JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره چهاردهم، شماره اول، ۱۳۹۷، پیاپی ۳۶: ۳۸-۲۷

بررسی اثر ضدقارچی نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط *ساکارومیسس سرویسیه* بر علیه *میکروسپوروم کانیس*

بهین امیدی*[۱]

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 میکروارگانیسم‌ها و گیاهان نانوذرات نقره تولید کرده‌اند این روش ارزان و بی خطر و پایدار است. در این تحقیق از ساکارومیسس سرویسیه به عنوان یک بیوراکتور استفاده شد. همچنین در این تحقیق اثرات ضد قارچی نانوذرات نقره بیوسنتز شده برعلیه میکروسپوروم کانیس بررسی شد. سوپرناتانت مخمر به محلول M^{-3} ۱۰ نیترات نقره اضافه شد و در انکوباتور ۳۰ درجه و دور rpm ۲۵۰ قرار داده شد. تغییرات رنگ آن مورد بررسی قرار گرفت، سپس توسط دستگاه‌های VIS UV-، FTIR, XRD, TEM بیوسنتز نانوذرات نقره اثبات شد. نانوذرات حاصل به روش دیسک و چاهک گذاری و محاسبه قطر هاله عدم رشد و MIC80 و MFC آن بر علیه میکروسپوروم کانیس بررسی شد و با داروهای مؤثره مقایسه گردید. نتایج نشان داد که ساکارومیسس سرویسه توانایی بیوسنتز نانوذرات نقره با سایز ۲۷ نانومتر را داشته و این نانوذرات نقره با غلظت $۳۳ \pm ۰/۲۹ \mu g/ml$ اثر کشندگی بر میکروسپوروم کانیس دارد. این پژوهش در واقع گزارشی است از امکان بیوسنتز نانوذرات نقره توسط یکی از میکروارگانیسم‌های ایمن و غیر پاتوژن که نانوذرات بیوسنتز شده آن می‌تواند مورد استفاده در پزشکی و داروسازی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: نانوذرات نقره، بیوسنتز، 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

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 انسان‌دوست، 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 نانوتکنولوژی کاربرد علوم مختلف را برای کنترل مواد در سطح مولکولی فراهم کرده است. طبق تعریف موسسه ملی نانوتکنولوژی، 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، داروسانی، صنایع غذایی، نفت، انرژی، پوشاک، فناوری کامپیوتر، سخت افزار، فضانوری و صنایع شیمیایی وارد شده است. درخشش این فناوری در نانوتکنولوژی پزشکی نیز با فراهم آوردن امکان تشخیص سریع‌تر بیماری‌ها و داروسانی 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 نانوتکنولوژی 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

بودن، کم بازده بودن و سمی بودن همراه هستند بنابراین نمی‌توان از آن‌ها در اهداف پزشکی و داروسازی و داورورسانی استفاده کرد. نانوبیوتکنولوژی زیر مجموعه‌ای ازعلم 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 بیوسنتز 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 بیماری زایی هستند درنتیجه می‌تواند با خطراتی همراه باشد. در این تحقیق از مخمر *ساکارومیس سرویسه* (*Saccharomyces cerevisiae*) استفاده شده است. *ساکارومیس سرویسه* میکروارگانیسمی غیر بیماری زا است و از مهم‌ترین و 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 بیوسنتز 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 بیوسنتز شده بر علیه *میکروسپوروم کانیس* که یک درماتوفیت حیوان دوست است مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

نحوه آماده‌سازی *ساکارومیس سرویسیه*: میکروارگانیسم مورد استفاده در این پژوهش ساکارومیس سرویسیه (PTCC5269: *Saccharomyces cerevisiae*) بوده است که به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. مخمر به محیط سابرودکستروزبراث محتوی کلرامفنیکل منتقل شد و در انکوباکتور ۲۸-۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت قرار داده شد.

مراحل بیوسنتز نانو ذرات نقره: ابتدا محلول نیترات نقره یک میلی مولار تهیه شد و pH محلول را ۵/۶ تنظیم گردید. درون فانل 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 فانل 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 بیوسنتز نانوذرات نقره توسط *ساکارومیس سرویسیه*

اثبات بیوسنتز نانو ذرات 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. 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 rpm ۱۳۰۰۰ 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 rpm ۱۳۰۰۰ 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 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 خوانده 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 نیترات نقره یک میلی مولار و مقایسه مقدار یون نقرهموجود در محلول نهایی می‌باشد که در این روش نیز مقادیر مشخص و دقیق یون نقره توسط دستگاه خوانده شده و مقادیر نسبت به آن‌ها گزارش شد.

بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات نقره: قارچ *میکروسپوروم کانیس* (PTCC: 5069) به روی محیط سابورود کستروزآگار حاوی کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید (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 سابورودکستروزآگار محتوی کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید 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 پیپت 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

مقایسه اثرات ضدقارچی نانوذرات نقره با داروها از دیسک‌های داروهای آمفوتریسین B، ایتراکونازول و گریزئوفولوین 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 سابورود کستروزبراث محتوی کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید برای *میکروسپوروم کانیس* استفاده شد. روش کار براساس استاندارد NCCLS: M27-A انجام شد.

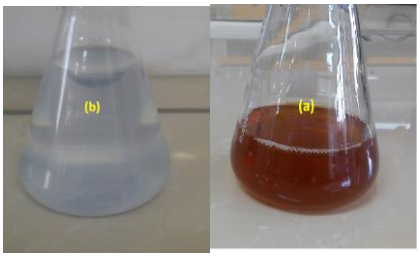
تعیین حداقل میزان غلظت جلوگیری کننده از رشد (MIC) به روش میکرودایلوشن: در این پژوهش برای سنجش MIC از روش میکرودایلوشن نیز استفاده گردید. این روش با استفاده از استاندارد NCCLS M38-A انجام شده است.

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 بهروی سابورود کستروزآگار 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.

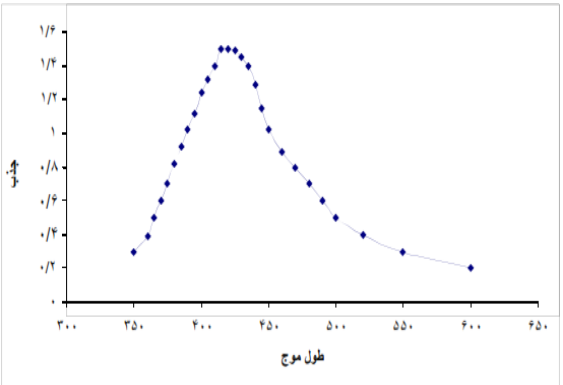
نتایج

بررسی تغییر رنگ ایجاد شده: اولین نشانه اثبات تولید نانوذرات نقره تغییر رنگ آن از محلول بی رنگ به قهوه‌ای است. تغییر رنگ محلول‌ها نشان می‌دهد *ساکارومیسس سرویسیه* توانایی بیوسنتز نانوذرات نقره را دارند.



نگاره ۲- تغییر رنگ ایجاد شده توسط سوپرناتانت *ساکارومیسس سرویسیه*

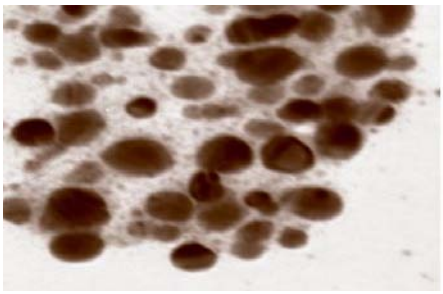
بررسی اسپکتروفتومتری: گام دوم برای اثبات تولید و سنتز نانوذرات نقره استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری UV-VIS و خواندن جذب محلول‌ها بین ۳۵۰ تا ۶۵۰ نانومتر می‌باشد. پیک در ناحیه ۴۱۰-۴۵۰ نانومتر نشانه سنتزنانوذرات نقره می‌باشد. باتوجه به نتایج بدست آمده مشخص گردید که *ساکارومیسس سرویسیه* در ناحیه ۴۲۰ پیک ایجاد کرده است. این مساله ثابت می کند که *ساکارومیسس سرویسیه* توانایی بیوسنتز نانوذرات نقره را دارد و توانستند در ناحیه ۴۲۰ نانومترپیک قوی ایجادکنند.



نمودار ۱- بررسی جذب محلول حاوی نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط *ساکارومیسس سرویسه*

بررسی مورفولوژی و سایز نانوذرات بیوسنتز شده توسط TEM: در بررسی انجام شده توسط میکروسکوپ الکترونی مشخص گردید که از نظر

شکل و مرفولوژی نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط *ساکارومیسس سرویسیه* مورد آزمایش، کروی شکل هستند و می‌توان گفت از پراکندگی تقریباً یکسانی برخوردار می‌باشند. سایز نانوذرات نقره بیوسنتز شده ۰/۱۸±۲۷ نانومتر می‌باشد.



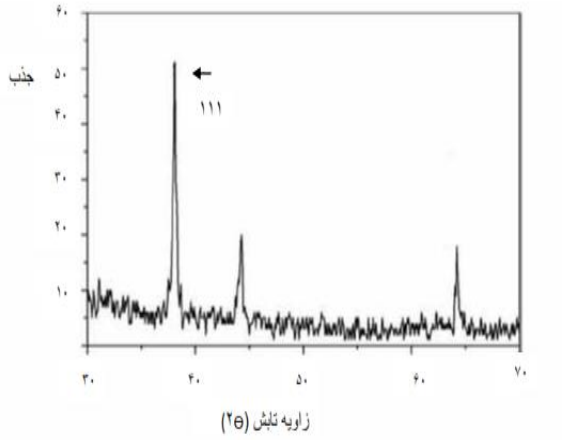
نگاره ۳- تصاویر میکروسکوپالکترونیTEM از نانو ذرات نقره بیوسنتزشده توسط ساکارومیسس سرویسیه

جدول ۱- سایز نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط *ساکارومیسس سرویسیه*

سایز نانو ذرات نقره/(nm)	میکروارگانیسم تولید کننده
۰/۴۲±۲۷	*ساکارومیسس سرویسیه*

اثبات بیوسنتز نانوذرات نقره توسط *ساکارومیسس سرویسیه* توسط XRD:

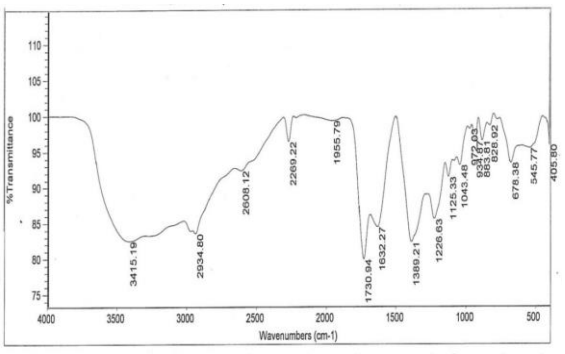
در مطالعه توسط XRD ساختار کریستالی ذرات مورد بررسی و مطالعه قرار می‌گیرد. نمونه‌های نقره که در ناحیه ۱۱۱ پیک‌های قوی ایجاد می‌کنند اثبات کننده کروی شکل بودن نانوذرات نقره بیوسنتز شده می‌باشد. در تحقیق انجام شده پیک‌هایی در ناحیه ۱۱۱ نشان داده شد که بر طبق مطالعات محققین، نشان‌دهنده کروی بودن نانوذرات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



نمودار ۲- دیاگرام XRD محلول حاوی نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط *ساکارومیسس سرویسیه*

اثبات بیوسنتز نانوذرات نقره توسط *ساکارومیسس سرویسیه* توسط FTIR:

توسط این روش گروه‌های عاملی روی نانوذرات مشخص می‌شود. در تحقیق انجام شده پیک‌های قوی در ناحیه ۳۴۰۰ ایجادشده است که در قبل از بیوسنتز پیک ضعیف دارد و در ضمن پیک‌های جدیدی در ناحیه ۱۰۰۰ تا ۱۴۰۰ cm^{-1} مشاهده شده است که نشان‌دهنده این است که گروه عاملی مؤثر برای بیوسنتز نانوذرات نقره گروه OH می‌باشد.



نمودار ۳- دیاگرام FTIR محلول حاوی نانوذرات نقره *بیوسنتز شده توسط ساکارومیسس سرویسیه*

نتایج تعیین غلظت نانوذرات نقره بیوسنتز شده:

به منظور استفاده از نانوذرات نقره بیوسنتزشده در بررسی اثرات ضدقارچی، 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 بیوسنتزشده توسط *ساکارومیسس سرویسیه*

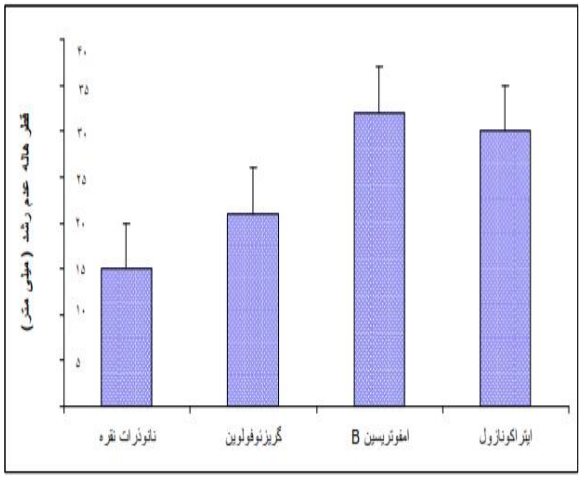
میکروارگانیسم	غلظت نانوذرات نقره بیوسنتزشده (ppm = µg/ml)
ساکارومیسس سرویسیه	۱۵۸/۵۷±۰/۸

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 نتیجه گرفت که نانوذرات نقره بیوسنتز شده دارای پتانسیل بالای اثر ضد قارچی بر علیه *میکروسپوروم کانیس* می‌باشد. این نکته در مقایسه با داروهای ضد قارچی قابل مقایسه می‌باشد و بین نانوذرات نقره و داروی گریزئوفولوین تفاوت معناداری مشاهده نگردید. اما بین نانوذرات نقره و آمفوتریسین B و ایتراکونازول تفاوت معنی‌دار است. به طور خلاصه می‌توان 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 هاله‌های عدم رشد *میکروسپوروم کانیس* در مقابل نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط ساکارومیسس سرویسیه

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

Mean ± S. E



نمودار ۴-میانگین قطر هاله عدم رشد *میکروسپوروم کانیس* در برابرنانوذرات بیوسنتز شده و داروهای آمفوتریسین B، ایتراکونازول و گریزئوفولوین

کمترین میزان غلظت مهارکننده رشد قارچ *میکروسپوروم کانیس* (MIC_{80}) نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط *ساکارومیسس سرویسیه* در جدول شماره ۵ و ۴ نمایش داده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص گردیدکه نانوذرات نقره بیوسنتز شده دارای پتانسیل بالای اثر ضد قارچی بر علیه *میکروسپوروم کانیس* می‌باشند. بین نانوذرات نقره و داروی گریزئوفولوین تفاوت معناداری مشاهده نگردید اما بین نانوذرات نقره و آمفوتریسین B و ایتراکونازول تفاوت معنی‌دار است. به طور خلاصه می‌توان اینطور برداشت کرد که اثرات نانوذرات نقره مشابه داروهای فعلی مورد استفاده در درمان درماتوفیتوزیس می‌باشد. ($p\leq 0/05$).

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

MIC_{80} µg/ml	نانوذرات نقره بیوسنتز شده MIC_{80} µg/ml	آمفوتریسین B MIC_{80} µg/ml	ایتراکونازول MIC_{80} µg/ml	گریزئوفولوین MIC_{80} µg/ml
میکروسپوروم کانیس	۲۶± ۰/۲۵	۰/۵۶ ± ۰/۳	۰/۷۴± ۰/۵۱	۲۳±۰/۴۶

Mean ± S. E

جدول ۵ - کمترین میزان غلظت مهارکننده رشد قارچ *میکروسپوروم کانیس* (MIC_{80}) نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط *ساکارومیسس سرویسیه* به روش میکرودایلوشن

MIC_{80} µg/ml	نانوذرات نقره بیوسنتز شده MIC_{80} µg/ml	آمفوتریسین B MIC_{80} µg/ml	ایتراکونازول MIC_{80} µg/ml	گریزئوفولوین MIC_{80} µg/ml
میکروسپوروم کانیس	۳۳ ± ۰/۴	۰/۵۸ ± ۰/۱۸	۰/۳۹ ± ۰/۶	۲۹± ۰/۳۵

Mean ± S. E

کمترین میزان غلظت کشنده قارچ *میکروسپوروم کانیس* (MFC) نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط *ساکارومیسس 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 *ساکارومیسس سرویسیه*

میکروارگانیسم	نانوذرات نقره بیوسنتز شده MFC µg/ml	آمفوتریسین B MFC µg/ml	ایتراکونازول MFC µg/ml	گریزئوفولوین MFC µg/ml
میکروسپوروم کانیس	۳۴ ± ۰/۷۱	۰/۶۱ ± ۰/۶	۰/۴۲ ± ۰/۴۳	۳۰± ۰/۲۵

Mean± S. E

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص گردید *ساکارومیسس سرویسیه* پتانسیل بیوسنتر 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 میکروارگانیسم‌ها تلاش زیادی کردند اما هنوز سؤالات زیادی در این خصوص مطرح است. محققین بر این عقیده هستند که در معرض قرارگرفتن یون‌های نقره (Ag^+) با میکروارگانیسم منجر به آزادسازی آنزیم ردوکتاز و به دنبال آن احیای یون نقره می‌شود، آنزیم مترشحه وابسته به کوفاکتور NADH می‌باشد (۵، ۱). 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 نیتریت می‌گردد و نیتریت حاصله به وسیله $NADP^+$ به عنوان کوفاکتوراکسید 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 *ساکارومیسس 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

برگشتن به وضعیت تعادلی خود را دارند و به این ترتیب دچار جهش می‌شوند و به جلو و عقب نوسان می‌کنند. نوسان به هم پیوسته‌ای از الکترون‌های رسانش در فلزات که در معرض برانگیختگی با تابش الکترومغناطیس قرار گرفته‌اند به عنوان پلاسمون شناخته می‌شود این نوسان‌ها یک باند جذبی قوی در ناحیه مرئی طیف الکترومغناطیسی می‌دهد که به عنوان باند روزنالس پلاسمونی (Surface Plasmon Resonance) شناخته می‌شود Mie این پدیده را با استفاده از معادلات ماکسون توضی حداد که برای ساختارهای فلزی با سایز نانو تعریف می‌شود. (۵). باندرزونانس 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 نقطهSRP بین ۴۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر می‌باشد. نتایج حاصله در این پژوهش، افزایش جذب در ناحیه ۴۲۰ را نشان می‌دهد که با سایر مطالعات نیز مطابقت دارد (۲۴-۱۹ و ۱۷-۲). در تحقیق انجام شده توسط XRD پیک‌هایی در ناحیه ۱۱۱ نشان داده شد که بر طبق مطالعات محققین، نشان‌دهنده کرویبودن 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 گروه‌های عاملی از FTIR استفاده شد. به طور کلی FTIR جهت شناسایی گروه‌های عامل ترکیبات مختلف مورد استفاده قرار گرفت. در تحقیق انجام شده پیکهای قوی در ناحیه ۳۴۰۰ ایجاد شده که در قبل از بیوسنتز پیک ضعیف دارد و در ضمن پیکهای جدید در ناحیه ۱۰۰۰ تا ۱۴۰۰ cm^{-1} مشاهده شده است که نشان‌دهنده این است که گروه عاملی مؤثر برای بیوسنتز نانوذرات نقره گروه OH می‌باشد که نتایج حاصله با نتایج سایر مطالعات مطابقت دارد (۲۴-۱۹ و ۱۷-۲). در تحقیقات گذشته توانایی بیوسنتز نانوذرات توسط باکتری‌ها 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 درتولید 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 یون‌های +Ag در فاز لگاریتمی رشد بدست آمده است. در تحقیق دیگر می‌توان به بیوسنتر توسط *شیزوساکارومیسس پومبه (Schizosaccharomyces pombe)* اشاره کرد که می‌تواند نانوذرات سولفید کادمیوم و نقره تولید کند (۶) .در تحقیق دیگری از *ساکارومیسس بولاردی (Saccharomyces boulardii)* دربیوسنتز نانوذرات نقره استفاده شده است (۱۳، ۱۰). دریک پژوهش دیگر توانایی مخمرهای اکسترموفیل اسیددوست در بیوسنتز نانوذات نقره اثبات گردید (۱۹). اثرات ضدمیکروبی نانوذرات نقره بسیار مورد بررسی قرار گرفته است اما بیشتر تحقیقات بر اثرات ضد باکتری‌هاست و تحقیقات محدودتری به روی اثرات ضدقارچی انجام شده که اغلب آن‌ها بر قارچ‌های ساپروفیت صورت گرفته است (۱۷ و ۱۵، ۱۲، ۱۱، ۷، ۲). تحقیقات در خصوص درماتوفیت‌ها محدودتربوده 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 (Microsporumcanis)* بررسی کردند که در این

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 مطلوب‌تری را نشان می‌دهد و قابل قیاس با داروی مؤثره گریزئوفولوین می‌باشد. مکانیسم احتمالی اثر ضدقارچی نانوذرات نقره، تغییر در نفوذپذیری غشا می‌باشد که در نهایت باعث مرگ سلول *میکروسپوروم کانیس* در اثر این تغییر می‌گردد. در پایان می‌توان 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 می‌تواند 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 می‌باشد 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 می‌گردد.

فهرست منابع

1. 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.

2-Ayatollahi Mousavi, S. A., Salari, S., & Hadizadeh, S. (2016). Evaluation of Antifungal Effect of Silver Nanoparticles Against *Microsporumcanis*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum gypseum. Iranian Journal of Biotechnology*,**13**: 38-42.

3. 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.

4. Dhoondia, Z. H., & Chakraborty, H. (2012). *Lactobacillus* mediated synthesis of silver oxide nanoparticles. *Nanomaterials and Nanotechnology* **2**: 2-15.

5. 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.

6. Forsburg, S. L. (2007). The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces* pombe: models for cell biology research. *Gravitational and Space Research*,**18**(2).

7. 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.

8. 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.

9. Kaler, A., Patel, N., & Banerjee, U. C. (2010). Green synthesis of silver nanoparticles. *Current Research & Information on Pbarmaceuticals Sciences*,**11**: 68-71.

10. 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

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., & Iravani, 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 *Microsporum 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 J ournal of *Pharmacy, Medicine and BiologySci*ence,**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.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 14, Issue1, 2018

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: 21April2017 *Accepted Date: 7January2018*

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