

Biosynthesis of Silver Nanoparticles using Aspergillus Flavus and Investigation of some Effective Factors in its Production

Afsaneh Ghabooli

MSc., Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, ghabooli67@yahoo.com

Mirzaei, Soheila *

Assistant Professor, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, mirzaei_80@yahoo.com

Abstract

Introduction: : Using fungi as sources of enzymes that can catalyze specific reactions conducting to inorganic nanoparticles, is being developed. *Aspergillus flavus* has a great potential in extracellular biosynthesis of silver nanoparticles. Since this fungus can grow on simple media quickly and adequately, it is cheaper to use it in silver nanoparticles biosynthesis than other methods.

Materials and methods: Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles was carried out by adding 1mM silver nitrate to *A. flavus* cell filtrate. Nanoparticles production was confirmed by visual observation of color change in the cell filtrate and UV-vis spectrophotometry. More investigation was conducted using XRD, FTIR and TEM. The stability of nanoparticles and the effect of culture media and silver nitrate concentration on nanoparticles' production were studied too.

Results: The color change of cell filtrate from pale to brown confirmed the extracellular production of silver nanoparticles. The absorption spectra indicated a peak at 420nm attributable to the silver nanoparticles. X-ray diffraction showed crystalline nature of the biosynthesized nanoparticles. Characterization of silver nanoparticles' shape and size using TEM showed that they were spherical and 18.2 nm in diameter. These nanoparticles were stable for 11 months and FTIR demonstrated the presence of proteins as capping agents which lead to their stability. More silver nitrate caused more nanoparticles production and PDB was the best media in this process.

Discussion: Biosynthesized nanoparticles were crystalline in nature, small in size and monodispersed. Besides, they were very stable due to capping by fungal secreted proteins; this stability is reported for the first time in the world. The fungal-mediated green and ecofriendly approach towards the synthesis of nanoparticles can be used as an alternative to the more popular physical and chemical methods for the synthesis of nanoparticles.

Key words: Biosynthesis, Silver Nanoparticles, *Aspergillus Flavus*

* Corresponding author,

Received: September 25, 2017 / **Accepted:** December 30, 2017

تولید زیستی نانوذرات نقره با استفاده از قارچ *Aspergillus flavus* و بررسی برخی عوامل مؤثر بر آن

افسانه قبولی: کارشناس ارشد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، ghabooli67@yahoo.com
سهیلا میرزایی*: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، mirzaei_80@yahoo.com

چکیده

مقدمه: قارچ‌ها، منابع آنزیمی برای کاتالیز واکنش‌های ویژه‌ای هستند که به ساخت نانوذرات غیرآلی منجر می‌شوند و استفاده از قارچ‌ها در حال توسعه است. قارچ *Aspergillus flavus* Link پتانسیل زیادی برای سنتز خارج سلولی نانوذرات نقره دارد و به علت رشد سریعی که این قارچ در محیط ساده دارد، استفاده از آن در مقایسه با سایر روش‌ها بسیار ارزان است.

مواد و روش‌ها: تولید نانوذرات نقره با افزودن نیترات نقره ۱ میلی مولار به عصاره سلولی قارچ *A. flavus* انجام شد. وجود نانوذرات به‌طور چشمی و با توجه به تغییر رنگ عصاره و طیف‌سنجی نور فرابنفش - مرئی تأیید شد. بررسی‌های بیشتر با روش‌های XRD، FTIR و TEM انجام شدند. پایداری نانوذرات بیوسنتز شده و اثر محیط کشت و غلظت نیترات نقره روی تولید نانوذرات نیز بررسی شد.

نتایج: رنگ عصاره سلولی قارچ از بیرنگ به قهوه‌ای تغییر یافت که تولید خارج سلولی نانوذرات نقره را نشان می‌دهد. داده‌های طیف‌سنجی، وجود پیک در ۴۲۰ نانومتر را نشان دادند که ویژه نانوذرات نقره است. طیف حاصل از پراش اشعه ایکس نیز ماهیت کریستالی نانوذرات تولید شده را نشان داد. بررسی شکل و اندازه نانوذرات با TEM مشخص کرد نانوذرات نقره تولید شده کروی شکل و پراکنده هستند و میانگین اندازه آنها ۱۸/۲ نانومتر است. نانوذرات نقره حاصل تا ۱۱ ماه پایداری نشان دادند و تجزیه و تحلیل FTIR، حضور پروتئین‌ها را، عامل پایدارکننده‌ای نشان داد که نانوذرات نقره را احاطه می‌کند. محیط سیب‌زمینی دکستروز (PDB) کارایی زیادی در تولید نانوذرات نقره داشت و میزان بیوسنتز با افزایش غلظت نیترات نقره افزایش یافت.

بحث و نتیجه‌گیری: نانوذرات حاصل در پژوهش حاضر علاوه بر ماهیت کریستالی، اندازه به نسبت کوچک و یکنواختی زیادی که داشتند به علت پوشش یافتن با پروتئین‌های ترشح شده از قارچ به شدت پایدار بودند. این میزان پایداری تاکنون گزارش نشده است و این امکان وجود دارد که روش یاد شده به عنوان روشی زیست‌سازگار و سبز جایگزین روش‌های فیزیکی و شیمیایی معمول شود.

واژه‌های کلیدی: بیوسنتز، نانوذرات نقره، *Aspergillus flavus*

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

نخستین بار در سال ۱۹۷۴، Norio Taniguchi از دانشگاه توکیو واژه نانو فناوری را عمل تولید موادی با اندازه ۱ تا ۱۰۰ نانومتر تعریف کرد. نانو فناوری، علمی بین رشته‌ای و شامل جنبه‌های مختلف پژوهش و توسعه فناوری در بسیاری از زمینه‌های فیزیک، شیمی و زیست‌شناسی است (۱ و ۲). ساخت نانوذرات با ترکیبات شیمیایی متفاوت، اشکال مختلف و پراکندگی کنترل شده یکی از جنبه‌های مهم پژوهش در زمینه نانو فناوری است؛ در واقع نیاز به کنترل شکل نانوذرات، استفاده از روش‌های جدید را مطرح می‌کند (۳).

باتوجه به اهمیت نانومواد در فناوری آینده، بسیاری از کشورها هزینه زیادی را صرف پژوهش در زمینه نانو فناوری کرده‌اند (۳) و در سال‌های اخیر، روش‌های بسیاری از جمله روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی برای سنتز نانوذرات طراحی شده‌اند (۴-۶). روش‌های فیزیکی و شیمیایی شامل استفاده از عوامل احیا کننده قوی مانند بروهیدرادیسم^۱ و عوامل احیا کننده ضعیف مانند سترات سدیم^۲ و الکل‌ها و استفاده از اشعه UV هستند (۷) که عموماً انرژی زیادی مصرف می‌کنند تا فشار و دمای زیاد لازم برای انجام آنها فراهم شود. همچنین در این روش‌ها از مواد سمی استفاده می‌شود که بقایای آنها در طبیعت بسیار خطرناک هستند و احتمالاً طی تولید نانوذرات وارد محیط می‌شوند. افزایش آگاهی درباره این آلودگی‌ها، توجه به روش‌های جدید ساخت نانوذرات با استفاده از ریز موجودات را اجتناب ناپذیر کرده است (۸). استفاده از عوامل بیولوژیک، ارزان‌تر و سازگارتر با طبیعت است. تاکنون ساخت نانوذرات با استفاده از باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و گیاهان ثابت شده است (۹-۱۲).

قارچ‌ها از جمله عوامل زیستی هستند که در تولید نانوذرات فلزی به آنها توجه شده است. توانایی قارچ‌ها در تولید مقادیر فراوان پروتئین و هیدرولیز یون‌های فلزی به تولید توده درخور توجهی از نانوذرات منجر می‌شود. علاوه بر این، جداسازی و کشت قارچ‌ها آسان است و فرایندهای پایین دست و دست‌ورزی زیست توده قارچی پیچیدگی کمتری نسبت به روش‌های مصنوعی دارند (۱۳).

زمان حداقل، کوچکی اندازه و خطرناک نبودن فرایند از شاخص‌های کلیدی پذیرش هر نوع فناوری است و تولید نانوذرات نقره که برخی قارچ‌ها انجام می‌دهند، تمام ویژگی‌های یادشده را دارد (۱۴). فرایندی که قارچ‌ها، نانوذرات فلزی را سنتز می‌کنند، میکوفابریکشن^۳ گفته می‌شود (۱۵). در سال‌های اخیر، سیستم‌های قارچی با عنوان کارخانه‌های زیستی^۴ شناخته شده‌اند که نانوذرات نقره، طلا، پلاتینیوم و سولفید کادمیوم تولید می‌کنند (۱۵). قارچ‌ها، یون‌های فلزی را با سازوکارهای فیزیکوشیمیایی و زیستی شامل اتصال خارج سلولی به متابولیت‌ها و پلیمرها، اتصال به پلی‌پتیدهای ویژه و تجمع وابسته به متابولیسم در خود جمع می‌کنند (۱۶)؛ از این رو، برخلاف باکتری‌ها به مرحله اضافه برای استخراج نانوذرات از عصاره فلوئیدی نیازی نیست. قارچ‌ها در مقایسه با باکتری‌ها و اکتینومیست‌ها، منابع درخور توجهی برای ترشح پروتئین هستند که به عملکرد بهتر نانوذرات منجر می‌شود (۳). باتوجه به ویژگی‌های یادشده، قارچ‌ها به‌طور وسیعی برای بیوسنتز سریع و زیست‌ایمن نانوذرات فلزی استفاده می‌شوند. در مطالعه حاضر، قارچ *Aspergillus flavus* برای تولید خارج سلولی نانوذرات نقره استفاده و سعی شد برخی عوامل اثرگذار روی تولید نانوذرات بهینه‌سازی شوند.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه قارچی: در پژوهش حاضر، ۲۰ جدایه خالص قارچ *A. flavus* استفاده شدند که شناسایی آنها به روش مولکولی تأیید شده بود. جدایه‌های قارچی از دانشگاه ولی عصر رفسنجان تهیه شدند.

تولید نانوذرات نقره: به منظور تهیه زیست‌توده لازم برای تولید نانوذرات نقره، از محیط کشت مایع سیب‌زمینی دکستروز (PDB^۵) سترون استفاده شد. محیط با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱/۵ اتمسفر و مدت ۱۵ دقیقه سترون شد. جدایه‌های قارچی در محیط یادشده کشت شدند و ارلن‌های حاوی قارچ در شیکرانکوباتور با دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. پس از گذشت هفت روز، توده‌های میسلیمی جدا و با آب مقطر استریل شسته شدند تا بقایای محیط کشت از آنها پاک شود. سپس ۱۰ گرم از زیست‌توده حاصل به ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر استریل افزوده شد و سه روز در همان شرایط قرار داده شدند. پس از گذشت مدت زمان لازم، عصاره قارچی به کمک کاغذ صافی واتمن شماره ۱ تهیه شد. محلول نیترات نقره به نیمی از عصاره حاصل افزوده شد تا غلظت نهایی به ۱ میلی‌مولار برسد (نمونه تیمار) و باقیمانده عصاره (بدون افزودن نیترات نقره) نمونه شاهد در نظر گرفته شد. از آنجا که این واکنش به نور حساس است، ارلن‌ها در شرایط تاریکی قرار گرفتند.

ارزیابی نانوذرات تولیدشده: ابتدا تولید نانوذرات به‌طور چشمی و بر اساس تغییر رنگ مخلوط واکنش بررسی شد. پس از مشاهده تغییر رنگ که نخستین نشانه تشکیل نانوذرات است، از طیف‌سنجی نور مرئی-

فرانکفیش^۶ برای اثبات تولید نانوذرات استفاده شد. مقداری از نمونه در فاصله‌های زمانی معین (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از شروع واکنش) برداشته و جذب آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Vis (مدل Varian Caryconc 100) با دقت ۱ نانومتر و محدوده ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد تا از ایجاد نانوذرات اطمینان حاصل و میزان افزایش یا کاهش جذب و پایداری آنها بررسی شود. سپس عصاره‌های قارچی تغییر رنگ یافته به مدت ۶ تا ۷ روز در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا پودر لازم برای تجزیه و تحلیل XRD^۷، TEM^۸ و FTIR^۹ حاصل شود.

برای تعیین ماهیت نانوذرات نقره تولیدشده از روش پراش اشعه ایکس (XRD) (دستگاه مدل APD2000 ساخت شرکت ITAL STRUCTURE) استفاده و الگوی XRD بین زوایای ۲θ از ۳۰ تا ۹۰ درجه بررسی شد. برای تعیین شکل نانوذرات نقره تولیدشده و تعیین میانگین اندازه آنها از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) (مدل CM 120 ساخت شرکت Philips) استفاده شد. برای این امر، پودر حاصل از عصاره‌های قارچی به مؤسسه تحقیقاتی پرتاووس مشهد فرستاده شد و تصاویر دریافتی با نرم‌افزار Digimizer (version 4.6.1) بررسی شدند و اندازه نانوذرات محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل FTIR با دستگاه طیف‌سنج مدل PerkinElmer Spectrum انجام شد. نمونه‌ها در محدوده عدد موج $4000-550\text{ cm}^{-1}$ بررسی شدند. مشخص کردن برهمکنش نانوذرات با پروتئین قارچی و نقش این پروتئین‌ها به عنوان عوامل پایدارکننده‌ای که نانوذرات نقره را احاطه می‌کنند، هدف روش یادشده است.

انکوباتور نگهداری شدند و نانوذرات سنتز شده پس از گذشت ۸ تا ۱۱ ماه با اسپکتروفتومتر UV-Vis بررسی شدند.

نتایج

برای انتخاب بهترین جدایه قارچ *A. flavus*، بررسی مقدماتی تولید نانوذرات نقره با مشاهده تغییر رنگ مخلوط‌های واکنش انجام شد. تغییر رنگ، نخستین نشانه تشکیل نانوذرات نقره است که در بیشتر تیمارهای قارچی مشاهده شد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند)، اما شدت تغییر رنگ در آنها متفاوت بود و توانایی متفاوت جدایه‌های یاد شده را نشان می‌دهد. تمام نمونه‌ها برای اطمینان از احیای یون‌های نقره با اسپکتروفتومتر UV-Vis بررسی شدند (نتایج نشان داده نشده‌اند). عصاره سلولی برخی جدایه‌های قارچی تیمار شده با نیترات نقره (۱ میلی‌مولار)، پیک مشخصی با جذب زیاد در ۴۲۰ نانومتر نشان دادند که ویژه نانوذرات نقره است. در این طول موج، میزان جذب در جدایه‌هایی بیشتر بود که تغییر رنگ واضح داشتند و در نمونه‌های دارای تغییر رنگ کمتر، پیک نمودار کوتاه‌تر بود.

چهار جدایه که جذب زیادی داشتند، با ترکیب دوتایی در محیط مایع کشت شدند تا میزان تولید نانوذرات آنها در این حالت نسبت به حالت تکی هر کدام سنجیده شود. به این منظور، جدایه‌های A8-2، A15-2، A83 و A87 با هم و به‌طور جداگانه کشت شدند. نتایج نشان دادند در تمام نمونه‌ها، جدایه‌های *A. flavus* توانایی بیوسنتز نانوذرات نقره را دارند (شکل ۱)، اما جدایه A8-2 در حالت تکی قابلیت بیشتری در این زمینه دارد؛ بنابراین، جدایه برتر انتخاب و آزمایش‌های تکمیلی روی آن انجام شد.

انتخاب جدایه برتر: پس از مقایسه نتایج تغییر رنگ و داده‌های طیف‌سنجی، چهار جدایه A8-2، A15-2، A83 و A87 که بهترین نتایج را در مشاهده‌های چشمی و تجزیه و تحلیل‌های طیف‌سنجی داشتند، انتخاب و بررسی‌های بیشتر روی آنها انجام شدند تا بهترین جدایه انتخاب شود. علاوه بر ارزیابی هریک از چهار جدایه یاد شده به‌تنهایی، از ترکیب جدایه‌های A8-2 و A15-2 و جدایه‌های A83 و A87 با هم نیز استفاده شد. این آزمایش برای بررسی توانایی جدایه‌ها به شکل ترکیبی نسبت به حالت کشت منفرد انجام شد. در نهایت جدایه A8-2، جدایه برتر انتخاب و برای تولید نانوذرات نقره استفاده شد.

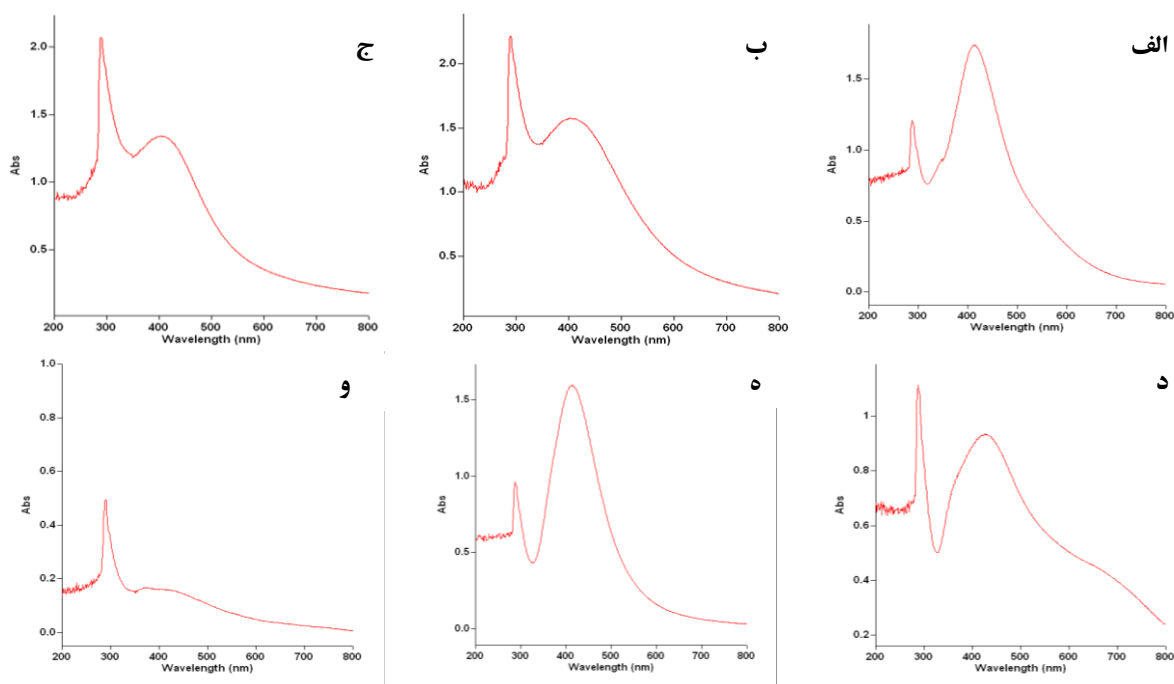
بررسی برخی عوامل مؤثر در بیوسنتز نانوذرات

بررسی اثر نوع محیط کشت: برای این منظور از سه محیط کشت مایع سیب‌زمینی دکستروز، مالت‌پیتون و محیط ترکیبی سترون استفاده شد. محیط ترکیبی شامل ۰/۷ گرم KH_2PO_4 ، ۰/۲ گرم K_2HPO_4 ، ۰/۱ گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۱ گرم $(\text{Na}_4)_2\text{SO}_4$ ، ۰/۰۶ گرم عصاره مخمر و ۱ گرم گلوکز به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر بود.

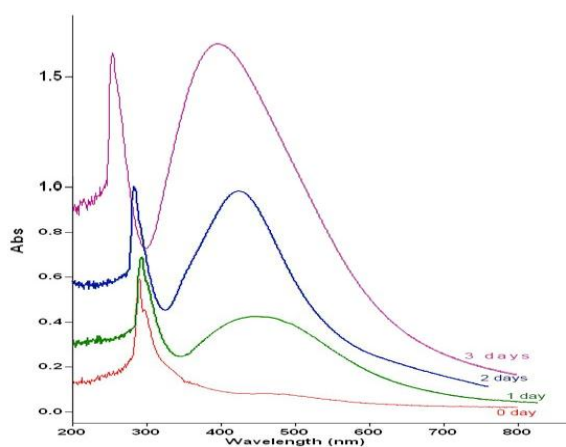
بررسی اثر غلظت نیترات نقره: غلظت نیترات نقره از عوامل مهم و کلیدی در بیوسنتز نانوذرات نقره است. برای بررسی اثر میزان غلظت نیترات نقره بر بیوسنتز نانوذرات نقره، سه غلظت x ، $2x$ و $x/2$ روی محیط‌های یاد شده آزمایش شدند. در غلظت x ، غلظت نهایی مخلوط واکنش ۱ میلی‌مولار در نظر گرفته شد.

بررسی پایداری نانوذرات تولیدی: در بیوسنتز

نانوذرات، تولید و پایداری آنها اهمیت ویژه‌ای دارد. پایداری نانوذرات تولید شده با اندازه‌گیری میزان جذب طی ماه‌های نگهداری بررسی شد. به این منظور، محلول‌های واکنش در شرایط تاریکی و روشنایی در



شکل ۱- طیف‌های UV-Vis ثبت شده برای واکنش عصاره سلولی کشت‌های دو گانه و تکی جدایه‌های برتر قارچ *Aspergillus flavus* با محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار، الف. A8-2، ب. A15-2، ج. A83، د. A87، ه. A8-2 + A15-2، و. A83 + A87



شکل ۳- طیف‌های UV-Vis ثبت شده در زمان‌های مختلف برای واکنش عصاره سلولی قارچ *Aspergillus flavus* (جدایه A8-2) با محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار

XRD: الگوی XRD حاصل تأیید کرد نانوذرات نقره تشکیل شده به شکل نانو کریستال‌های نقره هستند. الگوی XRD سه پیک در محدوده‌های 38.143° ، 64.493° ، 77.270° درجه نشان داد (شکل ۴) که با پیک‌های مربوط به نقره مطابقت داشتند (۱۷).

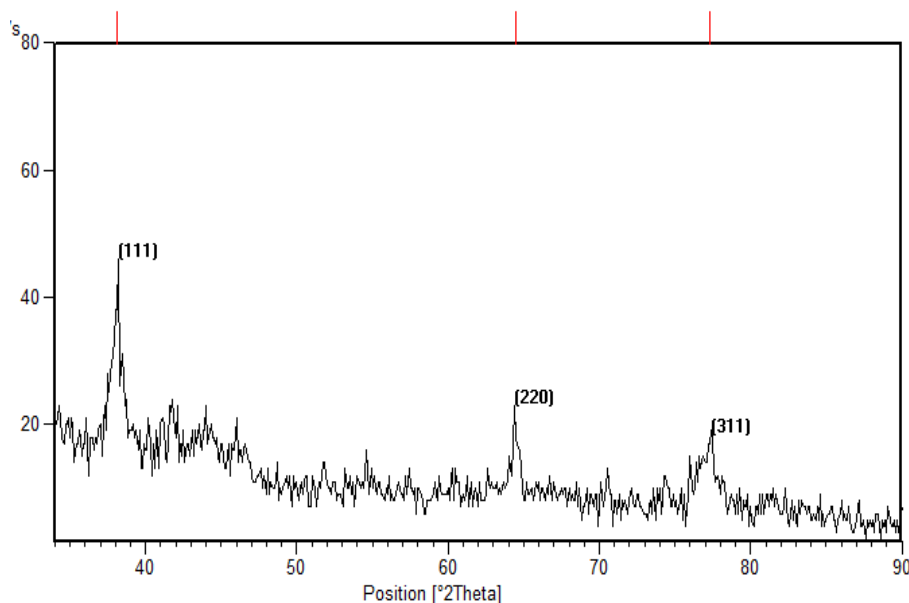
در جدایه A8-2، رنگ مخلوط واکنش پس از تیمار با محلول ۱ میلی مولار نیترات نقره به تدریج از بیرنگ به قهوه‌ای و در نهایت قهوه‌ای تیره تغییر کرد (شکل ۲). طیف‌سنجی در فاصله‌های زمانی معین (شکل ۳) نشان داد با افزایش دوره انکوباسیون، میزان جذب در 420 nm نانومتر افزایش می‌یابد. پس از اطمینان یافتن از وجود نانوذرات نقره، پودری از عصاره قارچی تهیه و در آزمایش‌های XRD، TEM و FTIR استفاده شد.



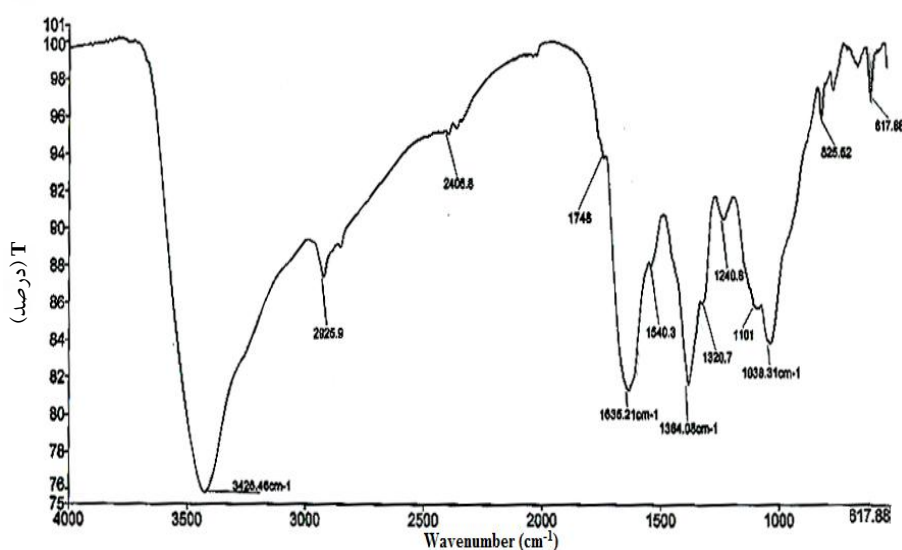
شکل ۲- عصاره سلولی قارچ *Aspergillus flavus* (جدایه A8-2). الف.: بدون نیترات نقره، ب. در حضور نیترات نقره پس از ۲۴ ساعت، ج. در حضور نیترات نقره پس از ۴۸ ساعت

FTIR: پایداری و پراکندگی مناسب نانوذرات به برهمکنش آنها با پروتئین‌های قارچی نسبت داده می‌شود. به نظر می‌رسد عامل پوششی، پروتئین‌هایی باشند که قارچ *A. flavus* ترشح کرده است. طی فرایند تولید نانوذرات، پروتئین‌ها احتمالاً پوششی روی نانوذرات تشکیل می‌دهند و با جلوگیری از تراکم ذرات

موجب پایداری آنها می‌شوند. نمودار حاصل در پژوهش حاضر، ۱۲ پیک در محدوده‌های ۶۱۷/۸۸، ۸۲۵/۵۲، ۱۰۳۸/۳۱، ۱۱۰۱، ۱۲۴۰/۸، ۱۳۲۰/۷، ۱۳۸۴/۰۸، ۱۵۴۰/۳، ۱۶۳۵/۲۱، ۲۴۰۶/۸، ۲۹۲۵/۹ و $3426/46 \text{ cm}^{-1}$ نشان داد (شکل ۵).



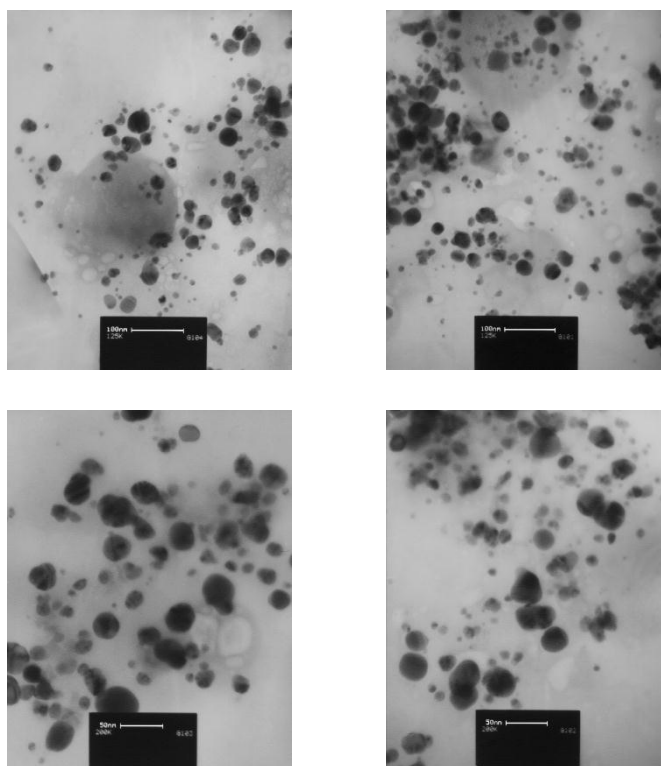
شکل ۴- طیف پراش اشعه X نانوذرات سنتز شده توسط قارچ *Aspergillus flavus* (A8-2)



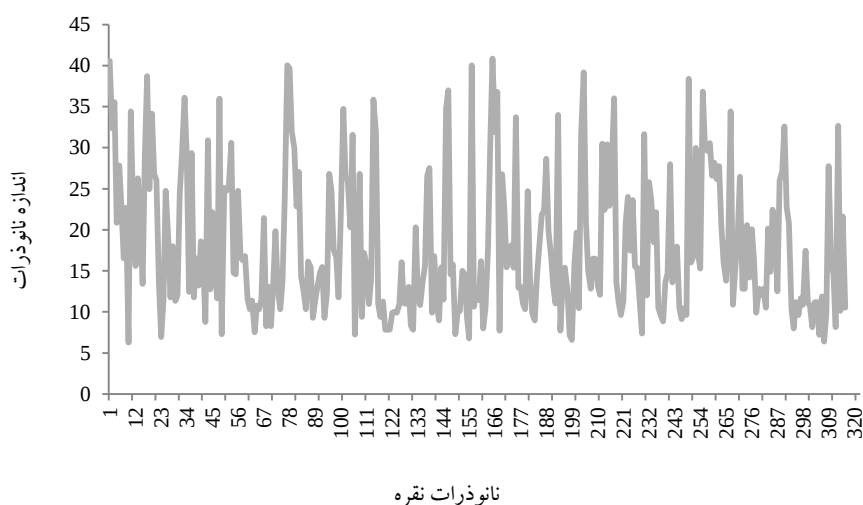
شکل ۵- طیف‌های FTIR ثبت شده از پودر نانوذرات نقره سنتز شده توسط قارچ *Aspergillus flavus* (جدایه A8-2)

نانومتر قرار دارند (شکل‌های ۶ و ۷). اندازه متوسط ذرات ۱۸/۲ نانومتر بود که تقریباً با مقدار محاسبه شده از XRD یکسان است.

TEM: مطالعه‌های بیشتر برای تعیین شکل و اندازه نانوذرات با TEM انجام شد. تصاویر به‌خوبی نشان دادند بیشتر نانوذرات نقره تقریباً کروی و در محدوده ۶ تا ۴۵ نانومتر هستند و ۵۹ درصد آنها در محدوده ۱۳ تا ۳۶



شکل ۶- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوذرات سنتز شده توسط قارچ *Aspergillus flavus* (جدایه A8-2)



شکل ۷- توزیع اندازه نانوذرات نقره تولیدی توسط *Aspergillus flavus* (جدایه A8-2)

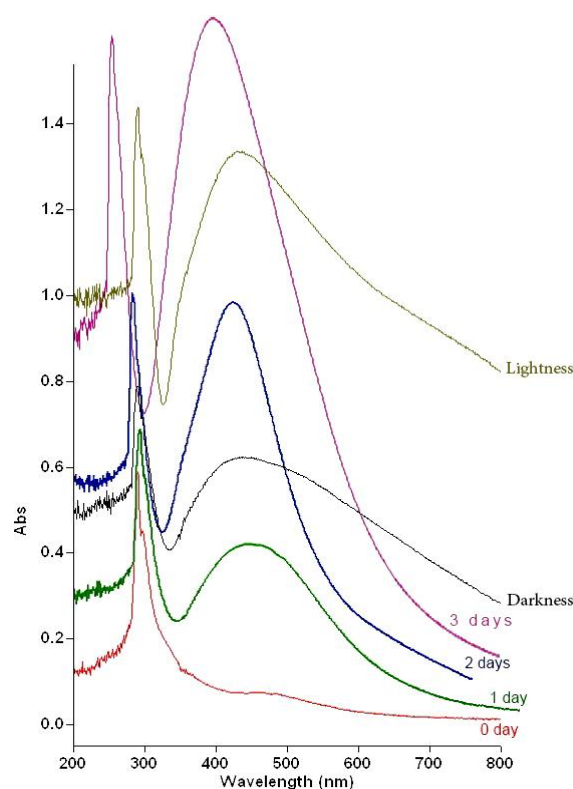
بررسی عوامل مؤثر بر تولید نانوذرات نقره در قارچ

A. flavus بهینه کردن شرایط تولید نانوذرات از جمله عواملی است که واکنش را اقتصادی‌تر و مؤثرتر می‌کند و محیط کشت قارچ و غلظت نیترات نقره دو رکن اساسی در این زمینه هستند. به منظور بررسی اثر عوامل یادشده، تولید نانوذرات نقره با تغییر غلظت یون‌های Ag^+ و استفاده از محیط‌های مختلف انجام شد. جدایه A8-2 در سه محیط مایع سیب‌زمینی دکستروز، مالت پیتون و محیط ترکیبی در سه تکرار کشت داده شد و به هر تکرار، غلظت‌های مختلف $2x$ (۱ میلی‌مولار)، x و $x/2$ نیترات نقره افزوده شدند. مقایسه ظاهری میزان رشد در محیط‌های مختلف نشان داد قارچ در محیط ترکیبی رشد مناسبی ندارد و میزان زیست‌توده تولیدی آن بسیار کم است. احتمالاً این امر موجب می‌شود قارچ، میزان کافی آنزیم و پروتئین ترشح نکند و در نتیجه، تغییر رنگ این گروه بسیار اندک بود (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). این کاهش شدت رنگ در غلظت $x/2$ محسوس‌تر بود. اگرچه میزان رشد در دو محیط مالت پیتون و سیب‌زمینی دکستروز تقریباً مشابه بود، سرعت تشکیل نانوذرات در محیط PDB بیشتر بود. شدت تغییر رنگ مخلوط واکنش در غلظت $2x$ بیشتر از سایر غلظت‌ها بود. نتایج طیف‌سنجی فرابنفش - مرئی در زمان‌های مختلف، نتایج یادشده را تأیید کردند (شکل ۹)؛ بنابراین بر اساس مشاهده‌ها و نتایج، بیشترین میزان تولید نانوذرات نقره در محیط PDB و غلظت $2x$ اتفاق افتاد.

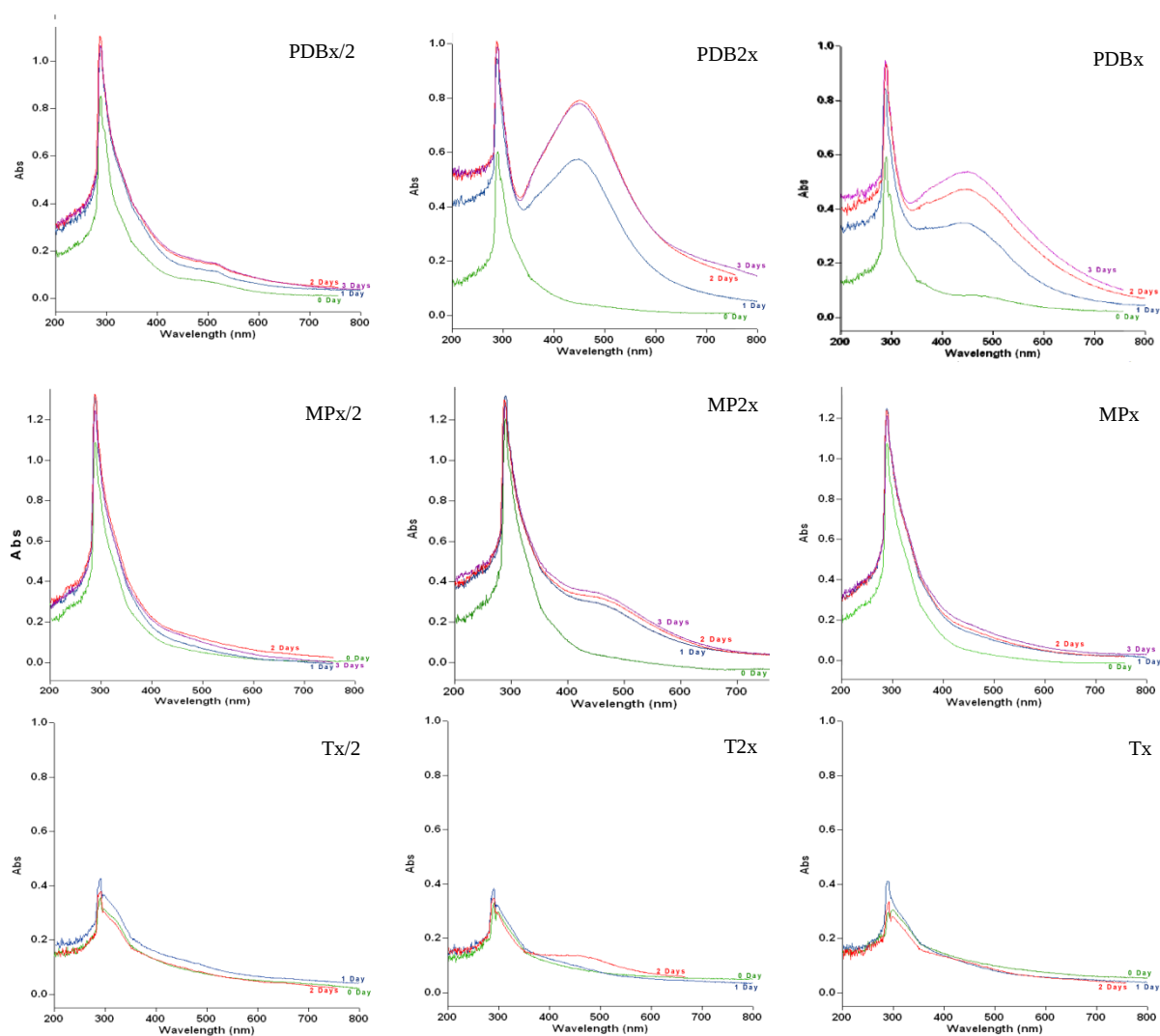
در این آزمایش، نمونه‌ها پس از تولید در دمای $34^\circ C$ درجه سانتی‌گراد (دمای تولید) نگهداری شدند. طیف‌های اسپکتروفتومتر پس از ۸ ماه نشان دادند با وجود نگهداری نانوذرات در همان دمای که تولید شده بودند، کاهش جذب و در نتیجه ناپایداری دیده می‌شود (شکل ۱۰).

پایداری نانوذرات نقره تولیدشده: نانوذرات موجود

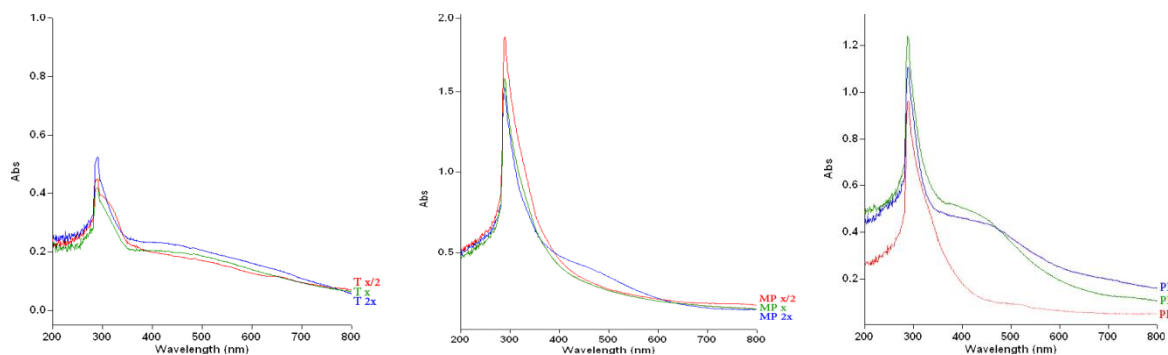
در محیط آبی، دمای $25^\circ C$ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی و روشنایی نگهداری و در فاصله‌های زمانی مختلف بررسی شدند. ۱۱ ماه پس از شروع واکنش، هیچ رسوبی در محلول مشاهده نشد که شواهدی بر پایداری نانوذرات نقره است. طیف‌های حاصل از اسپکتروفتومتر (شکل ۸) نیز این مطلب را تأیید و مشخص کردند نانوذرات بسیار پایدارند و جذب زیادی در 420 نانومتر نشان می‌دهند. همانگونه که در شکل نیز مشخص است نگهداری نانوذرات مدنظر در تاریکی به کاهش مقدار نانوذرات منجر نشد و میزان آنها با گذشت زمان افزایش یافت.



شکل ۸- طیف‌های UV-Vis ثبت شده برای واکنش عصاره سلولی قارچ *Aspergillus flavus* (جدایه A8-2) با محلول نیترات نقره طی سه روز اول تولید و ۱۱ ماه پس از شروع واکنش در نمونه نگهداری شده در شرایط تاریکی (۷ برابر رقیق شده) و روشنایی



شکل ۹- طیف‌های UV-Vis ثبت شده در زمان‌های مختلف برای واکنش عصاره سلولی قارچ *Aspergillus flavus* (جدایه A8-2) در محیط کشت‌ها و غلظت‌های مختلف نیترات نقره. PDB: محیط سیب‌زمینی دکستروز، MP: محیط مالت پپتون، T: محیط ترکیبی، X: غلظت ۱ میلی مولار نیترات نقره



شکل ۱۰- طیف‌های UV-Vis ثبت شده برای واکنش عصاره سلولی قارچ *Aspergillus flavus* (جدایه A8-2) کشت شده در محیط‌های مختلف با محلول نیترات نقره پس از گذشت ۸ ماه. PDB: محیط سیب‌زمینی دکستروز، MP: محیط مالت پپتون، T: محیط ترکیبی، X: غلظت ۱ میلی مولار نیترات نقره

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از اهداف مهم نانوفناوری، توسعه روش‌های ایمن، سازگار با محیط‌زیست و کم‌هزینه برای تولید نانوذرات است. در مطالعه‌های بسیاری، قارچ *Aspergillus* پتانسیل زیادی برای تولید نانوذرات نشان داده است (۱۸-۲۷)؛ از این رو در پژوهش حاضر، از گونه *A. flavus* برای تولید نانوذرات نقره استفاده شد و با افزودن نیتрат نقره به عصاره قارچی، رنگ آن به قهوه‌ای تغییر کرد. ظهور رنگ قهوه‌ای نشان‌دهنده تشکیل ذرات نقره کلئیدی در محیط است و این تغییرات، القای رزونانس پلاسمون سطحی در نانوذرات فلزی را نشان می‌دهند. شکل و اندازه نانوذرات تولیدشده بر رزونانس پلاسمون سطحی تأثیر می‌گذارند (۲۸ و ۲۹). همچنین تغییر رنگ عصاره قارچی، تولید خارج سلولی نانوذرات نقره را نشان می‌دهد. اگرچه تولید داخل سلولی نانوذرات به ایجاد ذراتی با اندازه کوچک‌تر منجر می‌شود، مزیت تولید خارج سلولی این است که به مرحله اضافه برای آزاد کردن نانوذرات از بیومس با تیمار فراصوتی یا واکنش با مواد شوینده مناسب نیاز ندارد.

نتایج طیف‌سنجی نشان دادند شدت جذب با گذشت زمان افزایش می‌یابد و این امر ناشی از افزایش مقدار نانوذرات تشکیل شده است. یک باند جذبی در طول موج ۲۹۰ نانومتر مشاهده شد که به علت برانگیختگی الکترونی تریپتوفان و تیروزین آزاد در پروتئین‌ها به وجود می‌آید (۳۰). این مشاهده نشان می‌دهد قارچ، پروتئین‌ها را آزاد می‌کند و همچنین سازوکاری احتمالی برای احیای یون‌های فلزی موجود در محلول پیشنهاد می‌کند (۳۱-۳۳). هرچند سازوکار دقیق سنتز نانوذرات با استفاده از قارچ‌ها کاملاً روشن نشده است، به نظر می‌رسد آنزیم نیترات‌ردوکتاز وابسته به NADH در این

فرایند درگیر باشد (۳۱).

پایداری نانوذرات بیوسنتز شده، اهمیت ویژه‌ای دارد. نتایج FTIR، حضور پروتئین‌ها را عاملی پوششی اثبات کردند که سبب پایداری نانوذرات می‌شود. طیف‌های حاصل، حضور گروه‌های کاربردی مختلف مانند باندهای O-H کششی، پیوندهای آمیدی، ارتعاشات کششی -N-H، C-O و C-OH را نشان دادند. کومار^۱ و همکاران (۲۲) بر اساس نتایج FTIR اشاره کردند نانوذرات نقره در محلول با عاملی پوششی پایدار شده‌اند که احتمالاً پروتئین‌هایی هستند که قارچ ترشح می‌کند. در پژوهش حاضر، بیشترین جذب در محدوده cm^{-1} ۳۴۲۶^۱ مشاهده شد که به باندهای جذبی وابسته به O-H کششی حاصل از گروه‌های کربوکسیلیک‌اسید اختصاص دارد (۲۹ و ۳۴). پیک در cm^{-1} ۲۹۲۵/۹ به پیوندهای C-H کششی متقارن و غیرمتقارن مربوط به حالت‌های آلیفاتیک اشاره دارد و مشابه کار سانقی و ورما (۳۵) است. وجود باند در محدوده cm^{-1} ۲۴۰۱ به پیوند O-H کششی مربوط است (۲۹) و پیک حاصل در cm^{-1} ۲۴۰۶/۸ به آن شباهت دارد. طیف در cm^{-1} ۱۶۳۵/۲۱ به باند ارتعاشی آمید I و II از باندهای پروتئین مربوط می‌شود و این باندها با نتایج پژوهش کومار و همکاران (۲۲) مطابقت دارند. بر اساس یافته‌های باساواراجا و همکاران (۳۶) باند در cm^{-1} ۱۵۴۰ به آمید II اختصاص دارد که به علت کشش کربونیل و ارتعاشات کششی -N-H پیوندهای آمیدی پروتئین‌ها به وجود می‌آید. این گروه‌های آمیدی و پیوندهای پپتیدی پروتئین‌ها، توانایی باندشدن با فلز را دارند و به جلوگیری از تراکم نانوذرات کمک می‌کنند؛ در مطالعه حاضر نیز باند مشابهی دیده شد. طیف در محدوده cm^{-1} ۱۳۹۰-۱۳۵۰ به باقیمانده‌های نیترات در محلول مربوط است (۳۴)

قارچی مسئول این پایداری باشند (۴۱). پاتیل^{۱۳} و همکاران (۲۵) نیز قارچ یادشده را برای تولید نانوذرات نقره استفاده کردند.

شناخت ماهیت دقیق ذرات نقره تشکیل شده اهمیت ویژه‌ای دارد و با اندازه‌گیری طیف پراش اشعه ایکس نمونه‌ها حاصل می‌شود. الگوی XRD تأیید کرد نانوذرات نقره تشکیل شده به شکل نانوکریستال‌های نقره هستند. بینوپریا^{۱۴} و همکاران (۴۲) نیز تشکیل نانوکریستال‌های نقره را در *Aspergillus oryzae* var. *viridis* گزارش کرده‌اند. شکل، پراکندگی و تراکم نداشتن نانوذرات از معیارهای مهم در تولید آنها هستند. بر اساس نتایج تصاویر TEM، نانوذرات به‌خوبی از یکدیگر جدا شده و بیشتر به شکل تقریباً کروی با متوسط اندازه ۱۸/۲ نانومتر بودند که تقریباً با مقدار محاسبه‌شده از طریق XRD یکسان است.

بررسی اثر محیط کشت و غلظت نیترات نقره در تولید نانوذرات نشان داد محیط PDB کارایی زیادی در تولید نانوذرات دارد و میزان تولید نانوذرات با افزایش غلظت نیترات نقره افزایش می‌یابد. کربکندی^{۱۵} و همکاران (۴۳) نیز حداکثر غلظت پیش‌ماده برای تولید نانوذرات را در قارچ *Fusarium oxysporum* مطالعه کردند و نتیجه گرفتند با افزایش تدریجی غلظت نیترات نقره تا ۵ میلی‌مولار، احیای نانوذرات افزایش می‌یابد. نگهداری نانوذرات تولیدشده در محیط و غلظت‌های مختلف نیترات نقره در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد نشان داد این ذرات پایداری کمی دارند؛ درحالی‌که نانوذرات نگهداری‌شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد پایداری زیادی نشان می‌دهند. به نظر می‌رسد دمای نگهداری نانوذرات بیوسنتز شده نقش مهمی در پایداری آنها دارد، هرچند پژوهش‌های بیشتر در این زمینه لازم است.

و (۳۷) و وجود باندها در $1384/08 \text{ cm}^{-1}$ آن را تأیید می‌کند. پیک موجود در $1320/7 \text{ cm}^{-1}$ کشش C-O اترهای آروماتیک را نشان می‌دهد و شباهت بسیار زیادی به پیک دارد که کومار و همکاران (۲۲) به دست آورده‌اند. ارتعاشات کششی پیوندهای Ag-N در پیک 1240 cm^{-1} مشخص شدند که در راستای یافته‌های موخرجی و همکاران (۳۸) هستند. طیف‌های 1101 cm^{-1} ، $1038/31 \text{ cm}^{-1}$ و $825/52 \text{ cm}^{-1}$ به ارتعاشات منحرفی C-OH ناشی از پروتئین‌ها مرتبط هستند و قاسمی‌نژاد و همکاران (۲۹) نیز پیک‌های مشابهی به دست آورده‌اند. درنهایت، طیف قرار گرفته در محدوده 617 cm^{-1} به گروه R-CH اختصاص دارد و مشابه کار کومار و همکاران (۲۲) است.

پروتئین‌ها از راه گروه‌های آمین آزاد یا باقیمانده‌های سیستئین در پروتئین‌ها و یا از راه جاذبه الکترواستاتیک با گروه‌های کربوکسیلات دارای بار منفی آنزیم‌های موجود در دیواره سلولی میسلوم‌ها به نانوذرات متصل و سبب پایداری نانوذرات می‌شوند. اینگل^{۱۱} و همکاران (۳۹)، شارما^{۱۲} و همکاران (۴۰) و کومار و همکاران (۲۲) نیز این موضوع را تأیید کرده‌اند. نانوذرات تولیدشده با این روش بسیار پایدارند و به علت استفاده‌نشدن مواد شیمیایی، قابلیت استفاده در زمینه‌های زیستی را دارند. نانوذرات بیوسنتز شده پس از گذشت ۱۱ ماه همچنان پایدار بودند و جذب زیادی از خود نشان دادند. این اندازه پایداری تاکنون بی‌سابقه بوده است و برای نخستین بار درباره این قارچ گزارش می‌شود.

در پژوهش دیگری، هنگامی که قارچ *A. flavus* در معرض یون‌های نقره آبی قرار گرفت، نانوذرات را در دیواره سلولی خود ایجاد کرد. نانوذرات تولیدشده به کمک پروتئین پایدار شدند و به نظر می‌رسد پروتئین‌های

by *Geranium* leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes. *Journal of Material Chemistry* 2003; 13: 1822-1826.

- (9) Golinska P., Wypij M., Ingle AP., Gupta I., Dahm H., Rai M. Biogenic synthesis of metal nanoparticles from actinomycetes: biomedical applications and cytotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2014; 98(19): 8083-8097.
- (10) Pantidos N., Horsfall LE. Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology* 2014; 5: 233. doi: 10.4172/2157-7439.1000233.
- (11) Saminathan K. Biosynthesis of silver nanoparticles using soil Actinomycetes *Streptomyces* sp. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2015; 4(3): 1073-1083.
- (12) Singh R., Shedbalkar UU., Wadhwani SA., Chopade BA. Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2015; 99: 4579. doi: 10.1007/s00253-015-6622-1.
- (13) Mandal D., Bolander M., Mukhopadhyay D., Sarkar G., Mukherjee P. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006; 69(5): 485-492.
- (14) Mohanpuria P., Rana NK., Yadav SK. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research* 2008; 10(3): 507-517.
- (15) Rai M., Yadav A., Gade A. Mycofabrication, mechanistic aspect and multifunctionality of metal nanoparticles-Where are we? And where should we go? In: Mendez-Vilas A., editor. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Badajoz, Spain: Formatex Research Center; 2010: 343-354.

در نهایت، نتیجه گرفته می‌شود قارچ *A. flavus* پتانسیل زیادی برای سنتز خارج سلولی نانوذرات نقره دارد و استفاده از این قارچ به علت رشد سریع و زیاد آن در محیط ساده، روشی بسیار ارزان در مقایسه با سایر روش‌هاست. پایداری نانوذرات تولیدی این قارچ، آن را گزینه مناسبی برای مطالعه‌های بیشتر مطرح می‌کند.

References

- (1) McNeil SE. Nanotechnology for the biologist. *Journal of Leukocyte Biology* 2005; 78: 585-593.
- (2) Uskokovic V. Nanomaterials and nanotechnologies: approaching the crest of this big wave. *Current Nanoscience* 2008; 4: 119-129.
- (3) Sastry M., Ahmad A., Khan MI., Kumar R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycetes. *Current Science* 2003; 85(2): 162-170.
- (4) Jana NR., Pal T., Sau TK., Wang ZL. Seed-mediated growth method to prepare cubic copper nanoparticles. *Current Science*. 2000; 79(9): 1367-1370.
- (5) Kohler JM., Hubner U., Romanus H., Wagner J. Formation of star-like and core-shell Au-Ag nanoparticles during two and three step preparation in batch and microfluidic systems. *Journal of Nanomaterial* 2007; 1155: 98134-98141.
- (6) Rai M., Yadav A., Gade A. Current trends in phytosynthesis of metal nanoparticles. *Critical Reviews in Biotechnology* 2008; 28(4): 277-284.
- (7) Nair LS., Laurencin CT. Silver nanoparticles: Synthesis and therapeutic applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2007; 3: 301-316.
- (8) Shankar SS., Ahmad A., Pasricha R., Sastry M. Bioreduction of chloroaurate ions

- (16) Holan ZR., Volesky B. Accumulation of cadmium, lead and nickel by fungal and wood biosorbents. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1995; 53(2): 133-146.
- (17) Metuku RP., Pabba S., Burra S., Gudikandula K., Charya MS. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Schizophyllum radiatum* HE 863742.1: their characterization and antimicrobial activity. *3 Biotech*. 2014; 4(3): 227-234.
- (18) Bala M., Arya V. Biological synthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* and its antibacterial action. *International Journal of Nanomaterials and Biostructures* 2013; 3: 37-41.
- (19) Bhainsa KC., D'Souza SF. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 2006; 47(2): 160-164.
- (20) Devi LS., Joshi S. Ultrastructures of silver nanoparticles biosynthesized using endophytic fungi. *Journal of Microscopy and Ultrastructure* 2015; 3(1): 29-37.
- (21) Gade AK., Bonde P., Ingle AP, Marcato PD., Duran N., Rai MK. Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Biobased Material and Bioenergy* 2008; 2: 243-247.
- (22) Kumar RR., Priyadharsani KP., Thamaraiselvi K. Mycogenic synthesis of silver nanoparticles by the Japanese environmental isolate *Aspergillus tamarii*. *Journal of Nanoparticle Research*. 2012; 14(5): 1-7.
- (23) Li G., He D., Qian Y., Guan B., Gao S., Cui Y., et al. Fungus-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus terreus*. *International Journal of Molecular Sciences* 2012; 13(1): 466-476.
- (24) Ningnanagouda S., Rathod V., Singh D. Characterization and biosynthesis of silver nanoparticles using a fungus *Aspergillus niger*. *International Letters of Natural Sciences* 2014; 15: 49-57.
- (25) Patil H., Borse S., Patil D., Patil U., Patil H. Synthesis of silver nanoparticles by microbial method and their characterization. *Archives of Physics Research* 2011; 2(3): 153-158.
- (26) Velhal SG., Kulkarni SD., Latpate RV. Fungal mediated silver nanoparticle synthesis using robust experimental design and its application in cotton fabric. *International Nano Letters* 2016; 6(4): 257-264.
- (27) Zomorodian K., Pourshahid S., Sadatsharifi A., Mehryar P., Pakshir K., Rahimi MJ., et al. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles by *Aspergillus* species. *BioMed Research International* 2016; 2016: 6.
- (28) Castro Longoria E., Vilchis Nestor AR., Avalos Borja M. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 2011; 83(1): 42-48.
- (29) Ghaseminezhad SM., Hamed S., Shojaosadati SA. Green synthesis of silver nanoparticles by a novel method: Comparative study of their properties. *Carbohydrate Polymers* 2012; 89(2): 467-472.
- (30) Bhainsa KC., D'Souza SF. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigates*. *Colloids and Surfaces B: Biointerface* 2006; 47: 160-164.
- (31) Ahmad A., Mukherjee P., Senapat S., Mandal D., Khan ML., Kumar R., et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 2003; 28(4): 313-318.
- (32) Duran N., Marcato PD., Alves OL., DeSouza G., Esposito E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of Nanobiotechnology* 2005; 3: 1-8.
- (33) Sundaramoorthi C., Kalaivani M., Mathews DM., Palanisamy S., Kalaiselvan V., Rajasekaran A. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Aspergillus niger* and

- evaluation of its wound healing activity in experimental rat model. *International Journal of Pharm Tech Research* 2009; 1(4): 1523-1529.
- (34) Luo L-B., Yu S-H., Qian H-S., Zhou T. Large-scale fabrication of flexible silver/cross-linked poly (vinyl alcohol) coaxial nanocables by a facile solution approach. *Journal of the American Chemical Society* 2005; 127(9): 2822-2823.
- (35) Sanghi R., Verma P. pH dependant fungal proteins in the 'green' synthesis of gold nanoparticles. *Advanced Materials Letters* 2010; 1(3): 193-199.
- (36) Basavaraja S., Balaji SD., Lagashetty A., Rajasab AH., Venkataraman A. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Material Research Bulletin* 2008; 43(5): 1164-1170.
- (37) Gajbhiye MB., Kesharwani JG., Ingle AP., Gade AK., Rai MK. Fungus mediated synthesis of silver nanoparticles and its activity against pathogenic fungi in combination of fluconazole. *Nanomedicine* 2009; 5(4): 382-386.
- (38) Mukherjee P., Roy M., Mandal BP., Dey GK., Mukherjee PK., Ghatak J., et al. Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*. *Nanotechnology* 2008; 19: 103-110.
- (39) Ingle A., Rai MK., Gade A., Bawaskar M. *Fusarium solani*: a novel biological agent for the extracellular synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* 2009; 11: 2079.
- (40) Sharma S., Ahmad N., Prakash A., Singh VN., Ghosh AK., Mehta BR. Synthesis of Crystalline Ag Nanoparticles (AgNPs) from Microorganisms. *Materials Sciences and Applications* 2010; 01(01): 1-7.
- (41) Vigneshwaran N., Ashtaputre M., Nachane RP., Paralikar KM., Balasubramanya H. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Material Letters*. 2007; 61(6): 1413-1418.
- (42) Binupriya AR., Sathishkumar M., Vijayaraghavan K., Yun SI. Bioreduction of trivalent aurum to nanocrystalline gold particles by active and inactive cells and cell free extract of *Aspergillus oryzae* var. *viridis*. *Journal of Hazardous Materials*. 2010; 177(1-3): 539-545.
- (43) Korbekandi H., Ashari Z., Iravani S., Abbasi S. Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using *Fusarium oxysporum*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2013; 12(3): 289-298.

¹- Sodium borohydride

²- Sodium citrate

³- Mycofabrication

⁴- Bionanofactories

⁵- Potato Dextrose Broth

⁶- UV-Visible Spectrophotometer

⁷- X-Ray Diffraction

⁸- Transmission Electron Microscopy

⁹- Fourier Transform Infrared Spectroscopy

¹⁰- Kumar

¹¹- Ingle

¹²- Sharma

¹³- Patil

¹⁴- Binupriya

¹⁵- Korbekandi