

بررسی اثر ضدقارچی نانوذرات نقره بیوستتز شده توسط ساکارومیس سروسیه بر کاندیدا آلبیکنس

بهین امیدی^۱، میترا سادات طباطبایی^۱، کیمیا کاشانی^۲، یحیی استادی^۳

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران (نویسنده مسئول)*

۲- گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- گروه اقتصاد کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور ص. پ. ۱۹۳۹۵-۳۶۹۷، تهران، ایران

چکیده

امروزه روش های مختلفی برای تولید نانوذرات نقره مورد استفاده قرار می گیرد اما هر یک از آنها دارای معایب زیادی هستند. روش های شیمیایی اکثرا سمی و ناپایدارند و روش های فیزیکی گران و کم بازده هستند. اخیرا محققین با استفاده از سیستم های بیولوژیکی مانند گیاهان و میکروارگانیسم ها نانوذرات نقره تولید کرده اند. این روش ارزان، بی خطر و پایدار است. در این تحقیق از ساکارومیس سروسیه به عنوان یک بیوراکتور استفاده شد و اثرات ضد قارچی نانوذرات نقره بیوستتز شده بر علیه کاندیدا آلبیکنس بررسی شد. سوپرناتانت مخمر به محلول 10^{-2} M نیترات نقره اضافه شد و در انکوباتور 30°C و دور 250 rpm قرار داده شد. تغییرات رنگ آن مورد بررسی قرار گرفت، سپس توسط دستگاه های طیف سنج مرئی-فرابنفش (UV-VIS)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، پراش اشعه ایکس (XRD) و طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)، بیوستتز نانوذرات نقره اثبات شد. نانوذرات حاصل به روش دیسک و چاهک گذاری و محاسبه قطر هاله عدم رشد بر علیه کاندیدا آلبیکنس، MIC و MFC آن بررسی شد و با داروهای موثره مقایسه گردید. نتایج نشان داد که ساکارومیس سروسیه توانایی بیوستتز نانوذرات نقره با سایز 27 nm را داشته و این نانوذرات نقره با غلظت $0.29 \pm 0.27\text{ }\mu\text{g/ml}$ اثر کشندگی بر کاندیدا آلبیکنس دارد. این پژوهش در واقع گزارشی است از امکان بیوستتز نانوذرات نقره توسط یکی از میکروارگانیسم های ایمن و غیر پاتوژن که نانوذرات بیوستتز شده آن می تواند مورد استفاده در پزشکی و داروسازی قرار گیرد.

واژه های کلیدی: نانوذرات نقره، بیوستتز، ساکارومیس سروسیه، کاندیدا آلبیکنس

* omidi9092@yahoo.com

¹ Ultraviolet-Visible spectrophotometer

² Transmission Electron Microscope

³ X-Ray Diffraction

⁴ Fourier Transform Infrared Spectroscope

⁵ Minimum Inhibitory Concentration

⁶ Minimum Fungicidal Concentration

مقدمه

فناوری نانو از مباحث عمده مجامع علمی امروز است که نوید پیشرفت‌های سریع در تمام زمینه‌های علمی و صنعتی را می‌دهند (۱). علم نانو تکنولوژی کاربرد علوم مختلف را برای کنترل مواد در سطح مولکولی فراهم کرده است. طبق تعریف موسسه ملی نانو تکنولوژی، نانو عبارت است از اندازه حقیقی بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر می‌باشد (۲). این خصوصیت قادر به فراهم کردن پدیده‌هایی بی نظیر با کاربردهای جدید می‌باشد. ویژگی‌های بسیار جالب نانوذرات مربوط به افزایش سطح به حجم آن‌ها است که این باعث تولید نیروی محرکه عظیمی جهت انتشار، بخصوص در دماهای بالا می‌باشد همچنین این نسبت بالا، دمای ذوب نانوذرات را کاهش می‌دهد و نرخ کاهش نقطه ذوب در اندازه ذرات خیلی کوچک بسیار شدید است. دلیل دیگر هم نزدیک شدن ابعاد ماده و نزدیک شدن به اندازه‌های مولکولی و اتمی است (۳). فناوری نانو یکی از فناوری‌های روز دنیا است که در هر صدهای مختلف صنایع الکترونیک، کشاورزی، بهداشت، داروسازی، دارورسانی، صنایع غذایی، نفت، انرژی، پوشاک، فناوری کامپیوتر، سخت افزار، فضا نوری، و صنایع شیمیایی وارد شده است. درخشش این فناوری در نانو تکنولوژی پزشکی نیز با فراهم آوردن امکان تشخیص بیماری‌ها و دارورسانی به خوبی مشهود است (۴ و ۳). در این میان، نانوذرات فلزی مانند طلا، نقره، تیتانیوم و مس به علت کاربرد وسیع آن‌ها در پزشکی، داروسازی، الکترونیک، نساجی، صنایع غذایی و غیره بسیار مورد توجه هستند (۴ و ۳).

در نانو تکنولوژی تولید نانوذرات به دو روش صورت می‌گیرد، از بالا به پایین و از پایین به بالا. در روش اول با 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 (۸-۵).

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 (۱۶-۹). روش‌های فیزیکی مختلفی مانند استفاده از پرتوهای مختلف و لیزر نیز مورد استفاده قرار گرفته است (۱۷). اما اکثر این روش‌ها با محدودیت‌هایی از جمله ناپایداری، گرانی، کم بازده بودن و سمی بودن همراه هستند بنابراین نمی‌توان از آن‌ها در اهداف پزشکی و داروسازی و دارورسانی استفاده کرد. نانو بیوتکنولوژی زیر مجموعه‌ای از علم نانو تکنولوژی است که از موجودات زنده مانند باکتری‌ها (۲۴-۱۸)، جلبک‌های سبز، قارچ‌ها، اکتینومیست‌ها (۳۵-۲۵) و عصاره گیاهان (۳۴-۳۶) در جهت بیوسنتز نانوذرات استفاده می‌کند. این روش بیوسنتز یا سنتز سبز نامیده می‌شود. این روش پاک، ساده، پایدار، دوستدار طبیعت و غیرسمی است. تحقیقات زیادی در سنتز سبز انجام شده است اما بسیاری از میکروارگانیسم‌های مورد استفاده دارای خاصیت بیماری‌زایی هستند در نتیجه می‌توانند با خطراتی همراه باشند. در این تحقیق از ساکارومیسس سرویسه^۱ استفاده شده است.

ساکارومیسس سرویسه از دسته میکروارگانیسم‌های بی خطر بوده، مهم‌ترین و پرکاربردترین مخمر صنعتی است که در صنایع مختلفی مانند تهیه نان، الکل، سرکه، اسیدهای مختلف و غیره استفاده می‌گردد. همچنین این مخمر به عنوان پروتئین تک‌یاخته^۲ نیز استفاده می‌شود (۴۵). استفاده از این مخمر باعث می‌شود نانوذرات نقره حاصل شده با اطمینان در پزشکی و داروسازی مورد استفاده قرار گیرد. در این تحقیق در نهایت اثرات ضد قارچی نانوذرات نقره بیوسنتز شده بر علیه کاندیدا آلیکنس مورد بررسی قرار گرفته است.

¹ *Saccharomyces cerevisiae*

² Single cell protein



شکل ۱- آزمون بیوستز نانوذرات نقره توسط ساکارومیسیس

مواد و روش‌ها

نحوه آماده سازی ساکارومیسیس سروسیه

میکروارگانیزم مورد استفاده در این پژوهش (5269) *Saccharomyces cerevisiae* (PTCC) بوده است که به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد، مخمر به محیط ساپرو دکستروز برات محتوی کلرامفنیکل منتقل شد و در شیکراتکویاتور با دمای 28°C - ۳۰ به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت قرار داده شد.

اثبات بیوستز 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.

بررسی به روش اسپکتروفتومتری

یکی از روش‌های تحلیل نانوذرات مطالعه طیف جذبی آن‌ها در محدوده طول موج نور مرئی و فرابنفش است. این روش برای مطالعه ذرات نامرئی نیمه رسا و نانوذرات فلزی مثل مس، طلا و نقره که در محدوده طول موج نور مرئی، تشدید پلاسمونی دارند موثر است. به این منظور از نمونه‌های تهیه شده از نظر جذب طول موج‌های بین 200 تا 650 نانومتر بررسی شدند. پلانک استفاده شده آب مقطر حاوی یک سی‌سی پلی ونیل پیرولیدین 20 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 را به مدت 10 دقیقه با دور 13000 rpm سانتریفیوژ گردید و در مرحله بعد رسوب را با آب مقطر استریل شستشو شد و دوباره سانتریفیوژ شد، رسوب حاصل که حاوی نانوذرات نقره بود، به مدت 18 ساعت در دستگاه فریزدرایر قرار داده شد و پودر حاصل با KBr به صورت قرص درآمده و توسط دستگاه مورد بررسی

مراحل بیوستز نانوذرات نقره

تهیه محلول نیترات نقره

به منظور تهیه نیترات نقره یک میلی مولار، در یک بالن ژوژه که کاملاً شسته شده و خشک شده، میزان 0.169 gr از نیترات نقره را اضافه نموده و توسط آب دیونیزه به حجم یک لیتر رسانده شد. در نهایت pH محلول بر $5/6$ تنظیم شد. به منظور پایداری و عدم تجمع نانوذرات از پایدارکننده‌ها استفاده می‌شود. یکی از پایدارکننده‌ها پلی ونیل پیرولیدین می‌باشد. به این منظور پلی ونیل پیرولیدین 20 g/L تهیه و استریل گردید.

بررسی امکان بیوستز نانوذرات نقره توسط ساکارومیسیس سروسیه

درون ارلن یا فلاسک استریل مقدار 100 ml از نیترات نقره 1 mM ریخته شد و 10 ml از سوپرناتانت مخمر اضافه گردید، به این محلول 1 ml پلی ونیل پیرولیدین نیز اضافه شد سپس دور قانل را با فریل پوشانده و درون شیکراتکویاتور قرار داده شد. رنگ ابتدایی محلول بی رنگ می‌باشد تغییر رنگ به سمت قهوه‌ای نشان دهنده انجام واکنش می‌باشد. در نتیجه تغییر رنگ محلول را در روز اول هر 2 ساعت و در روزهای بعدی، هر روز بررسی شدند.

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 خوانده شده و مقادیر نسبت به آن‌ها خوانده شد.

بررسی اثر ضد قارچی نانوذرات نقره

نحوه آماده سازی قارچ

قارچ *کلانیدیلا آلیکینس* (PTCC:5027) بر روی محیط سابورودکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (SC) کشت داده شد و در انکوباتور 27°C ، به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد.

تعیین اثر ضد قارچی نانوذرات نقره به روش دیسک و چاهک

در این پژوهش از محیط کشت سابورودکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل برای *کلانیدیلا آلیکینس* استفاده شد. سوسپانسیون قارچی معادل نیم مک فارلند تهیه گردید و توسط صواب استریل بر روی سطح محیط کشت کشیده شد. سپس توسط پیت پاستور استریل در مرکز پلیت گوده ایجاد شد. میزان $100 \mu\text{L}$ از غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بیوستر شده و نانوذرات نقره استاندارد در این گوده‌ها ریخته شد. در روش دیگر از دیسک بلانک استفاده شد که غلظت‌ها مختلف نانوذرات نقره بر روی این دیسک‌ها ریخته شد و بعد از خشک شدن در مرکز پلیت‌های کشت داده شده، قرارداده شد. برای مقایسه اثرات ضد قارچی نانوذرات نقره با داروها از دیسک‌های داروهای آموتریسین B، فلوکونازول، ترینافین استفاده شد. در آخر پلیت‌ها به انکوباتور 37°C درجه منتقل شدند و هاله‌های عدم رشد پس از طی شدن زمان رشد قارچ بررسی شدند.

قرار گرفت. دستگاه استفاده شده Thermo Nicolet model: nexus 870 بوده است.

بررسی توسط دستگاه XRD

به این منظور محلول حاوی نانو ذرات را به مدت ۱۰ دقیقه با دور 13000 rpm سانتریفیوژ گردید و در مرحله بعد رسوب را با آب مقطر استریل شستشو شد 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. روش دیگری هم می‌توان استفاده کرد که رسوب حاصل را روی لام تمیز قرار داده و می‌گذاریم خشک شود به طوری که لایه پرننگ روی لام ایجاد شود و طرف مقابل لام دیده نشود و بعد توسط دستگاه مورد بررسی قرار داده شد. دستگاه استفاده شده Seifert بوده است.

بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی

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

به این منظور از دستگاه جذب اتمی^۱ استفاده شد. غلظت‌های مشخص از نانوذرات نقره استاندارد توسط دستگاه خوانده شد و منحنی استاندارد رسم شد و نمونه‌های مورد آزمایش توسط دستگاه بررسی شدند و غلظت نانوذرات نقره بیوستر شده مشخص گردید. روش دیگری

¹ Atomic Absorption Spectroscopy

بررسی اثر ضدقارچی نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط ساکارومیسیس سروسیه

می‌کنیم. در این روش، چاهک اول حاوی بیشترین غلظت و چاهک دهم حاوی کمترین غلظت است. بعد به هر یک از گوده‌ها به میزان ثابت ۱۰۰ µL از سوسپانسیون استاندارد شده توسط نیم مک فارلند و خواندن جذب آن در ۵۴۰ nm، را اضافه نموده تا حجم نهایی محلول برابر با ۲۰۰ µL شود. گوده ۱۱ حاوی ۱۰۰ µL محیط و ۱۰۰ سوسپانسیون قارچی به عنوان کنترل مثبت و گوده ۱۲ که فقط حاوی محیط کشت است به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. این آزمون با سه بار تکرار انجام شد. این پلیت‌ها در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. بعد از گذشت این زمان میکروپلیت‌ها از انکوباتور خارج و هم به صورت چشمی و هم توسط دستگاه الایزایریدر در طول موج ۵۴۰ nm قرائت شد. در این آزمون رقتی که ۱۰۰ درصد رشد قارچ مهار شده بود به عنوان MIC₈₀ در نظر گرفته شد. در روش استفاده از دستگاه الایزایریدر کمترین غلظتی که برابر با MIC₈₀ باشد جواب آزمون خواهد بود. این روش با استفاده از استاندارد NCCLS M38-A انجام شده است.

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

MFC بنا به تعریف کمترین غلظتی از فعالیت ضد قارچی 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 لوله های قبل از MIC برداشته و به روی ساپورودکستروز آگار کشت داده شد و بعد انکوبه شدند، بعد از گذشت زمان رشد هر رقتی که در پلیت مانع رشد کامل قارچ شده باشد یا کمتر از ۳ کلونی (تقریباً معادل ۹۹-۹۹/۵ درصد فعالیت کشندگی) وجود داشته باشد به عنوان MFC در نظر گرفته شد.

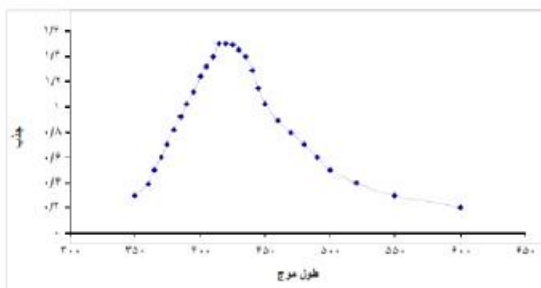
تعیین حداقل میزان غلظت جلوگیری کننده از رشد MIC به روش ماکرودایلوشن

در این پژوهش برای تعیین MIC از محیط کشت ساپورودکستروز برات محوری کلرامفتیکل برای کاندیدا، آلیکنس استفاده شد. روش کار به این صورت است که درون هر لوله ۱۰ ml محیط ریخته شده و غلظت‌های مختلفی از نانوذرات نقره تهیه شده از شرکت نانوصب تهران، تهیه شد و به همین ترتیب از نانوذرات نقره بیوسنتز شده در این پژوهش نیز غلظت‌های مختلف تهیه گردید و از سوسپانسیون قارچی ۱۰۰ µL اضافه شد. برای بررسی بیشتر کنترل مثبت (بدون نانوذرات نقره) و کنترل منفی (محیط بدون قارچ) برای هر نمونه تهیه شد و همه نمونه‌ها در انکوباتور ۳۷ °C قرار داده شد و تغییرات و رشد قارچ کاندیدا آلیکنس به مدت ۵ روز بررسی شدند. آزمایشات بر اساس استاندارد NCCLS: M27-A انجام شده است.

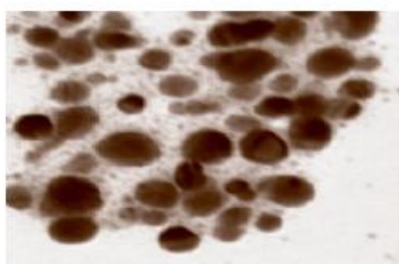
تعیین حداقل میزان غلظت جلوگیری کننده از رشد (MIC) به روش میکرودایلوشن

در این پژوهش برای سنجش MIC از روش میکرودایلوشن نیز استفاده شد. در این روش از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه استریل استفاده شد. پائین‌ترین غلظتی که از رشد قارچ جلوگیری کند به عنوان MIC ماده ضد قارچی در نظر گرفته می‌شود که بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر، میکروگرم در میلی‌لیتر، میکرولیتر در میلی‌لیتر و یا بصورت واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر است. برای تعیین MIC ابتدا به هر یک از گوده‌های پلیت ۹۶ خانه به وسیله سمپلر هشت کاناله به میزان ۱۰۰ µL از محیط RPMI 1640 اضافه شد، سپس از نانوذرات نقره استاندارد و نانوذرات نقره بیوسنتز شده در این پژوهش، رقت‌های سریالی در میکروپلیت‌های مسطح ۹۶ خانه‌ای در هر چاهک تهیه شد، بدین صورت که به گوده اول از سمت چپ اضافه و به خوبی با محیط مخلوط شد، در ادامه از گوده اول به میزان ۱۰۰ µL برداشت و به گوده دوم منتقل کرده در نهایت از گوده دهم ۱۰۰ µL خارج

بیوستز شده توسط ساکارومیسیس سروسیه مورد آزمایش، کروی شکل هستند و می‌توان گفت از پراکندگی تقریباً یکسانی برخوردارند. سایز نانو ذرات نقره بیوستز شده 27 ± 0.18 nm می‌باشد.



نمودار ۱- بررسی جذب محلول حاوی نانوذرات نقره بیوستز شده توسط ساکارومیسیس سروسیه



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی TEM از نانوذرات نقره بیوستز شده توسط ساکارومیسیس سروسیه

جدول ۱- سایز نانوذرات نقره بیوستز شده

سایز نانوذرات نقره (nm)	میکروارگانیزم تولید کننده
27 ± 0.18	ساکارومیسیس سروسیه



شکل ۲- تغییر رنگ ایجاد شده توسط سوپرناتانت ساکارومیسیس سروسیه

نتایج

بررسی تغییر رنگ ایجاد شده

اولین نشانه اثبات تولید نانوذرات نقره تغییر رنگ آن از محلول بی‌رنگ به قهوه‌ای است. تغییر رنگ محلول‌ها نشان می‌دهد ساکارومیسیس سروسیه توانایی بیوستز نانوذرات نقره را دارند.

بررسی اسپکتروفتومتری

گام دوم برای اثبات تولید و سنتز نانوذرات نقره استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری UV-VIS و خواندن جذب محلول‌ها بین 350 nm تا 650 nm می‌باشد. قله در ناحیه 410 nm - 450 nm نشان‌دهنده سنتز نانوذرات نقره می‌باشد (۴۴-۱)، با توجه به نتایج بدست آمده مشخص گردید که ساکارومیسیس سروسیه ناحیه 420 nm قله ایجاد کردند. این مساله ثابت می‌کند که ساکارومیسیس سروسیه توانایی بیوستز نانوذرات نقره را دارند و توانستند در ناحیه 420 nm قله قوی ایجاد کنند.

بررسی مورفولوژی و سایز نانوذرات بیوستز شده توسط TEM

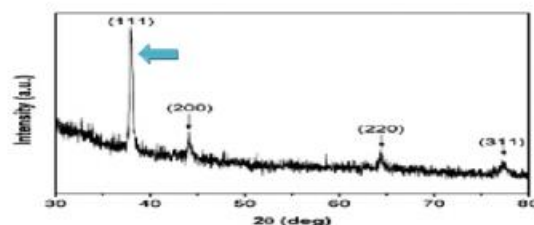
در بررسی انجام شده توسط میکروسکوپ الکترونی مشخص گردید که از نظر شکل و مورفولوژی نانوذرات نقره

اثبات بیوستتر نانوذرات نقره توسط XRD

در مطالعه توسط XRD ساختار کریستالی ذرات مورد بررسی و مطالعه قرار می‌گیرد. نمونه‌های نقره که در ناحیه ۱۱۱ nm قله‌های قوی ایجاد می‌کنند اثبات کننده کروی شکل بودن نانوذرات نقره بیوستتر شده می‌باشد. با استفاده از پهنای قله و زاویه تابش، می‌توان حتی با استفاده از فرمول شرر سایز ذرات را به دست آورد. در این فرمول، θ پهنای قله، θ زاویه که قله در ناحیه ظاهر شده که به صورت 2θ گزارش شده است λ طول موج پرتو X است.

$$D = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos \theta}$$

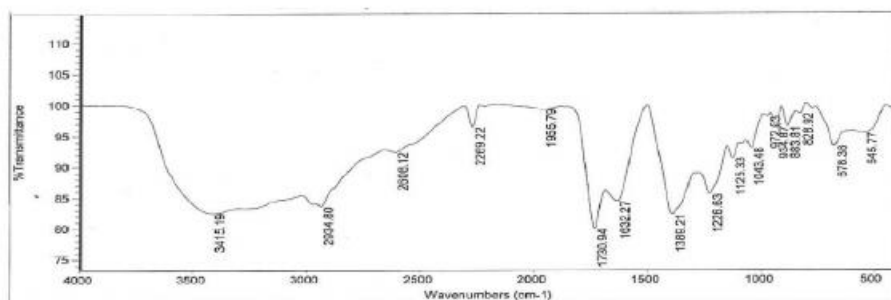
در تحقیق انجام شده قله‌هایی در ناحیه ۱۱۱ nm نشان داده شد که بر طبق مطالعات محققین، نشان‌دهنده کروی بودن نانوذرات نقره است. محاسبه سایز ذرات نانوذرات نقره توسط این فرمول با سایز نانوذرات نقره محاسبه شده در TEM مطابقت داشته است.



نمودار ۲- دیاگرام XRD محلول حاوی نانوذرات نقره بیوستتر شده توسط ساکارومیسیس سروسیه

اثبات بیوستتر نانوذرات نقره توسط FTIR

توسط این روش گروه‌های عاملی روی نانوذرات مشخص می‌شود. به منظور شناسایی گروه‌های عاملی که بر روی نانوذرات نقره وجود دارند، از طیف سنجی FTIR استفاده شد. به طور کلی این روش جهت شناسایی گروه‌های عاملی ترکیبات مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد و اساس کار آن بر این روش استوار است که هنگامی که نور تک فام شده مادون قرمز به مولکول‌های یک جسم برخورد می‌کند به حالت انرژی بالاتر برانگیخته شده و چون جذب تابش، دون قرمز یک فرآیند کوانتاتی است بدین صورت فقط فرکانس‌های مشخصی از تابش مادون قرمز توسط مولکول جذب می‌شود تابشی که دارای چنین انرژی باشد فرکانس ارتعاشی کششی و خمشی پیوندهای کوالانسی اکثر مولکول‌ها را شامل می‌گردد. در این روش پیوندهایی که در یک مولکول قادر به جذب نور مادون قرمز است که دارای گشتاور دو قطبی هستند و مولکول‌های متقارن جذب ندارند (۱-۴۴). در تحقیق انجام شده قله‌های قوی در ناحیه ۳۴۰۰ ایجاد شده که در قبل از بیوستتر قله ضعیف دارد و در ضمن قله‌های جدیدی در ناحیه 1400 cm^{-1} تا 1000 cm^{-1} مشاهده شده است که نشان‌دهنده این است که گروه عاملی موثر برای بیوستتر نانوذرات نقره گروه OH می‌باشد.



نمودار ۳- دیاگرام FTIR محلول حاوی نانوذرات نقره بیوستتر شده توسط ساکارومیسیس سروسیه

نتایج تعیین غلظت نانوذرات نقره بیوستز شده

به منظور استفاده از نانوذرات نقره بیوستز شده در بررسی اثرات ضد قارچی، نیاز به تعیین غلظت نانوذرات نقره می‌باشد که نتایج آن در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج با سه بار تکرار و محاسبه انحراف از میانگین ارائه شده است.

جدول ۲ - غلظت نانوذرات بیوستز شده توسط ساکارومیس سروسیه

غلظت نانوذرات نقره بیوستز شده (ppm)	میکروارگانیسم
158/57 ± 0/8	ساکارومیس سروسیه

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 می‌توان اذعان داشت که نانوذرات نقره بیوستز شده دارای پتانسیل بالای اثر ضد قارچی بر علیه کاندیدا آلیکنس می‌باشد که این نکته در مقایسه با داروهای ضد قارچی قابل مقایسه می‌باشد و بین نانوذرات نقره و داروی نیستاتین تفاوت معناداری مشاهده نگردید. اما بین نانوذرات نقره و آمفوتریسین B و ایتراکونازول تفاوت معنی‌دار است. به طور خلاصه می‌توان اینطور نتیجه گرفت که اثرات نانوذرات نقره بیوستز شده مشابه داروهای فعلی مورد استفاده بوده است ($p \leq 0/05$).



شکل ۴- هاله‌های عدم رشد ایجاد شده بر کشت کاندیدا آلیکنس توسط نانوذرات نقره بیوستز شده توسط ساکارومیس سروسیه

جدول ۳- قطر هاله‌های عدم رشد کاندیدا آلیکنس در مقابل نانوذرات نقره بیوستز شده توسط ساکارومیس سروسیه

قطر هاله عدم رشد	Amphotericin B	Itraconazol	Nystatin
mm	قطر هاله عدم رشد	قطر هاله عدم رشد	قطر هاله عدم رشد
	mm	mm	mm
25 ± 0/77	25 ± 0/77	25 ± 0/77	25 ± 0/76

بررسی اثر ضدقارچی نانوذرات نقره بیوستز شده توسط ساکارومیسیس سروسیه

کمترین میزان خلطت کشنده قارچ *کاندیدا الیکس* (MIC) نانوذرات نقره بیوستز شده توسط ساکارومیسیس سروسیه در جدول شماره ۵ نمایش داده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان عنوان کرد که نانوذرات نقره بیوستز شده دارای پتانسیل بالای اثر کشندگی بر علیه *کاندیدا الیکس* می‌باشند که این نکته در مقایسه با داروهای ضد قارچی قابل مقایسه می‌باشد. اثرات نانوذرات نقره با داروی نیستاتین مشابه می‌باشد ($p \leq 0.05$).

کمترین میزان خلطت مهارکننده رشد قارچ *کاندیدا الیکس* (MIC) نانوذرات نقره بیوستز شده توسط ساکارومیسیس سروسیه در جدول شماره ۵ و ۴ نمایش داده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان عنوان کرد که نانوذرات نقره بیوستز شده دارای پتانسیل بالای اثر ضد قارچی بر علیه *کاندیدا الیکس* می‌باشد باز هم بین نانوذرات نقره و داروی نیستاتین تفاوت معناداری مشاهده نگردید اما بین نانوذرات نقره و آمفوتریسین B و ایتراکونازول تفاوت معنی‌دار است. به طور خلاصه می‌توان اینطور نتیجه گرفت که اثرات نانوذرات نقره بیوستز شده مشابه داروهای فعلی مورد استفاده در درمان *کاندیدا الیکس* بوده است ($p \leq 0.05$).

جدول ۴- کمترین میزان خلطت مهارکننده رشد قارچ *کاندیدا الیکس* (MIC) نانوذرات نقره بیوستز شده توسط ساکارومیسیس سروسیه به روش ماکرو دایلوژن

MIC ₅₀	MIC	Amphotericin B	Itraconazol	Nystatin
μg/ml	به روش ماکرو دایلوژن	MIC ₅₀	MIC ₅₀	MIC ₅₀
		μg/ml	μg/ml	μg/ml
<i>کاندیدا الیکس</i>	۲۹ ± ۰.۱۶	۰.۱۶۲ ± ۰.۱۶۸	۰.۱۸۱ ± ۰.۲۲۷	۶۴ ± ۰.۱۶۸

Mean ± S.E

جدول ۵- کمترین میزان خلطت مهارکننده رشد قارچ *کاندیدا الیکس* (MIC) نانوذرات نقره بیوستز شده توسط ساکارومیسیس سروسیه به روش میکرو دایلوژن

MIC ₅₀	MIC	Amphotericin B	Itraconazol	Nystatin
μg/ml	به روش میکرو دایلوژن	MIC ₅₀	MIC ₅₀	MIC ₅₀
		μg/ml	μg/ml	μg/ml
<i>کاندیدا الیکس</i>	۲۷ ± ۰.۲۹	۰.۱۶۰ ± ۰.۱۶۶	۰.۱۸۰ ± ۰.۱۶۲	۶۲ ± ۰.۱۵۶

Mean ± S.E

جدول ۶ - کمترین خلطت کشته بر علیه قارچ کاندیدا آلیکنس (MFC) نانوذرات نقره بیوستتر شده توسط ساکارومیسیس سروسیه

	MFC	Amphotericin B	Itraconazol	Nystatin
	$\mu\text{g/ml}$	MFC	MFC	MFC
		$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
کاندیدا آلیکنس	47 ± 0.238	0.70 ± 0.237	19 ± 0.19	66 ± 0.238
Mean \pm S.E				

بحث

فلزی و شارژ مثبت گروه‌های عامل در آنزیم‌های حاضر در دیواره سلولی میکروارگانیسم ایجاد شود استفاده از آنزیم اختصاصی در سنتز نانوذرات نقره مهم است زیرا باعث می‌شود تا دیگر نیازی به مراحل پایین دستی برای جداسازی نانوذرات نباشد تا به راحتی از آن‌ها در کاتالیز هموزن و کاربردهای دیگر مثل نورشناسی غیر خطی استفاده کرد (۲۴-۱۸ و ۸-۱). این مساله می‌تواند توجیهی در جهت چگونگی بیوستتر نانوذرات نقره توسط ساکارومیسیس سروسیه نیز باشد.

اغلب محققان در بیان روش قطعی مکانیسم تولید نانوذرات در میکروارگانیسم‌ها تلاش زیادی کردند اما هنوز سولات زیادی در این خصوص مطرح است. اما همگی بر این عقیده استوار هستند که در معرض قرار گرفتن یون‌های نقره (Ag^+) با میکروارگانیسم منجر به آزاد سازی آنزیم ردوکتاز و به دنبال آن احیای یون نقره می‌شود، آنزیم مترشحه وابسته به کوفاکتور NADH می‌باشد. طی تحقیقات انجام شده عنوان شده است که نیترات ردوکتاز مسئول احیا یون نقره و به دنبال آن بیوستتر نانوذرات نقره است. میکروارگانیسم‌ها می‌توانند این آنزیم را به صورت داخل یا خارج سلولی داشته باشند (۲۴-۱۸ و ۸-۱). اخیراً کومار^{۴۶} 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. 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 نیز 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. شروع این رخداد و اولین مرحله احیا بیولوژیکی یون‌های فلزی در سطح میکروارگانیسم ایجاد می‌گردد که به علت واکنش الکترواستاتیک بین یون‌های

اولین نشانه‌های بیوستتر نانوذرات نقره، تغییر رنگ ایجاد شده می‌باشد که نیترات نقره یک میلی مولار بی رنگ به قهوه‌ای تبدیل می‌شود. این مساله با نتایج بدست آمده با تحقیقات گذشته کاملاً مطابقت دارد (۴۴-۱۷). در سال ۱۹۰۸ مای^{۴۷} این پدیده را با استفاده از معادلات ماکسون توضیح داد (۸). برانگیختگی پلاسمای سطح به وسیله نور تحت عنوان تشدید پلاسمای سطح^{۴۸} برای سطوح مسطح و یا تشدید پلاسمای سطح جانبی^{۴۹} برای ساختارهای فلزی یا سائز نانو تعریف می‌شود. این پدیده پایه و اساس بسیاری ابزارهای استاندارد برای اندازه گیری جذب در سطوح مسطح مخصوصاً طلا و نقره و یا سطوح فلزی نانوذرات است (۱۶-۹). دومین نشانه اثبات بیوستتر نانوذرات نقره مشاهده قله در محدوده ۴۱۰-۴۵۰ نانومتر می‌باشد. این مساله نیز اینگونه توجیه می‌شود که فلزات به عنوان پلاسما محبوس شده ای از یون‌های مثبت (شامل هسته و الکترون‌های هسته که فیکس شده هستند) و الکترون‌های رسانش (آزاد و متحرک) هستند

⁴⁶ Surface Resonance Plasmon (SRP)

⁴⁸ Localized Surface Plasmon Resonance(LSRP)

⁴⁶ Kumar

⁴⁷ Mie

عامل ترکیبات مختلف مورد استفاده قرار گرفت. در تحقیق انجام شده قله های قوی در ناحیه ۱۳۴۰۰ ایجاد شده که در قبل از بیوستر قله ضعیف دارد و در ضمن قله های جدیدی در ناحیه 1000 cm^{-1} تا 1300 cm^{-1} مشاهده شده است که نشان دهنده این است که گروه عاملی موثر برای بیوستر نانوذرات نقره گروه OH می باشد که نتایج بدست آمده با نتایج سایر مطالعات مطابقت دارد (۴۴-۱۷).

در تحقیقات گذشته توانایی بیوستر 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 (۳۱). ذرات تشکیل دهنده در ابعاد ۲-۵ نانومتر در حضور یون های Ag^+ در فاز لگاریتمی رشد بدست می آید. در تحقیق دیگر می توان به شیرو ساکارومیسیس پومب^{۵۰} اشاره کرد که می تواند نانوذرات سولفید کادمیوم و نقره تولید کند (۲۷). در تحقیق دیگری از ساکارومیسیس بولاردی^{۵۱} در بیوستر نانوذرات نقره استفاده شده است (۲۹ و ۳۰). در پژوهش دیگر توانایی مخمرهای اکستروموفیل اسید دوست در بیوستر نانوذرات نقره اثبات گردید (۳۲).

اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره بسیار مورد بررسی قرار گرفته است اما بیشتر تحقیقات بر اثرات ضد باکتری هاست و تحقیقات محدودتری بر روی اثرات ضد قارچی صورت گرفته است. کاندیل^{۵۲} و همکاران و مونتریو^{۵۳} و همکاران، لی^{۵۴}، کیم^{۵۵} و همکاران، گاجیچی^{۵۶} و همکاران و دوران^{۵۷} و همکاران، شاهی^{۵۸} و همکاران تاثیر ضد قارچی نانوذرات نقره بر کاندیدا البیکنس بررسی کردند، که نتایج حاصل از این تحقیقات با نتایج حاصل از اثر ضدقارچی نانوذرات نقره بیوستر شده توسط ساکارومیسیس سرویسیه بر کاندیدا

در حالت خشی ابر یونی دارای بار مثبت با ابر الکترونی دارای بار منفی با یکدیگر همپوشانی می کنند. با تحریک خارجی مثل تابش نور الکترون ها از وضعیت تعادلشان خارج می شوند. الکترون ها تمایل به 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 پراکنجی با تابش الکترومغناطیس قرار گرفته اند به عنوان پلاسمون شناخته می شود این نوسان ها یک پاند جذبی قوی در ناحیه مرئی طیف الکترومغناطیس می دهد. که به عنوان پاند روزنالس پلاسمونی شناخته می شود. موج الکترومغناطیسی که به سطح فلزات برخورد می کند همق نفوذ کوتاهی دارد بنابراین الکترون ها روی سطح خیلی مهم هستند و نوسان جمعی آن ها به عنوان روزنانس پلاسمون سطحی شناخته می شود. پاند روزنانس پلاسمونی سطحی (SRP) به اندازه و شکل ذرات و ثابت دی الکتریک محیط که ذرات در آن قرار دارند وابسته است. هنگامی که سایز ذرات بین ۲۰-۲ نانومتر باشد SRP افزایش می یابد زیرا دانسیته الکترون های آن ها زیادتر می شود (۴۴-۱۷). در مورد نانوذرات نقره این نقطه SRP در بین ۴۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر می باشد. نتایج حاصله جذب در ناحیه ۲۲۰ را نشان می دهد که با سایر مطالعات مطابقت دارد (۴۴-۱۷).

در تحقیق انجام شده توسط XRD قله هایی در ناحیه ۱۱۱ نشان داده شد که بر طبق مطالعات محققین، نشان دهنده کروی بودن نانوذرات نقره 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 (۴۴-۱۷).

به منظور دستیابی به اینکه گروه های عاملی که بر روی نانوذرات نقره وجود دارند چه گروه هایی هستند از FTIR استفاده شد. به طور کلی FTIR جهت شناسایی گروه های

⁵⁶ Kim⁵⁶ Gajbhiye⁵⁷ Duran⁵⁸ Shahi⁵⁰ *Schizosaccharomyces pombe*⁵¹ *Saccharomyces boulardii*⁵² Kandilo⁵³ Monteiro⁵⁴ Lee

(5) Kenneth, K.Y., Wong, K., Xuelai Liu, X. Silver nanoparticles—the real “silver bullet” in clinical medicine? *J. Med. Chem. Commun.* 2010 ; (1):125-131.

(6) Klaus-Joerger, T., Joerger, R., Olsson, E., Granqvist, C.G. Bacterial as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. *Trends Biotechnol.* 2001; 19(1):15-20.

(7) Mandal, D., Bolander, M.E., Mukhopadhyay, D., Sarkar, G., Mukherjee, P. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Appl Microbial Biotechnol.* 2006; 69(5):485-492.

(8) Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research.* 2008 Mar 1; 10(3):507-17.

(9) Henglein A. Physicochemical properties of small metal particles in solution: microelectrode reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition. *Journal of Physical Chemistry.* 1993; 97(21):5457-71.

(10) Henglein, A. Colloidal Silver Nanoparticles: Photochemical Preparation and Interaction with O₂, CCl₄, and Some Metal Ions. *J. Chem. Mater.* 1998; (10):444-446.

(11) Henglein, A. Reduction of Ag (CN)₂ on Silver and Platinum Colloidal Nanoparticles. *Langmuir.* 2001; (17):2329-2333.

(12) Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E., Granqvist, C. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *PNAS.* 1999; (96): 3611-13614.

(13) Liz-Marzan, L.M., Lado-Tourino, I. Reduction and Stabilization of Silver Nanoparticles in Ethanol by Nonionic Surfactants. *Langmuir.* 1996; (1): 3585-3589.

(14) Pileni, M.P. Fabrication and Physical Properties of Self-Organized Silver Nanocrystals. *Pure Appl. Chem.* 2000; (72):53-65.

(15) Rong, H., Qian, X., Yin, J., Zhu, Z. Preparation of polychrome silver nanoparticles in different solvents. *Journal of Material Chemistry.* 2002; (12): 3783-3786.

(16) Sun YP, Atornigijawat P, Meziani MJ. Preparation of silver nanoparticles via rapid expansion of water in carbon dioxide microemulsion

الیکتریک مطابقت دارد (۴۵-۵۴). مکانیسم احتمالی اثر ضدقارچی نانوذرات نقره، تغییر در نفوذپذیری غشا می‌باشد که نهایتاً باعث مرگ سلول کاندیدا آلیکنس در اثر این تغییر می‌گردد. در پایان می‌توان بیان کرد که ساکارومیسس سروسیه به عنوان یک میکروارگانیسم غیر پاتوژن و ایمن توانایی بسیار مناسبی در بیوسنتز نانوذرات نقره داشته است که این روش ساده، ارزان، غیرسمی است و محصول آن می‌تواند در صنایع مختلف دارویی، غذایی و پزشکی با کمترین عوارض جانبی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

مقاله مذکور استخراج شده از طرح تحقیقاتی با عنوان بررسی امکان بیوسنتز نانوذرات نقره توسط ساکارومیسس سروسیه و خواص ضد میکروبی آن می‌باشد که با حمایت مادی و معنوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی انجام شده است که بدینوسیله از تمامی عزیزان بخصوص معاونت محترم پژوهشی و مدیریت پژوهش دانشکده علوم پایه واحد تهران مرکزی تشکر و قدردانی می‌گردد. نویسندگان همچنین از سرکار خانم مهندس مهسا دمشقیان و جناب آقای مهندس بهرام قبادنیا به دلیل همکاری‌های بی‌دریغشان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع:

(1) Poulouse S, Panda T, Nair PP, Theodore T. Biosynthesis of silver nanoparticles. *Journal of nanoscience and nanotechnology.* 2014 Feb 1; 14(2):2038-49.

(2) Ramya M, Subapriya MS. Green synthesis of silver nanoparticles. *Int J Pharm Med Biol Sci.* 2012; 1(1):54-61.

(3) Kaler A, Patel N, Banerjee UC. Green synthesis of silver nanoparticles. *Curr Res Inf Pharm Sci.* 2010; 11(4):68-71.

(4) Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in colloid and interface science.* 2009 Jan 30; 145(1):83-96.

- models for cell biology research. *Gravitational and Space Research*, 2007; 18(2).
- (28) Gajbhiye, M., Kesharwani, J., Ingle, A., Gade, A., & Rai, M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2009; 5(4), 382-386
- (29) Kaler, Abhishek, Sanyog Jain, and Uttam Chand Banerjee. "Green and rapid synthesis of anticancerous silver nanoparticles by *Saccharomyces boulardii* and insight into mechanism of nanoparticle synthesis." *BioMed research international* 2013; (2013).
- (30) Korbekandi, H., Jouneghani, R. M., Mohseni, S., Pourhossein, M., & Irvani, S. Synthesis of silver nanoparticles using biotransformations by *Saccharomyces boulardii*. *Green Processing and Synthesis*. 2014; 3(4), 271-277.
- (31) Kowshik, M., Ashtaputre, S., Kharrazi, S., Vogel, W., Urban, J., Kulkarni, S. K., & Paknikar, K. M. (2003). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. *Nanotechnology*. 2003;14(1), 95.
- (32) Mourato, A., Gadanho, M., Lino, A. R., & Tenreiro, R. Biosynthesis of crystalline silver and gold nanoparticles by extremophilic yeasts. *Bioinorganic chemistry and applications*, 2011; (2011).
- (33) Sastry, M., Ahmad, A., Khan, M. I., Kumar, R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycetes. *Current Science*. 2003; (85): 162-170.
- (34) Varshney, R., Mishra, A. N., Bhaduria, S., Gaur, M. S. (2009). A Novel Microbial route to synthesize Silver Nanoparticles using fungus *Hormoconis resiniae*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 2009;(4): 349-355.
- (35) Vigneshwaran, N., Astaputra, N. M., Varadarajan, P. V., Nachane, R. P., Paralikar, K. M., Balasubramanya, R. H. (2007). Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Materials Letters*. 2007;(61): 413-418.
- (36) Dubey, Sh. P., Lahtinen, M., Sillanpaa, M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. *Process Biochemistry* 2010;(45):1065-1071.
- (37) Kasthuri, J., Veerapandiran, N. Biological synthesis of silver and gold nanoparticles using apitin as reducing agent. *Colloid and surfaces*. 2009;(68): 55-60.
- into reductant solution. *Langmuir*. 2001 Sep 18;17(19):5707-10.
- (17) Pileni, M.P. Fabrication and Physical Properties of Self-Organized Silver Nanocrystals, *Pure Appl. Chem*. 2000; (72):53-65.
- (18) Nanda A, Saravanan M. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2009 Dec 31;5(4):452-6.
- (19) Shahverdi AR, Minacian S, Shahverdi HR, Jamalifar H, Nohi AA. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of *Enterobacteria*: a novel biological approach. *Process Biochemistry*. 2007 May 31;42(5):919-23.
- (20) Gurunathan S, Kalishwaralal K, Vaidyanathan R, Venkataraman D, Pandian SR, Muniyandi J, Hariharan N, Eom SH. Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009 Nov 1;74(1):328-35.
- (21) Dhoondia, Z. H., Chakraborty, H. *Lactobacillus* Mediated Synthesis of Silver Oxide Nanoparticles. *INTECH* 2012; (2):1-5.
- (22) Mohseniazar, M., Barin, M., Zarredar, H., Alizadeh, S., Shanehbandi, D. Potential of *Microalgae* and *Lactobacilli* in Biosynthesis of Silver Nanoparticles. *J.BioImpact*. 2011; (3):149-152.
- (23) Nithya, R., Ranganathan, R. Synthesis of silver nanoparticles using probiotic microbe and its antibacterial effect against multidrug resistant bacteria. *African journal of biotech*. 2012; (49):11013-11021.
- (24) Saifuddin N, Wong CW, Yasumira AA. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation. *Journal of Chemistry*. 2009;6(1):61-70.
- (25) Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M.I., Kumar, R., Sastry, M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloid surface B:Biointerf* 2003 ; 28(4):313-318.
- (26) Bhainsa, K.C., D'Souza, S. F. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces* 2006; (47): 160-164.
- (27) Forsburg, S. L. The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*:

- against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling*, 2011; 27(7), 711-719.
- (49) Lee J, Lee DG, Kim JG, Kim KJ, Sung WS. The silver nanoparticle (nano-Ag): a new model for antifungal agents. INTECH Open Access Publisher; 2010.
- (50) Kim, K. J., Sung, W. S., Suh, B. K., Moon, S. K., Choi, J. S., Kim, J. G., & Lee, D. G. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals*. 2009; 22(2), 235-242.
- (51) Kandile, N. G., Zaky, H. T., Mohamed, M. L., & Mohamed, H. M. Silver nanoparticles effect on antimicrobial and antifungal activity of new heterocycles. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2010; 31(12), 3530-3538.
- (52) Shahi, S. K., & Patra, M., Microbially synthesized bioactive nanoparticles and their formulation active against human pathogenic fungi. *Reviews on Advanced Materials Science*. 2003; 5, 501-509.
- (53) Gajbhiye, M., Kesharwani, J., Ingle, A., Gade, A., & Rai, M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2009; 5(4), 382-386
- (54) Marambio-Jones C, Hoek EM. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*. 2010 Jun 1; 12(5):1531-51.
- (38) Mie, R., Samsudin, M. W., Din, L. B., Ahmad, A., Ibrahim, N., Adnalizawati, S. N. Synthesis of Silver nanoparticles with antibacterial activity using from the lichen *Parmotrema praesorediosum*. *International journal of Nanomedicine*. 2014; (9):121-127.
- (39) Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research*. 2008 Mar 1; 10(3):507-17.
- (40) Nabikhan, A., Kandasamy, K., Raj, A., Alikumhi, N. M. Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus and leaf extracts from saltmarsh plant, *sesuvium portulacastrum*. *Colloid and surfaces B*. 2010; (79):488-493.
- (41) Prasad, K. S., Pathak, D., Patel, A., Dalwadi, P., Prasad, R., Patel, P., Selvaraj, K. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Nicotiana tobaccum* leaf extract and study of their antibacterial effect. *African Journal of Biotechnology*. 2011; 10(41): 122-8130.
- (42) Satyavani, K., Ramanathan, T., Gurudeeban, S. Green synthesis of silver nanoparticles by using stem derived callus extract of bitter apple (*Citrullus colocynthis*). *Dig J Nanomater Biostruct*. 2011b; (6):1019-1024.
- (43) Satyavani, K., Ramanathan, T., Gurudeeban, S. Plant Mediated Synthesis of Biomedical Silver Nanoparticles by Using Leaf Extract of *Citrullus colocynthis*. *Res J Nanosci Nanotechnol*. 2011a; (1):95-101.
- (44) Vanaja, M., Annadurai, G. *Coleus aromaticus* leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. *Appl Nanosci*. 2013; (3):217-223.
- (45) Forsburg, S. L. The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. *Gravitational and Space Research*, 2007; 18(2).
- (46) Duran, N., Marcato, P. D., De Souza, G. L., Alves, O. L., & Esposito, E. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2007; 3(2), 203-208.
- (47) Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kpuri, J. B., Ramirez, J. T., Yacaman, M. J. The bacterial effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 2006; (16):2346-2353.
- (48) Monteiro, D. R., Gorup, L. F., Silva, S., Negri, M., de Camargo, E. R., Oliveira, R., & Henriques, M. Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect

Antifungal effect of silver nanoparticles biosynthesized by *Saccharomyces cerevisiae* on *Candida albicans*

Behn Omid^{1*}, Mitra Sadat Tabatabaee¹, Kimia Kashani², Yahya Ostadi³

- 1- Department of Biology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran.*
- 2- Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
- 3- Department of Agricultural Economics, Faculty of Agriculture, Payame Noor University, P.O.Box19395-3697, Tehran, Iran.

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 sabrand 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 *Candida albicans* 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 37±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 *Candida albicans*, by using one of the nonpathogenic microorganisms.

Keywords: silver nanoparticles, Biosynthesis, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*.

* omidi9092@yahoo.com