نشانه سنتز نانوذرات نقره می‌باشد. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص گردید که ساکارومیسیس سرویسیه در ناحیه ۴۲۰ پیک ایجاد کرده است. این مساله ثابت می‌کند که ساکارومیسیس سرویسیه توانایی بیوستنز نانوذرات نقره را دارد و توانستند در ناحیه ۴۲۰ نانومتر پیک قوی ایجاد کنند.



نمودار ۱- بررسی جذب محلول حاوی نانوذرات نقره بیوستنز شده توسط ساکارومیسیس سرویسیه

**بررسی مورفولوژی و ساینز نانوذرات بیوستنز شده توسط TEM:** در بررسی انجام شده توسط میکروسکوپ الکترونی مشخص گردید که از نظر

مقایسه اثرات ضدقارچی نانوذرات نقره با داروها از دیسک‌های داروهای آمفوتریسین B، ایتراکونازول و گریزئوفلووین استفاده شد. در آخر پلیت‌ها به انکوباتور ۲۸ درجه سانتی گراد منتقل شدند و هاله‌های عدم رشد پس از طی شدن زمان رشد قارچ بررسی شدند.

**تعیین حداقل میزان غلظت جلوگیری کننده از رشد MIC به روش ماکرودایلوشن:** در این پژوهش برای تعیین MIC از محیط کشت سابورد کستروزیراث محتوی کلرامفنیکل و سیکلوهمگزامید برای میکروسپوروم کانیس استفاده شد. روش کار براساس استاندارد NCCLS: M27-A انجام شد.

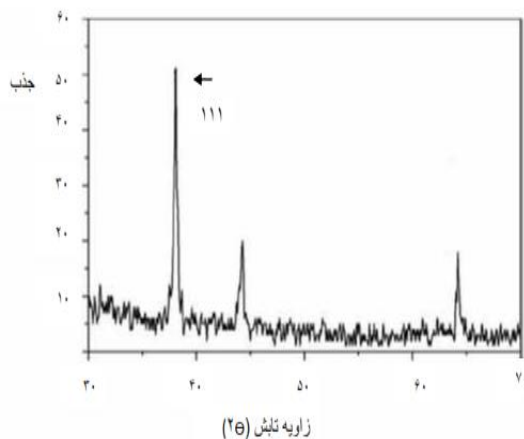
**تعیین حداقل میزان غلظت جلوگیری کننده از رشد (MIC) به روش میکروودایلوشن:** در این پژوهش برای سنجش MIC از روش میکروودایلوشن نیز استفاده گردید. این روش با استفاده از استاندارد NCCLS M38-A انجام شده است.

### تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچی یا Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

MFC بنا به تعریف کمترین غلظتی از فعالیت ضدقارچی است که در آن غلظت ۹۹/۹ درصد از میکروارگانیسم‌ها از بین رفته باشند. برای تعیین MFC، با استفاده از سمپلر، از لوله MIC و لوله بعد از MIC که رشد دارد و لوله‌های قبل از MIC برداشته و به‌رویی سابورد کستروز آگار برده و بعد از کشت انکوبه شدند، بعد از گذشت زمان رشد، هر رقتی که در پلیت مانع رشد کامل قارچ شده باشد به عنوان MFC در نظر گرفته می‌شود. تمامی تست‌ها با سه بار تکرار انجام شد.

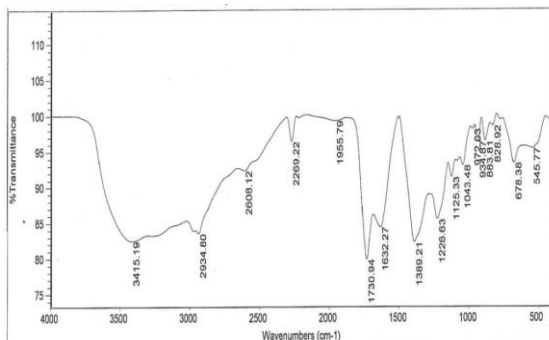
### نتایج

**بررسی تغییر رنگ ایجاد شده:** اولین نشانه اثبات تولید نانوذرات نقره تغییر رنگ آن از محلول بی رنگ



نمودار ۲- دیگرام XRD محلول حاوی نانوذرات نقره بیوستنز شده توسط ساکارومیسیس سرویسیه

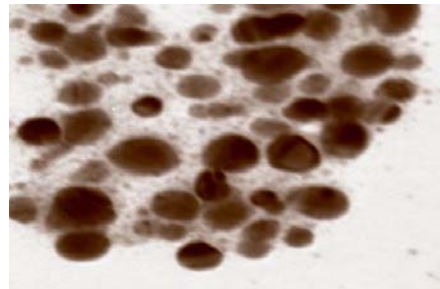
**اثبات بیوستنز نانوذرات نقره توسط ساکارومیسیس سرویسیه توسط FTIR:** توسط این روش گروه‌های عاملی روی نانوذرات مشخص می‌شود. در تحقیق انجام شده پیک‌های قوی در ناحیه ۳۴۰۰ ایجاد شده است که در قبل از بیوستنز پیک ضعیف دارد و در ضمن پیک‌های جدیدی در ناحیه ۱۰۰۰ تا ۱۴۰۰  $\text{cm}^{-1}$  مشاهده شده است که نشان‌دهنده این است که گروه عاملی مؤثر برای بیوستنز نانوذرات نقره گروه OH می‌باشد.



نمودار ۳- دیگرام FTIR محلول حاوی نانوذرات نقره بیوستنز شده توسط ساکارومیسیس سرویسیه

**نتایج تعیین غلظت نانوذرات نقره بیوستنز شده:** به منظور استفاده از نانوذرات نقره بیوستنز شده در بررسی اثرات ضدقارچی، نیاز به تعیین غلظت نانوذرات نقره می‌باشد که نتایج آن در جدول ۲ ارائه شده است.

شکل و مورفولوژی نانوذرات نقره بیوستنز شده توسط ساکارومیسیس سرویسیه مورد آزمایش، کروی شکل هستند و می‌توان گفت از پراکندگی تقریباً یکسانی برخوردار می‌باشند. سایز نانوذرات نقره بیوستنز شده  $27 \pm 0 / 18$  نانومتر می‌باشد.



نگاره ۳- تصاویر میکروسکوپی الکترونی TEM از نانوذرات نقره بیوستنز شده توسط ساکارومیسیس سرویسیه

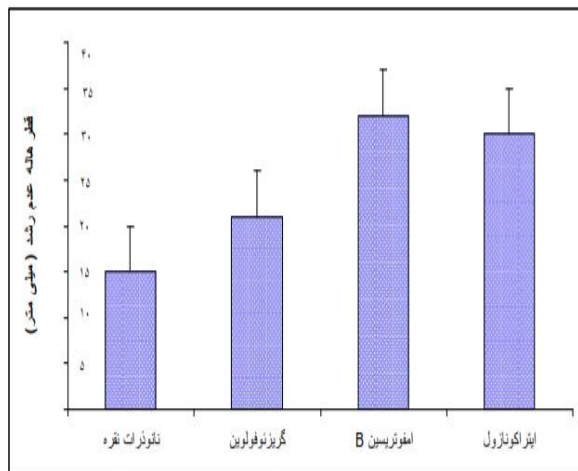
جدول ۱- سایز نانوذرات نقره بیوستنز شده توسط ساکارومیسیس سرویسیه

سایز نانو ذرات میکروارگانیزم تولید کننده نقره/(nm)	ساکارومیسیس سرویسیه
	$27 \pm 0 / 42$

**اثبات بیوستنز نانوذرات نقره توسط ساکارومیسیس سرویسیه توسط XRD:** در مطالعه توسط XRD ساختار کریستالی ذرات مورد بررسی و مطالعه قرار می‌گیرد. نمونه‌های نقره که در ناحیه ۱۱۱ پیک‌های قوی ایجاد می‌کنند اثبات کننده کروی شکل بودن نانوذرات نقره بیوستنز شده می‌باشد. در تحقیق انجام شده پیک‌هایی در ناحیه ۱۱۱ نشان داده شد که بر طبق مطالعات محققین، نشان‌دهنده کروی بودن نانوذرات نقره است.



بررسی اثر ضدقارچی نانوذرات نقره بیوستنز شده... ۳۳



نمودار ۴- میانگین قطر هاله عدم رشد میکروسپوروم کانیس در برابر نانوذرات بیوستنز شده و داروهای آمفوتریسین B، ایتراکونازول و گریزئوفولون

کمترین میزان غلظت مهارکننده رشد قارچ میکروسپوروم کانیس ( $MIC_{80}$ ) نانوذرات نقره بیوستنز شده توسط ساکارومیسیس سرویسیه در جدول شماره ۵ و ۴ نمایش داده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص گردید که نانوذرات نقره بیوستنز شده دارای پتانسیل بالای اثر ضد قارچی بر علیه میکروسپوروم کانیس می باشند. بین نانوذرات نقره و داروی گریزئوفولون تفاوت معناداری مشاهده نگردید اما بین نانوذرات نقره و آمفوتریسین B و ایتراکونازول تفاوت معنی دار است. به طور خلاصه می توان اینطور برداشت کرد که اثرات نانوذرات نقره مشابه داروهای فعلی مورد استفاده در درمان درماتوفیتوزیس می باشد. ( $p \leq 0/05$ )

جدول ۴- کمترین میزان غلظت مهارکننده رشد قارچ میکروسپوروم کانیس ( $MIC_{80}$ ) نانوذرات نقره بیوستنز شده توسط ساکارومیسیس سرویسیه به روش ماکرودایلوشن

$MIC_{80}$ $\mu g/ml$	نانوذرات نقره بیوستنز شده $MIC_{80}$ $\mu g/ml$	آمفوتریسین B $MIC_{80}$ $\mu g/ml$	ایتراکونازول $MIC_{80}$ $\mu g/ml$	گریزئوفولون $MIC_{80}$ $\mu g/ml$
۲۶ ± ۰/۲۵	۰/۵۶ ± ۰/۱۳	۰/۷۴ ± ۰/۵۱	۰/۷۴ ± ۰/۵۱	۲۳ ± ۰/۴۶

Mean ± S. E

نتایج با سه بار تکرار و محاسبه انحراف از میانگین ارائه شده است.

جدول ۲- غلظت نانوذرات نقره بیوستنز شده توسط ساکارومیسیس سرویسیه

سرویسیه	
غلظت نانوذرات نقره بیوستنز شده	میکروارگانیزم
(ppm = $\mu g/ml$ )	
۱۵۸/۵۷ ± ۰/۸	ساکارومیسیس سرویسیه

نتایج حاصل از اثرات ضد قارچی: نتایج حاصل

از روش چاهک و دیسک دیفیوژن در جدول شماره ۳ نمایش داده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده می توان نتیجه گرفت که نانوذرات نقره بیوستنز شده دارای پتانسیل بالای اثر ضد قارچی بر علیه میکروسپوروم کانیس می باشد. این نکته در مقایسه با داروهای ضد قارچی قابل مقایسه می باشد و بین نانوذرات نقره و داروی گریزئوفولون تفاوت معناداری مشاهده نگردید. اما بین نانوذرات نقره و آمفوتریسین B و ایتراکونازول تفاوت معنی دار است. به طور خلاصه می توان اینطور بیان کرد که اثرات نانوذرات نقره مشابه داروهای فعلی مورد استفاده در درمان درماتوفیتوزیس بوده است ( $p \leq 0/05$ ).

جدول ۳- میانگین قطر هاله های عدم رشد میکروسپوروم کانیس در مقابل نانوذرات نقره بیوستنز شده توسط ساکارومیسیس سرویسیه

میکروارگانیزم	نانوذرات نقره بیوستنز شده قطر هاله عدم رشد mm	آمفوتریسین B قطر هاله عدم رشد mm	ایتراکونازول قطر هاله عدم رشد mm	گریزئوفولون قطر هاله عدم رشد mm
میکروسپوروم کانیس	۱۵ ± ۱/۷	۳۲ ± ۰/۳۷	۲۸ ± ۰/۱۹	۲۱ ± ۱/۰۴

Mean ± S. E

طی تحقیقات انجام شده عنوان شده است که نیترات ردوکتاز مسئول احیا یون نقره و به دنبال آن بیوسنتز نانوذرات نقره است (۴). میکروارگانیسم‌ها می‌توانند این آنزیم را به صورت داخل یا خارج سلولی داشته باشند (۷). اخیراً Kumar و همکاران سنتز آنزیمی نانوذرات نقره را با استفاده از نیترات ردوکتاز وابسته به NADH نشان دادند. در این واکنش نقره  $Ag^+$  به وسیله آنزیم نیترات ردوکتاز به  $Ag^0$  احیا می‌شود (۲۳). این احیا به واسطه یک کینون به عنوان یک عامل رفت و برگشتی (shuttle) انجام می‌گیرد. به این صورت که کینون به وسیله این آنزیم احیا شده و باعث احیا  $Ag^+$  و تبدیل آن به  $Ag^0$  می‌گردد و خود اکسید می‌شود. نیترات ردوکتاز در حین احیا کینون باعث احیا نیترات به نیتريت می‌گردد و نیتريت حاصله به وسیله  $NADP^+$  به عنوان کوفاکتور اکسید می‌شود. این فرایند با زنده بودن میکروارگانیسم و حضور نیترات ردوکتاز مجدداً بازیابی می‌شود (۲۰ و ۱۵، ۹، ۸، ۵). این مسئله می‌تواند توجیهی در جهت چگونگی بیوسنتز نانوذرات نقره توسط ساکارومیسیس سرویسیه نیز باشد. اولین نشانه‌های بیوسنتز نانوذرات نقره تغییر رنگ ایجاد شده می‌باشد که نیترات نقره یک میلی مولار بی‌رنگ به قهوه‌ای تبدیل می‌شود. این مطلب با نتایج بدست آمده با تمامی تحقیقات گذشته کاملاً مطابقت دارد (۲۴-۱۹ و ۱۷-۲). دومین نشانه اثبات بیوسنتز نانوذرات نقره مشاهده پیک در محدوده ۴۱۰-۴۵۰ نانومتر می‌باشد (۲۴-۱۹ و ۱۷-۲). این مسئله اینگونه توجیه می‌شود که فلزات به عنوان پلاسما محبوس شده‌ای از یون‌های مثبت و الکترون‌های رسانش هستند. در حالت خنثی ابر یونی دارای بار مثبت با ابرالکترونی دارای بار منفی با یکدیگر همپوشانی می‌کنند اما با تحریک خارجی مثل تابش نور الکترون‌ها از وضعیت تعادل خارج می‌شوند. الکترون‌ها تمایل به

جدول ۵ - کمترین میزان غلظت مهارکننده رشد قارچ میکروسپوروم کانیس (MIC<sub>80</sub>) نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط ساکارومیسیس سرویسیه به روش میکرودایلوشن

MIC <sub>80</sub> μg/ml	نانوذرات نقره بیوسنتز شده MIC <sub>80</sub> μg/ml	آمفوتریسین B MIC <sub>80</sub> μg/ml	ایتراکونازول MIC <sub>80</sub> μg/ml	گریزوفولون MIC <sub>80</sub> μg/ml
۳۳ ± ۰/۴	۰/۵۸ ± ۰/۱۸	۰/۳۹ ± ۰/۰۶	۰/۳۵ ± ۰/۲۹	

Mean ± S. E

کمترین میزان غلظت کشنده قارچ میکروسپوروم کانیس (MFC) نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط ساکارومیسیس سرویسیه در جدول شماره ۵ نمایش داده شده است. با توجه به نتایج حاصله می‌توان عنوان کرد که نانوذرات نقره بیوسنتز شده دارای پتانسیل بالای اثر کشندگی بر علیه میکروسپوروم کانیس می‌باشند که این نکته در مقایسه با داروهای ضد قارچی قابل مقایسه می‌باشد. اثرات نانوذرات نقره با داروی نیستاتین مشابه می‌باشد ( $p \leq 0/05$ ).

جدول ۶ - کمترین غلظت کشنده قارچ میکروسپوروم کانیس (MFC) نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط ساکارومیسیس سرویسیه

میکروارگانیسیم	نانوذرات نقره بیوسنتز شده MFC μg/ml	آمفوتریسین B MFC μg/ml	ایتراکونازول MFC μg/ml	گریزوفولون MFC μg/ml
میکروسپوروم کانیس	۳۴ ± ۰/۷۱	۰/۶۱ ± ۰/۰۶	۰/۴۲ ± ۰/۰۴۳	۳۰ ± ۰/۲۵

Mean ± S. E

## بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص گردید ساکارومیسیس سرویسیه پتانسیل بیوسنتز نانوذرات نقره با میانگین سایز ۲۷ نانومتر و با غلظت ۱۵۸ میکروگرم بر میلی لیتر را دارد. اغلب محققان در بیان روش قطعی مکانیسم تولید نانوذرات در میکروارگانیسیم‌ها تلاش زیادی کردند اما هنوز سؤالات زیادی در این خصوص مطرح است. محققین بر این عقیده هستند که در معرض قرار گرفتن یون‌های نقره ( $Ag^+$ ) با میکروارگانیسیم منجر به آزادسازی آنزیم ردوکتاز و به دنبال آن احیای یون نقره می‌شود، آنزیم مترشحه وابسته به کوفاکتور NADH می‌باشد (۵، ۱).





### بررسی اثر ضدقارچی نانوذرات نقره بیوسنتز شده... ۳۵

نقره گروه OH می باشد که نتایج حاصله با نتایج سایر مطالعات مطابقت دارد (۲۴-۱۹ و ۱۷-۲). در تحقیقات گذشته توانایی بیوسنتز نانوذرات توسط باکتری ها به صورت وسیع انجام شده است اما در مورد مخمرها تحقیقات محدود بوده است. پتانسیل مخمرها در تولید نانوذرات به صورت داخل سلولی اثبات شده بود اما اخیراً از مخمرها در تولید نانوذرات نقره به شکل خارج سلولی توسط یک سوش مخمری مقاوم به نقره به نام MKY3 استفاده شده است (۱۴). ذرات تشکیل دهنده در ابعاد ۲-۵ نانومتر در حضور یون های  $Ag^+$  در فاز لگاریتمی رشد بدست آمده است. در تحقیق دیگر می توان به بیوسنتز توسط شیزوساکارومیسس پومبه (*Schizosaccharomyces pombe*) اشاره کرد که می تواند نانوذرات سولفید کادمیوم و نقره تولید کند (۶). در تحقیق دیگری از ساکارومیسس بولاردی (*Saccharomyces boulardii*) در بیوسنتز نانوذرات نقره استفاده شده است (۱۳، ۱۰). در یک پژوهش دیگر توانایی مخمرهای اکسترموفیل اسیددوست در بیوسنتز نانوذرات نقره اثبات گردید (۱۹). اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره بسیار مورد بررسی قرار گرفته است اما بیشتر تحقیقات بر اثرات ضد باکتری هاست و تحقیقات محدودتری به روی اثرات ضدقارچی انجام شده که اغلب آن ها بر قارچ های ساپروفیت صورت گرفته است (۱۷ و ۱۵، ۱۲، ۱۱، ۷، ۲). تحقیقات در خصوص درماتوفیت ها محدودتر بوده است. در سال ۲۰۰۸ kim و همکاران اثرات ضد قارچ نانوذرات نقره بر *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* (*Trichophyton mentagrophytes*) را بررسی کردند. در سال ۲۰۱۶ آیت الهی و همکاران اثرات ضدقارچی نانوذرات نقره را بر سه گونه درماتوفیت از جمله میکروسپوروم کانیس (*Microsporum canis*) بررسی کردند که در این

برگشتن به وضعیت تعادلی خود را دارند و به این ترتیب دچار جهش می شوند و به جلو و عقب نوسان می کنند. نوسان به هم پیوسته ای از الکترون های رسانش در فلزات که در معرض برانگیختگی با تابش الکترومغناطیس قرار گرفته اند به عنوان پلاسمون شناخته می شود این نوسان ها یک باند جذبی قوی در ناحیه مرئی طیف الکترومغناطیسی می دهد که به عنوان باند روزنالس پلاسمونی (Surface Plasmon Resonance) شناخته می شود Mie این پدیده را با استفاده از معادلات ماکسون تومی حداد که برای ساختارهای فلزی با سایز نانو تعریف می شود. (۵). باند روزنالس پلاسمونی سطحی (SRP) به اندازه و شکل ذرات و ثابت دیالکتریک محیط که ذرات در آن قرار دارند وابسته است. در مورد نانوذرات نقره این نقطه SRP بین ۴۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر می باشد. نتایج حاصله در این پژوهش، افزایش جذب در ناحیه ۴۲۰ را نشان می دهد که با سایر مطالعات نیز مطابقت دارد (۲۴-۱۹ و ۱۷-۲). در تحقیق انجام شده توسط XRD پیک هایی در ناحیه ۱۱۱ نشان داده شد که بر طبق مطالعات محققین، نشان دهنده کروی بودن نانوذرات نقره بیوسنتز شده است. محاسبه سایز ذرات نانوذرات نقره توسط این فرمول با سایز نانوذرات نقره محاسبه شده در TEM مطابقت داشته است همچنین نتایج بدست آمده با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (۲۴-۱۹ و ۱۷-۲). به منظور دستیابی به گروه های عاملی از FTIR استفاده شد. به طور کلی FTIR جهت شناسایی گروه های عامل ترکیبات مختلف مورد استفاده قرار گرفت. در تحقیق انجام شده پیک های قوی در ناحیه ۳۴۰۰ ایجاد شده که در قبل از بیوسنتز پیک ضعیف دارد و در ضمن پیک های جدید در ناحیه ۱۰۰۰ تا ۱۴۰۰  $cm^{-1}$  مشاهده شده است که نشان دهنده این است که گروه عاملی مؤثر برای بیوسنتز نانوذرات

- Microsporiumcanis*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporium gypseum*. *Iranian Journal of Biotechnology*, **13**: 38-42.
- Bhainsa, K. C., & D'souza, S. F. (2006). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, **47**: 160-164.
  - Dhoondia, Z. H., & Chakraborty, H. (2012). *Lactobacillus* mediated synthesis of silver oxide nanoparticles. *Nanomaterials and Nanotechnology* **2**: 2-15.
  - Duran, N., Marcato, P. D., De Souza, G. I., Alves, O. L., & Esposito, E. (2007). Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **3**: 203-208.
  - Forsburg, S. L. (2007). The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. *Gravitational and Space Research*, **18**(2).
  - Gajbhiye, M., Kesharwani, J., Ingle, A., Gade, A., & Rai, M. (2009). Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **5**: 382-386.
  - Gurunathan, S., Kalishwaralal, K., Vaidyanathan, R., Venkataraman, D., Pandian, S. R. K., Muniyandi, Eom, S. H. (2009). Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **74**: 328-335.
  - Kaler, A., Patel, N., & Banerjee, U. C. (2010). Green synthesis of silver nanoparticles. *Current Research & Information on Pbarmaceticals Sciences*, **11**: 68-71.
  - Kaler, A., Jain, S., & Banerjee, U. C. (2013). Green and rapid synthesis of anticancerous silver nanoparticles by *Saccharomyces boulardii* and insight into mechanism of nanoparticle

تحقیق ۸۰ درصد مهارکنندگی نانوذرات نقره را ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اعلام داشتند. در این پژوهش از نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط ساکارومیسس سرویسیه استفاده شد که ۸۰ درصد مهارکنندگی آن ۳۳ میکروگرم بر میلی لیتر است که نتیجه بسیار مطلوب تری را نشان می دهد و قابل قیاس با داروی مؤثره گریزئوفولونین می باشد. مکانیسم احتمالی اثر ضدقارچی نانوذرات نقره، تغییر در نفوذپذیری غشا می باشد که در نهایت باعث مرگ سلول میکروسپوروم کانیس در اثر این تغییر می گردد. در پایان می توان اذعان داشت که ساکارومیسس سرویسیه به عنوان یک میکروارگانیسم غیر پاتوژن و ایمن، توانایی بسیار مناسبی در بیوسنتز نانوذرات نقره داشته است. این روش ساده، ارزان، غیرسمی است و محصول آن می تواند در صنایع مختلف دارویی، غذایی و پزشکی با کمترین عوارض جانبی مورد استفاده قرار گیرد.

### تشکر و سپاسگزاری

مقاله مذکور استخراج شده از طرح تحقیقاتی با عنوان بررسی امکان بیوسنتز نانوذرات نقره توسط ساکارومیسس سرویسیه و خواص ضد میکروبی آن می باشد که با حمایت مادی و معنوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی انجام شده است. بدینوسیله از تمامی عزیزان بخصوص معاونت محترم پژوهشی واحد تهران مرکزی تشکر و قدردانی می گردد.

### فهرست منابع

- Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M. I., Kumar, R., & Sastry, M. (2003). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusariumoxysporum*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, **28**: 313-318.
- Ayatollahi Mousavi, S. A., Salari, S., & Hadizadeh, S. (2016). Evaluation of Antifungal Effect of Silver Nanoparticles Against



- Microsporium canis* isolates. *Veterinary dermatology*,**15**: 175-180.
19. Mourato, A., Gadanho, M., Lino, A. R., & Tenreiro, R. (2011). Biosynthesis of crystalline silver and gold nanoparticles by extremophilic yeasts. *Bioinorganic chemistry and applications*. **2011**: Article ID 546074, 8 pages.
  20. Nanda, A., & Saravanan, M. (2009). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*,**5**:452-456.
  21. Poulose S, Panda T, Nair PP, Theodore T. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles, *Journal of nanoscience and nanotechnology*,**14**:2038-49.
  22. Ramya, M., & Subapriya, M. S. (2012). Green synthesis of silver nanoparticles. *International Journal of Pharmacy, Medicine and Biology Science*,**1**: 54-61.
  23. Sastry, M., Ahmad, A., Khan, M. I., & Kumar, R. (2003). Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Current science*,**85**: 162-170.
  24. Vanaja, M., & Annadurai, G. (2013). Coleus aromaticus leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. *Applied Nanoscience*,**3**: 217-223.
  - synthesis. *BioMedical research international*,**2013**(2013): Article ID 872940, 8 pages.
  11. Kandile, N. G., Zaky, H. T., Mohamed, M. I., & Mohamed, H. M. (2010). Silver nanoparticles effect on antimicrobial and antifungal activity of new heterocycles. *Bulletin of the Korean Chemical Society*,**31**: 3530-3538.
  12. Kim, K. J., Sung, W. S., Moon, S. K., Choi, J. S., Kim, J. G., & Lee, D. G. (2008). Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *Journal Microbiology Biotechnology*, **18**:1482-1484.
  13. Korbekandi, H., Jouneghani, R. M., Mohseni, S., Pourhossein, M., & Irvani, S. (2014). Synthesis of silver nanoparticles using biotransformations by *Saccharomyces boulardii*. *Green Processing and Synthesis*,**3**:271-277.
  14. Kowshik, M., Ashtaputre, S., Kharrazi, S., Vogel, W., Urban, J., Kulkarni, S. K., & Paknikar, K. M. (2002). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. *Nanotechnology*,**14**: 95.
  15. Lee, J., Lee, D. G., Kim, J. G., Kim, K. J., & Sung, W. S. (2010). The silver nanoparticle nano-Ag): a new model for antifungal agents. *Intech* (**2010**).
  16. Mie, R., Samsudin, M. W., Din, L. B., Ahmad, A., Ibrahim, N., & Adnan, S. N. A. (2014). Synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity using the lichen Parmotrema praesorediosum. *International journal of nanomedicine*,**9**: 121.
  17. Monteiro, D. R., Gorup, L. F., Silva, S., Negri, M., de Camargo, E. R., Oliveira, R., Henriques, M. (2011). Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling*,**27**: 711-719.
  18. Moriello, K. A., Deboer, D. J., VOLK, L. M., SPARKES, A., & Robinson, A. (2004). Development of an in vitro, isolated, infected spore testing model for disinfectant testing of

## Antifungal effect of silver nanoparticles biosynthesized by *Saccharomyces cerevisiae* on *Microsporumcanis*

Omidi, B.\*

Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch,  
Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received Date: 21 April 2017

Accepted Date: 7 January 2018

---

**Abstract:** Silver nanoparticles have been synthesized by several methods, but each of them has disadvantages. Chemical methods, have high toxicity and low stability, and physical methods, are costly and low-efficient. More recently, researchers have found a new technique for synthesizing AgNPs, using plants and microorganisms such as bacteria, fungi, and Actinomycetes. This method is called “eco-friendly”, “green synthesis” or “Biosynthesis”. The aim of this investigation was, biosynthesis of AgNPs using *Saccharomyces cerevisiae*, which is one of the safe microorganisms that the AgNPs synthesized by it, are suitable for using in pharmacology and medicine purposes. *Saccharomyces cerevisiae* was cultured in sabraud dextrose broth and incubated at 28-30°C for 24 h, then it was centrifuged, and its supernatant was added to the silver nitrate solution with the concentration of 0.001, 0.002 and 0.003 M at pH: 5.6, 7 and 9, then incubated at 28 -35 and 37°C. The formation of AgNPs, was monitored by color-changing, uv-vis spectroscopy, TEM, XRD and FTIR. Antifungal effect of AgNPs on *Microsporumcanis* investigated by disc diffusion method. MIC and MFC were also measured. The results, showed that *Saccharomyces cerevisiae* have had the great potential for synthesizing of AgNPs in the size of 27 nm and have shown the antifungal effect in the concentration of 33±0.29 µg/ml. In this study, we have reported a simple, biological, easy and nontoxic method for synthesis of silver nanoparticles, which have had suitable antifungal effect on *Microsporumcanis*, by using one of the nonpathogenic microorganisms.

**Keyword:** silver nanoparticles, Biosynthesis, *Saccharomyces cerevisiae*, *Microsporumcanis*

---

\*Corresponding author: Omidi, B.

Address: Department of Biology, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran. Tel:

Email: [omidi9092@yahoo.com](mailto:omidi9092@yahoo.com)