بررسی اثرات ضد قارچی نانو ذره گرافن بر *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم*

مریم علی اصغری[1]، نادر حبیبی[2*]، اسعد رخزادی[3]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

۲. عضو هیأت علمی گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

۳. عضو هیأت علمی گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *naderhabibi45@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۲۸

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی اثرات ضد قارچی نانو ذره گرافن بر دو کپک *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم* انجام شد. غلظت‌های مختلفی از نانو ذره گرافن برای تعیین پارامترهای حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC)، حداقل غلظت کشندگی (MFC) و قطر هاله عدم رشد در این آزمایش بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان غلظتی از نانو ذره گرافن که موجب بازدارندگی رشد کپک *پنی‌سیلیوم سیترینوم* شد، از لحاظ آماری بیشتر از میزان غلظت بازدارنده برای رشد کپک *آسپرژیلوس نایجر* بود. از سوی دیگر تفاوت معنی‌داری بین دو گونه کپک از لحاظ غلظت‌های MFC وجود نداشت. نتایج MIC برای قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم* به ترتیب ۱۰۳۸۸/۹ و ۱۰۵۲۷/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. بررسی هاله عدم رشد دو کپک نشان داد که تا غلظت ۱۰۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، تفاوت محسوسی بین دو کپک از نظر قطر هاله وجود نداشت ولی با افزایش غلظت نانو ذره گرافن، تفاوت قطر هاله در دو کپک بیشتر شد به‌طوری که قطر هاله عدم رشد *آسپرژیلوس نایجر* در غلظت‌های بالاتر نانو ذره، بیشتر از قطر هاله عدم رشد *پنی‌سیلیوم سیترینوم* بود. بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش می‌توان نتیجه‌گیری نمود که میزان تاثیر نانو ذره گرافن بر روی کپک *آسپرژیلوس نایجر* بیشتر از *پنی-سیلیوم سیترینوم* بوده است.

کلید واژه ها: *آسپرژیلوس نایجر*، *پنی‌سیلیوم سیترینوم*، نانوذره گرافن.

مقدمه

یکی از مهم‌ترین بخش‌های صنعت کشورها صنعت غذایی است که ارتباط تنگاتنگی با امنیت غذایی افراد جامعه دارد. افزایش جمعیت به همراه گسترش شهرنشینی و افزایش سطح درآمد سرانه نیاز به غذاهای فرآوری‌شده را روز به روز افزایش داده است. از این رو استفاده از فن‌آوری‌های نوین از جمله فن‌آوری نانو در این صنعت بسیار مورد توجه محافل علمی و صنعتی جهان قرار گرفته است. امروزه بهره‌برداری از نانو ذرات در ابعاد صنعتی، دارویی، پوشاک، غذایی و زیستی بسیار توسعه یافته و توسط کشورهای صنعتی و پیشرفته جهان در زمینه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. این نانو ذرات دارای انواع مختلفی می‌باشند. یکی از این نانو ذرات که بسیار مورد توجه قرار گرفته است نانو ذره گرافن[1] می‌باشد گرافن به دلیل ویژگی-های منحصر به فرد خود محبوبیت زیادی میان جامعه علمی پیدا کرده است. ویژگی‌های منحصر به فرد گرافن موجب شـده تا طیف وسیعی از تحقیقات به سوی این ماده جادویی قرن بیسـت و یکم روانه شود (Novoselov et al., 2012). این نانو ذره به صورت یک ساختار دو بعدی از اتم‌های کربن در یک پیکربندی چند ضلعی لانه زنبوری تشکیل شده است که اتم‌ها در آن با هیبرید SP^2 به هم متصل شده‌اند (Geim and Novoselov, 2007; Geim, 2009; Rashidi and Khosravi-Darani, 2011). طول پیوند کربن-کربن در گرافن در حدود ۰/۱۴۲ نانومتر است (Heyrovska, 2008). هر کدام از نانو ذرات با

[1] Graphene

توجه به ساختار سطحی و نوع بار سطحی‌شان مکانیسم خاصی برای اثرشان بر روی میکروارگانیسم‌ها دارند. به عنوان مثال گرافن به خاطر ساختار منحصر به فرد و لبه‌های فوق تیز به دیواره سلول‌های باکتریایی نفوذ کرده و باعث از بین رفتن آن‌ها می‌شود (Akhavan et al., 2013). نانو ساختارها و نانو ذرات به طور خاص دارای خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی هستند که این خواص می‌توانند به منظور تسهیل مدیریت داروهای ضدقارچی و غلبه بر برخی محدودیت‌های موجود در روش‌های درمانی ضد میکروبی قارچی به‌کار روند (Zhang et al., 2010). در یک آزمایش نانو ذرات نقره کروی با قطر ۱۱ نانومتر تأثیر مهاری قابل توجهی بر روی گونه‌های *آسپرژیلوس* از خود نشان دادند، به گونه‌ای که حداقل غلظت بازدارندگی معادل ۳/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (Akhavan and Ghaderi, 2010). نیمه حداکثر غلظت مهاری (IC_{50}) نانوگرافن احیا شده بر علیه *فوزاریوم اکسیسپوروم*[1]، *آسپرژیلوس نایجر*[2] و *آسپرژیلوس اورزیه*[3] به ترتیب ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (Montree et al., 2012). اثر هم افزایی بین نانوذره گرافن اکسید و آنتی بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید[4]، نوروفلاکسین[5]، تتراسایکلین[6]، سفالوتین[7]، جنتامایسین[8] و کانامایسین[9] مشاهده شده است (مهرابیان و همکاران، ۱۳۹۵). مخلوط نانوذرات اکسید مس و آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان عفونت اشیریشیاکلی در مقایسه با اکسید گرافن و نیز این آنتی بیوتیک ها به تنهایی اثر بخشی بیشتری داشته اند (Geethalakshmi and Sarada, 2012). در سال‌های اخیر نانوساختارهای گرافن با توجه به خواص منحصر به فرد از جمله رسانایی، خواص اپتیکی و استحکام بالا، توجه محققان را در زمینه‌های مختلف به خود جلب کرده اند. برخی محققان نشان داده اند که این نانو ساختار دارای خواص باکتری‌کشی نیز می‌باشد (Noorbakhsh et al., 2012). حساسیت باکتری ها به نانوذرات فقط به ساختار دیواره سلولی مربوط نمی شود بلکه ممکن است به پراکسیداسیون چربی و تولید گونه های فعال اکسیژن نیز مربوط باشد اما در باره نحوه تأثیرگذاری بر قارچ ها گزارشی یافت نشد (Krishnamoorthy et al., 2012).

قارچ‌های جنس *آسپرژیلوس* از دسته قارچ‌های ناقص و با تنوع گونه‌ای فراوان است. گونه‌های مختلف *آسپرژیلوس* با دارا بودن میزبان‌های متعدد و متفاوت از بعضی جهات به عنوان قارچی مفید و از جهات دیگر به عنوان یک قارچ مخرب شناخته می‌شوند (Klich and Pitt, 1988). قارچ‌های جنس *پنی‌سیلیوم* با دارا بودن ۱۵۰ گونه شناخته شده دارای گسترش جهانی در تمام دنیا می‌باشد. گونه‌هایی از این قارچ عامل فساد، سمی شدن و اُفت کیفیت در بسیاری از محصولات غذایی و کشاورزی همچون نان، مرکبات، پسته، ذرت و انواع میوه‌ها و سبزیجات هستند و در سایر موجودات زنده از جمله انسان نیز دارای اثرات سمی و سرطان‌زا می‌باشند (Pashova et al., 1999). برآورد اهمیت این قارچ در طبیعت و در امور مربوط به زندگی انسان مشکل است. آن‌ها به عنوان بزرگترین گروه از قارچ‌های خاک محسوب می‌گردند و عده‌ای از آن‌ها سبزیجات در حال فساد را ترجیح می‌دهند و بعضی در زیستگاه‌های خشک‌تر و شرایط کم رطوبت نسبی زندگی می‌کنند (Alexopoulos et al., 1996; Zhi-Gang et al., 1993). آن‌ها در این زیستگاه‌ها به عنوان قارچ‌های تجزیه کننده عمل می‌کنند (Deacon, 1997; Pitt, 1988; Padmavathy and Vijayaraghavan, 2008). نظر به اهمیت کنترل فساد ناشی از انواع قارچ-ها و کپک‌ها در محصولات غذایی، این پژوهش با هدف

[1] *Fuzarium oxysporum*
[2] *Aspergillus niger*
[3] *Aspergillus orzae*
[4] Nalidixic acid
[5] Neuroflexin
[6] Tetracycline
[7] Cephalothin
[8] Gentamycin
[9] Kanamycin

بررسی اثرات ضد میکروبی نانو ذره گرافن بر روی دو کپک شایع در صنایع غذایی یعنی *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم*[1] انجام شد.

روش کار

مواد و محیط‌های کشت

این تحقیق در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج در سال ۱۳۹۶ انجام شد. در این پژوهش مواد شیمیایی و محیط‌های کشت مصرفی شامل محیط کشت های سابورود دکستروز آگار[2] و سابورود دکستروز براث[3] و YGC[4] براث محصول شرکت کیولب[5] کانادا و کشت‌های لیوفیلیزه قارچ‌های مورد استفاده شامل *آسپرژیلوس نیجر* (PTCC 5012) و *پنی سیلیوم سیترینوم* (PTCC 5034) از مراکز مطالعات و تحقیقات بیوتکنولوژی ایران و همچنین نانو ذره گرافن (با خلوص ۳۲ لایه و ابعاد ۲ تا ۱۸ نانومتر) از شرکت پیشگامان نانو خراسان تهیه شد.

سنتز گرافن اکساید به روش اصلاح شده هامرز

ابتدا ۶۰۰ میلی‌گرم پودر گرافیت را داخل بالن ریخته، ۷۲ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آن اضافه شد و پس از افزودن ۸ میلی‌لیتر اسید فسفریک، بالن محتوی مواد فوق داخل ظرف شن تثبیت گردید تا واکنش در طول انجام همواره گرم بماند. بالن پس از قرار دادن یک مگنت در داخل آن، همراه ظرف شن روی همزن قرار گرفت. به مخلوط سیاه رنگ حاصل به‌تدریج ۳/۶ گرم پرمنگنات پتاسیم اضافه شد. در طول افزودن پرمنگنات پتاسیم رنگ مخلوط به سبز لجنی گرائید. پس از اتمام کل پرمنگنات پتاسیم، هیتر روی ۶۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده و همزدن تا ۴۸ ساعت ادامه یافت، سپس مخلوط به دست آمده به رنگ قهوه-ای کاکائویی از روی همزن برداشته شد و پس از گذشت چند دقیقه که دمای آن کاهش یافت، ۱۰۰ الی ۱۵۰ میلی لیتر یخ و ۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه با سرعت متوسط به مخلوط اضافه شد. مخلوط روی همزن قرار گرفته و در پایان مخلوط گرم کرم رنگ حاصل، داخل فالکن ۵۰ ریخته شده و به مدت یک ساعت با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ مایع رویی دور ریخته شده و روی رسوب باقی مانده مقداری اسیدکلریدریک ۳۰ درصد اضافه و مجددا به مدت یک ساعت سانتریفیوژ گردید. پس از دور ریختن مایع رویی، شستشوی رسوب با الکل ۷۰ درصد انجام و ۳۰ دقیقه با همان دور سانتریفیوژ شد و در پایان روی رسوب تشکیل شده که گرافن اکساید بود، ۲۰ میلی-لیتر آب مقطر اضافه شد (Hummers et al., 1958).

آماده سازی محلول نانو ذره گرافن

نانو ذرات در آب مقطر استریل به منظور رسیدن به غلظت مورد نیاز حل شد و از اولتراسونیک (Hilsonic آلمان) با هدف پراکنده کردن نانوذرات استفاده و در نهایت یک سوسپانسیون با حجم حداقل ۵ میلی‌لیتر آماده شد. نانو ذره گرافن در روشی که توسط ژوانگ و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شده بود و با اندکی تغییرات اعمال شده مغناطیسی گردید. برای انجام این کار میزان مشخصی از گرافن با میزان مشخصی آب مقطر به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۰ الی ۶۰ درجه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت (Juang et al., 2010).

فعال‌سازی سویه‌های قارچی

برای فعال سازی آمپول لیوفیلیزه[6] حاوی سوش‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم* با سوهان مخصوص از قسمت مشخص شده کمی برش داده تا نازک شده و با یک فشار به راحتی بشکند. تمام مراحل بالا با وسایل استریل، زیر هود و در کنار شعله انجام گرفت. با استفاده از پیپت پاستور مقداری از رقیق کننده مورد نظر را که در این‌جا YGC براث استریل شده بود، داخل خود ویال ریخته، یک سوسپانسیون تهیه کرده و مقداری از آن به لوله‌های آزمایش انتقال

[1] *Penicillium citrinum*
[2] Sabouraud Dextrose Agar
[3] Sabouraud Dextrose Broth
[4] Yeast Glucose Chloramphenicol
[5] Q-lab
[6] Lyophilize

داده شد. لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط YGC براث بود که پس از انتقال سوسپانسیون در کنار شعله درب آن‌ها بسته و کنار گذاشته شدند. لوله‌های بعدی هم به همین صورت کشت داده شدند. در نهایت لوله‌ها گرمخانه (N-BIOTEK-کره) با دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷ تا ۱۴ روز قرار داده تا گرمخانه‌گذاری شدند و هاگ‌زایی صورت گرفت (استاندارد ملی شماره ۵۸۷۵).

کشت *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم*

لوپ استریل شده توسط شعله را داخل لوله آزمایش حاوی محیط YGC براث، هاگ و قارچ فعال شده برده، مقداری برداشته و به آرامی روی پلیت حاوی محیط کشت سابرو دکستروز آگار به صورت عمودی و افقی به نحوی که کاملا روی محیط پخش شود کشت داده شد. درب پلیت را بسته و داخل گرمخانه (N-BIOTEK-کره) در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۷ تا ۱۴روز قرار داده تا گرمخانه گذاری شدند و بعد از رشد کافی به هاگ زایی رسید (اکرمی مهاجری و همکاران، ۱۳۹۱).

تعیین میزان دوز شروع برای انجام آزمایش

دوز شروع مقدار غلظتی از نانو ذره است که مؤثر بوده و می‌تواند هاله عدم رشد را ایجاد کند. میزان دوز شروع برای انجام آزمون، با توجه به این‌که میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش قارچ بودند، ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در نظر گرفته شد که این دوز تست شد و هاله عدم رشد دیده نشد سپس میزان دوز هر بار به ۶۰۰۰، ۷۰۰۰، ۸۰۰۰، ۹۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ افزایش داده و تست شد که در نهایت در ۱۱۰۰۰ پی‌پی‌ام هاله عدم رشد مشاهده شد.

تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی[1] و حداقل غلظت کشندگی[2]

سوسپانسیون میکروارگانیسم ها حداکثر تا ۳۰ دقیقه پس از تهیه، تلقیح شدند. برای تلقیح، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون دارای ۱×۱۰^{۶} هاگ قارچ به یک لوله حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت سابورود دکستروز براث اضافه شد. به این ترتیب هر لوله حاوی $۱۰^{۶}\times$ ۰/۵ هاگ قارچ بود (استاندارد ملی شماره ۵۸۷۵).

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذره از روش رقت سازی متوالی و میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. از هر غلظتی از نانو ذره رقیق شده، ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌های مربوطه به جز خانه شماره ۱۲ انتقال داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت نیز به تمام چاهک‌ها افزوده شد و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ به میکروپلیت‌ها به جز خانه شماره ۱۱ اضافه شد. خانه‌های شماره ۱ الی ۱۰ به ترتیب حاوی غلظت‌های ۱۱۰۰۰، ۱۰۷۵۰، ۱۰۵۰۰، ۱۰۲۵۰، ۱۰۰۰۰، ۹۷۵۰، ۹۵۰۰، ۹۲۵۰، ۹۰۰۰ و ۸۷۵۰ برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره گرافن بودند. خانه شماره ۱۱حاوی محیط کشت و نانوذره به عنوان کنترل منفی و خانه شماره ۱۲ حاوی محیط کشت و سوسپانسیون قارچی به عنوان کنترل مثبت بودند. میکروپلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شدند. پس از طی زمان گرمخانه‌گذاری، چاهک‌ها از نظر رشد کپک بررسی شدند. کمترین غلظتی از نانو ذره که کپک در آن رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد (مرتضوی و همکاران، ۱۳۸۸).

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی با توجه به نتایج حاصل از غلظت مهارکنندگی، از تمام خانه‌هایی که رشد کپک در آن‌ها متوقف شده بود به وسیله سمپلر ۵۰ میکرولیتر برداشته شد و در پلیت‌های حاوی محیط کشت استریل سابرودکستروز آگار کشت داده شد. سپس در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از گذشت این زمان هر رقتی که در پلیت مانع رشد کامل شد یا کمتر از ۳

[1] Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
[2] Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

هاگ در آن وجود داشت به عنوان MFC در نظر گرفته گرفته شد (مرتضوی و همکاران، ۱۳۸۸).

تعیین قطر هاله عدم رشد به روش انتشار در آگار[1]

برای انجام این آزمایش و استفاده از غلظت نانو ذره، رقت سازی انجام شد. غلظت های تهیه شده از نانوذره همانند MIC انجام شد و عبارت بودند از: ۱۱۰۰۰، ۱۰۷۵۰، ۱۰۵۰۰، ۱۰۲۵۰، ۱۰۰۰۰، ۹۷۵۰، ۹۵۰۰، ۹۲۵۰، ۹۰۰۰ و ۸۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر. در ادامه دیسک های بلانک تحت شرایط استریل و در کنار شعله از محل خود خارج و به وسیله پنس استریل به شکل منظم داخل پلیت‌های استریل خالی قرار داده شدند. سپس در شرایط استریل و جداگانه اشباع‌سازی با مقادیر ۱۰ میکرولیتر به وسیله سمپلر صورت گرفت. با سمپلر ۱۰۰-۱۰ میکرولیتری و سر سمپلر های زرد استریل و در کنار شعله مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نانو ذره را برداشته و به سطح دیسک های بلانک مجزا شده برای هر نانو ذره در هر پلیت افزوده شد. پس از اشباع سازی دیسک‌ها، درب پلیت‌های حاوی دیسک‌های آغشته به نانوذره‌ها به صورت نیمه باز در کنار شعله قرار داده شد تا عصاره‌ها جذب دیسک‌ها گردیده و دیسک‌های بلانک اشباع شده برای مراحل بعدی کار آماده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی دارای $۰/۵ \times ۱۰^{۷}$ CFU/ml (که قبلاً آن را با پپتون واتر یک به یک رقیق شده بود) را برداشته و به صورت چمنی با سوآپ استریل روی سطح محیط سابورود دکستروز آگار کشت داده شد. در واقع ۱۰۰ میکرولیتر از آن حاوی $۰/۵ \times ۱۰^{۶}$ هاگ قارچ بود. در ادامه با رعایت فاصله استاندارد از یکدیگر (۲/۴ سانتی متر) دیسک‌های حاوی نانوذره را با پنس استریل و در کنار شعله روی سطح محیط کشت با اعمال فشار کم قرار داده تا مایع قارچی تلقیحی جذب محیط گردید. پلیت‌ها به صورت وارونه و به مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردیدند. پس از طی مدت مذکور پلیت‌ها را از انکوباتور خارج کرده و با استفاده از خط‌کش از سمت پشت پلیت قطر هاله عدم رشد اندازه گیری شده و اعداد ثبت شدند (استاندارد ملی شماره ۵۸۷۵).

آنالیز آماری

آزمایش‌های مربوط به مربوط به عکس‌العمل دو کپک به کاربرد نانو ذره گرافن، در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار طراحی شد و پس از انجام آنالیز واریانس یک‌طرفه بر روی داده‌ها، مقایسه میانگین‌ها با آزمون کمترین اختلاف معنی دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار Minitab 16 و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel 2007 انجام شد.

نتایج

با توجه به نتایج مربوط به تاثیر نانو ذره گرافن در مقادیر MIC و MFC، تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) جهت بررسی معنی‌دار بودن میزان غلظت‌های بازدارنده و کشنده نانوذره گرافن بر روی دو گونه قارچ *پنی‌سیلیوم سیترینوم* و *آسپرژیلوس نایجر* انجام گرفت. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می-گردد نتیجه تجزیه واریانس برای غلظت بازدارنده (MIC) از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار شده است (P = ۰/۰۳۹)، ولی برای غلظت کشنده (MFC) معنی‌دار نیست (P = ۰/۲۱۹).

جدول۱- نتایج تجزیه واریانس غلظت‌های بازدارنده و کشنده نانوذره گرافن در دو نوع قارچ

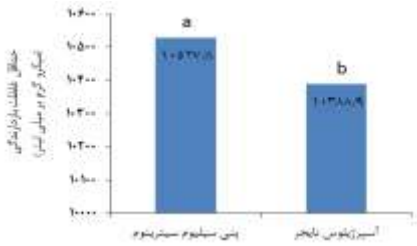
منابع تغییرات	درجه آزادی	مقدار P	
		MIC	MFC
نوع قارچ	۱	۰/۰۳۹*	۰/۲۱۹ns
خطای آزمایش	۴	-	-

*معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ns غیرمعنی‌دار

در نمودار ۱ مقایسه میانگین‌های غلظت بازدارندگی (MIC) نانو ذره گرافن با استفاده از روش LSD نشان

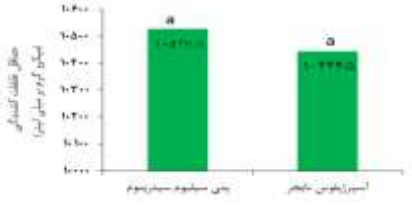
[1] Disk Diffusion Agar

داده است که دو قارچ از لحاظ میزان MIC با هم تفاوت دارند و میزان غلظتی از نانو ذره گرافن که موجب بازدارندگی رشد کپک *پنی‌سیلیوم سیترینوم* شده، از لحاظ آماری بیشتر از میزان غلظت بازدارنده برای رشد کپک *آسپرژیلوس نایجر* بوده است ($P<0.05$) به‌طوری که *پنی‌سیلیوم سیترینوم* در گروه آماری a و *آسپرژیلوس نایجر* در گروه آماری b قرار گرفت. میانگین‌های MIC نانوذره گرافن در *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم* به ترتیب ۱۰۳۸۸/۹±۴۸/۲ و ۱۰۵۲۷/۸±۶۳/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.



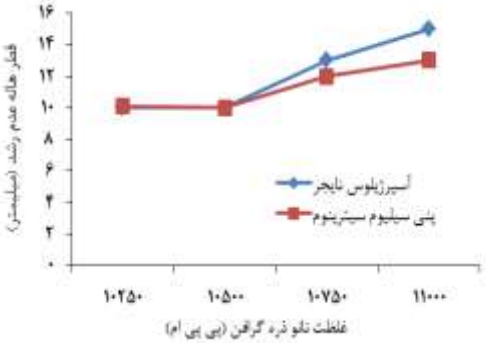
نمودار ۱- مقایسه میانگین‌های غلظت بازدارندگی (MIC) نانو ذره گرافن بر روی دو نوع قارچ مورد آزمایش با آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار (LSD)

مقایسه میانگین‌های غلظت کشندگی (MFC) نانو ذره گرافن به روی *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم* نشان داد تفاوت معنی‌دار آماری بین غلظت-های MFC برای این دو قارچ در این آزمایش وجود نداشته است و هر دو در یک گروه آماری قرار گرفتند. میانگین‌های MFC نانوذره گرافن در *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم* به ترتیب ۱۰۴۴۴/۵±۴۸/۱ و ۱۰۵۲۷/۸±۸۶/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (نمودار ۲).



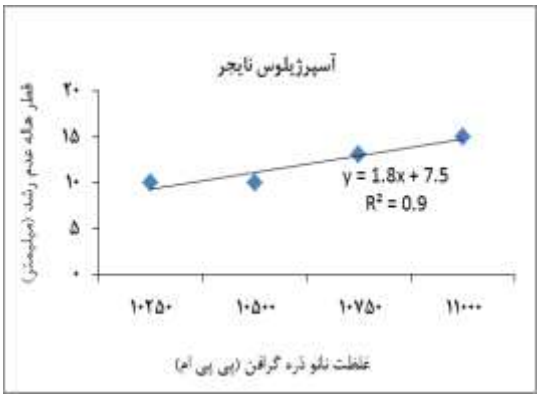
نمودار ۲- مقایسه میانگین‌های غلظت کشنده (MFC) نانو ذره گرافن بر روی دو نوع قارچ مورد آزمایش با آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار (LSD)

نتایج آزمون هاله عدم رشد نشان می‌دهد که در غلظت‌های پایین نانو ذره گرافن یعنی در غلظت‌های ۱۰۲۵۰ و ۱۰۵۰۰ پی‌پی‌ام، تفاوت محسوسی بین هاله عدم رشد دو کپک دیده نمی‌شود ولی با افزایش غلظت نانو ذره از ۱۰۵۰۰ پی‌پی‌ام به بالا، تفاوت دو کپک از لحاظ هاله عدم رشد بیش تر شد تا این که در غلظت-های بالا یعنی در غلظت ۱۱۰۰۰ پی‌پی‌ام این تفاوت کاملاً مشهود بود به‌طوری که هاله عدم رشد کپک *آسپرژیلوس نایجر* بیشتر از هاله عدم رشد کپک *پنی-سیلیوم سیترینوم* بود (نمودار ۳).

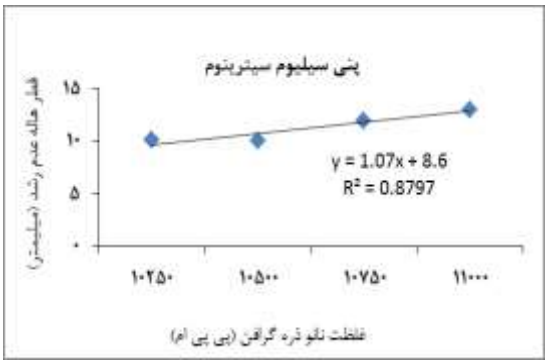


نمودار ۳- مقایسه اثر غلظت نانو ذره گرافن بر قطر هاله عدم رشد دو کپک *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم*

روند رگرسیونی تغییرات قطر هاله عدم رشد در برابر غلظت‌های مختلف نانو ذره گرافن برای هر کدام از کپک‌های *پنی‌سیلیوم سیترینوم* و *آسپرژیلوس نایجر* به طور جداگانه نشان داده شده است. همان‌طور که در این نمودارها ملاحظه می‌شود رابطه بین قطر هاله عدم رشد و غلظت نانو ذره گرافن به صورت یک معادله خطی درجه یک برازش داده شده است. یعنی با افزایش غلظت نانو ذره گرافن، قطر هاله عدم رشد نیز به صورت خطی افزایش یافته است تا این که در غلظت ۱۱۰۰۰ پی‌پی‌ام، قطر هاله به حداکثر خود رسیده است (نمودار ۴ و ۵). مقایسه دو نمودار نشان می‌دهد که شیب خط رگرسیون برای *آسپرژیلوس نایجر* بیشتر از *پنی‌سیلیوم سیترینوم* است، همچنین مقدار ضریب تعیین (R^2) در *آسپرژیلوس* بیشتر از ضریب تعیین *پنی‌سیلیوم* است.



نمودار ۴- تغییرات قطر هاله عدم رشد *آسپرژیلوس نایجر* در غلظت‌های مختلف نانو ذره گرافن



نمودار ۵- تغییرات قطر هاله عدم رشد *پنی‌سیلیوم سیترینوم* در غلظت‌های مختلف نانو ذره گرافن

بحث

بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش، حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) برای کپک *آسپرژیلوس نایجر* ۱۰۳۸۸/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای کپک *پنی-سیلیوم سیترینوم* ۱۰۵۲۷/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد (نمودار ۱). حداقل غلظت کشندگی (MFC) برای کپک *آسپرژیلوس نایجر* ۱۰۴۴۴/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای کپک *پنی‌سیلیوم سیترینوم* ۱۰۵۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (نمودار ۲). همچنین بررسی اثرات کاربرد غلظت‌های مختلف نانو ذره گرافن بر قطر هاله عدم رشد کپک‌ها در این آزمایش (نمودار ۳) نشان دهنده آن بود که تا غلظت ۱۰۵۰۰ پی‌پی‌ام، پاسخ هر دو گونه قارچ مورد آزمایش یکسان بود اما با بیشتر شدن غلظت نانو ذره، به تدریج تفاوت میان واکنش‌های دو گونه قارچ افزایش یافت تا این که در غلظت ۱۱۰۰۰ پی‌پی‌ام، این تفاوت به حداکثر خود رسید به طوری که بیشترین قطر هاله عدم رشد در قارچ *آسپرژیلوس نایجر* به ثبت رسید. با توجه به نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد *آسپرژیلوس نایجر* (نمودار ۴) مشخص شد که نانو ذره گرافن در غلظت ۱۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین مقدار با میانگین ۱۵ میلی‌متر و در غلظت ۱۰۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای کمترین مقدار با میانگین ۱۰ میلی‌متر بود. همچنین نتایج مربوط به اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد *پنی‌سیلیوم سیترینوم* (نمودار ۵) نشان داد که نانو ذره گرافن در غلظت ۱۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین مقدار با میانگین ۱۳ میلی‌متر و در غلظت ۱۰۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر دارای کمترین مقدار با میانگین ۹ میلی-متر بود. مجموعه نتایج مذکور به علاوه بیشتر بودن شیب خط رگرسیون و همچنین بالاتر بودن مقدار ضریب تعیین در نمودار مربوط به *آسپرژیلوس نایجر* نسبت به نمودار *پنی سیلیوم سیترینوم*، نشان دهنده حساسیت بالاتر کپک *آسپرژیلوس نایجر* در برابر کاربرد نانو ذره گرافن بود. دلیل این تفاوت را شاید بتوان مربوط به تفاوت در ساختار دیواره سلولی قارچ‌ها دانست، زیرا مکانسیم عمل این ترکیب همانند سایر نانوذرات بوده و از طریق تخریب دیواره قارچ نیز عمل می کند (Reeves et al., 2008).

کپک‌ها به‌ویژه قارچ‌های جنس *آسپرژیلوس* قادرند در سطح وسیعی مواد غذایی را آلوده کرده و سبب وارد آمدن خسارات فراوان به آنها شوند و مایکوتوکسین‌های خطرناکی همچون آفلاتوکسین تولید کنند (حبیبی و همکاران، ۱۳۹۶). با توجه به نتایج به‌دست آمده در این تحقیق مبنی بر حساسیت بارز کپک *آسپرژیلوس نایجر* در برابر نانو ذره گرافن، می‌توان این نانو ذره را به عنوان یک ماده ضد قارچ *آسپرژیلوس نایجر* پیشنهاد داد. علاوه بر آن نقش و همکاران (۱۳۹۲) اظهار داشتند به

دلیل ظهور مقاومت میکروبی به مواد ضدقارچی، تمایل به استفاده از نانوذرات روز به روز بیش تر می‌شود.

نتایج تحقیق حاضر علاوه بر این‌که نشان داد میزان حساسیت دو گونه کپک مورد آزمایش در برابر نانو ذره گرافن خصوصاً در غلظت‌های بالای نانو ذره، متفاوت بود همچنین مشخص نمود که واکنش این میکروارگانیسم‌ها به دوز یا غلظت نانو ذره بستگی دارد به‌طوری که با تغییر غلظت نانو ذره، پاسخ‌های رشد و نموی قارچ‌های مورد آزمایش در حال تغییر بود. این نتیجه با گزارشات سایر محققین در خصوص وابستگی مهار میکروارگانیسم‌ها به غلظت نانو ذرات به کار رفته، هماهنگی دارد (Kim et al., 2008; Nasrollahi et al., 2011). بررسی تأثیر نانوذره اکسید روی بر روی *آسپرژیلوس نیجر* در آزمایشی نشان داد که MIC آن بیشتر از ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد که با نتیجه تحقیق حاضر مطابقت دارد (Yousef and Danial, 2012).

در تحقیق انجام شده توسط نقش و همکاران (Naghsh et al., 2013) حداقل غلظت‌های مهارکننده و کشنده نانوذره نقره بر روی *آسپرژیلوس فومیگاتوس*[1] به ترتیب ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ پی پی ام گزارش گردید. نتایج مذکور با تحقیق حاضر مطابقت ندارد و نشان می‌دهد که نانوذره نقره خاصیت ضدقارچی بیشتری دارد. دلیل عمده آن می‌تواند اندازه ذرات آن باشد که ۱۰ نانومتر بوده است. در آزمایش دیگری مارتینز گوترز و همکاران (Martinez-Gutierrez et al., 2010) با ساخت ۱۳ نوع از نانو ذرات گرافن و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم و ترکیبی از این دو، فعالیت ضد میکروبی آن‌ها را بر علیه سویه‌های قارچی مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که نانو ذرات نقره در ابعاد ۲۵-۲۰ نانومتر بیشترین فعالیت ضد قارچی را بین سایر نانوذرات ساختگی دارا می‌باشند. هریک از نانو ذرات گرافن و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم به تنهایی فعالیت ضد قارچی کمی داشتند، اما زمانی که در طی دوره سنتز با یکدیگر ترکیب شدند فعالیت ضد قارچی آن‌ها افزایش یافت. در حالی که نانو ذرات گرافن با قطر ۱۰ نانومتر اثر مهاری ناچیزی بر روی قارچ‌هایی نظیر پنی‌سیلیوم داشتند. همچنین هاشمی و همکاران (۱۳۹۷) گزارش داده‌اند که نانوذره گرافن در غلظت های ۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر بر باکتری های *اشریشیاکلی*[2] و *استافیلوکوکوس اورئوس*[3] اثر سمیت داشته و میزان رشد آنها را کاهش داده‌است. جاوورسکی و همکاران (Jaworski et al., 2018) نیز نشان دادند که گرافن اکساید باعث کاهش رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* می‌شود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. آنها نشان دادند که خاصیت باکتری‌کشی گرافن هنگامی که با نانوذرات نقره به صورت کامپوزیت در می‌آید افزایش می‌یابد. نتایج تحقیقات اخیر نشان دهنده تأثیر این نانوذره بر روی باکتری‌ها می باشد که در راستای تحقیق حاضر می‌باشد، اما تحقیق زیادی بر روی قارچ‌ها در این زمینه انجام نگرفته تا بتوان مقایسه‌ای علمی انجام داد. حبیبی و همکاران (۱۳۹۵) تأثیر نانوذرات منیزیم و مس را بر روی *آسپرژیلوس نایجر* انجام دادند و نتایج نشان داد که به ترتیب MIC برای این دو نانوذره ۹/۴۲ و ۱۰/۶۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم و MFC به ترتیب ۹/۶۷ و ۱۰/۹۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود، هر چند نوع نانو ذره‌ها با گرافن متفاوت می‌باشند اما نتایج مشابه یکدیگر می‌باشند.

نانو ذرات در آزمایشات مختلف با مکانیسم‌های مختلفی، نقش مهاری و کنترل کننده خود بر روی میکروارگانیسم‌ها را ایفا می‌کند. به عنوان مثال خاصیت ضد قارچی نانو ذرات می‌تواند مربوط به تأثیر متقابل مولکول‌های پلی کاتیونی نانو ذرات با اجزای آنیونی دیواره سلولی میکروارگانیسم باشد و باعث تغییراتی در

[1] *Aspergillus fumigatus*

[2] *Escherichia coli*

[3] *Staphylococcus aureous*

نفوذ پذیری دیواره سلولی شود که در نتیجه آن بخشی از مواد داخل سلول به بیرون تراوش کرده و از ورود مواد غذایی به داخل آن جلوگیری می‌شود. نانو ذرات بعد از ورود به داخل سلول و پیوند با DNA از سنتز RNA و ساخت پروتئین‌ها جلوگیری می‌کنند. خاصیت ضد میکروبی نانو ذرات گستره وسیعی از میکروارگانیسم‌ها را که شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها می‌شود، در بر می‌گیرد (Heinlaan et al., 2008). کیم و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی فعالیت ضد قارچی نانو ذرات نقره گزارش نمودند که این نانو ذرات از طریق ایجاد اختلال در ساختار غشاء قارچ اثرات ضد قارچی خود را اعمال می‌کنند.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که نانوذره گرافن اثر ضد قارچی بر روی کپک‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم* داشت. بنابراین از نانوذره گرافن می‌توان به عنوان یک ماده ضد قارچی در صنایع غذایی استفاده کرد. نتایج غلظت مهارکننده رشد و غلظت کشندگی نشان داد که حساسیت کپک *آسپرژیلوس نایجر* از *پنی‌سیلیوم سیترینوم* بیشتر بود. دلیل این تفاوت را شاید بتوان مربوط به تفاوت در ساختار دیواره سلولی قارچ‌ها دانست. از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که نانو ذره گرافن می‌تواند در غلظت‌های کم با مهار نمودن رشد کپک‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم*، در صنایع غذایی مورد توجه قرار گیرد. نتایج مطالعه حاضر فرض این که کاربرد نانو ذره گرافن می‌تواند یک روش ساده و کم هزینه برای جلوگیری از رشد میکروب‌ها فراهم آورد را حمایت کند. پیشنهاد می‌گردد در ادامه مقایسه اثرات نانو ذره گرافن با آنتی بیوتیک-های معمول بر روی میکروارگانیسم‌های مختلف مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

۱. اکرمی مهاجری، فاطمه.، میثاقی، علی.، آخوندزاده بستی، افشین.، قیصری، حمیدرضا.، خسروی، علیرضا.، گندمی، حسن و ابراهیم‌نژاد، هادی. ۱۳۹۱. مهار رشد و تغییرات مورفولوژیکی *پنی سیلیوم سیترینوم* در پاسخ به اسانس آویشن شیرازی. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۷، شماره ۴، صفحات ۳۱۲-۳۰۷.

۲. حبیبی، نادر.، قیصری، حمیدرضا.، امین لاری، محمود و صداقتی، فاطمه. ۱۳۹۶. بررسی فعالیت ضدقارچی نانوذرات اکسید منیزیم و اکسید مس علیه گونه های مختلف آسپرژیلوس. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا، سال هفتم، شماره ۳، صفحات ۳۲۷-۳۱۷.

۳. سازمان ملی استاندارد ایران. ۱۳۸۲. نگهدارنده‌ها، تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC)، روش آزمون میکروبیولوژی. استاندارد شماره ۵۸۷۵.

۴. مرتضوی، علی.، زیرجانی، لیلا و طباطبایی یزدی، فریده. ۱۳۸۸. میکروبیولوژی غذایی کاربردی و آزمایشگاهی، چاپ اول، مؤسسه چاپ و انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات ۳۱۳-۲۷۵.

۵. مهرابیان، صدیقه.، بهزادی.، آزاده و محمد گنجی، شهلا. ۱۳۹۵. مطالعه بافتی، مولکولی و اثر سینرژیسم نانو ذرات گرافن اکسید و آنتی بیوتیک بر *اشریشیاکلی* جدا شده از تومورهای سرطان کولورکتال. فصلنامه فیزیولوژی و تکوین جانوری. جلد ۹، شماره ۳، صفحات ۶۴-۵۷.

۶. نقش، نوشین.، دودی، منیر و صفایی نژاد، زینب. ۱۳۹۲. مقایسه اثرات ضد قارچی نانو ذرات نقره با داروی فلوکونازول بر *آسپرژیلوس فومیگاتوس*. مجله علوم آزمایشگاهی، دوره هفتم، شماره ۲، صفحات ۱۴-۸.

۷. هاشمی، طاهره.، حبیبی، نادر.، گلی، هادی و هاشمی، احسان. ۱۳۷۹. سنتزنانو ذرات گرافن و بررسی اثرات ضد باکتریایی آن بر *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوک اورئوس*. مجله پژوهش های سلولی مولکولی (آماده انتشار).

۸. یحیی آبادی، سیما.، زیبانژاد، الناز و دودی، منیر. ۱۳۹۰. تأثیر تعدادی از عصاره‌های گیاهی بر روی رشد

دو گونه از قارچ *آسپرژیلوس*. فصل‌نامه داروهای گیاهی، سال دوم، شماره ۱، صفحات ۸۱-۶۹.

9. Akhavan, O. and Ghaderi, E. 2010. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. ACS Nano. 4: 5731-5736.

10. Akhavan, O., Ghaderi, E. and Shahsavar, M. 2013. Graphene nanogrids for selective and fast osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Carbon 59: 200-211.

11. Alexopoulos, C.J., Mins, C.W. and Blackwell, A. 1996. Introductory mycology. John Wiley and Sons, New York, 742 pp.

12. Deacon, J.W. 1997. Modern Mycology. Blackwell Sciences, London. 303 pp.

13.Geethalakshmi, R. and Sarada, D.V. 2012. Gold and Silver nanoparticles from Trainthema decandra: Synthesis, characterization and antimicrobial properties. Int J Nanomedicine. 7: 5375-5384.

14. Geim, A. K. and Novoselov, K.S. 2007. The Rise of Graphene. Nat Mater. 6: 183-191.

15. Geim, A.K. 2009. Graphene: Status and Prospects. Science. 324:1530-1534.

16. Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.C. and Kahru, A. 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO 2 to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus. Chemosphere. 71 (7): 1308-1316.

17. Heyrovska, R. 2008. Atomic structures of graphene, benzene and methane with bond lengths as sums of the single, double and resonance bond radii of carbon. https://arxiv.org/abs/0804.4086

18. Hummers, W.S. and Offeman, R.E. 1958. Preparation of graphite oxide. J Am Chem Soc. 80 (6): 1339-1339.

19. Jaworski, S., Wierzbicki, M., Sawosz, E., Jung, A., Gielerak, G., Biernat, J., Jaremek, H., Łojkowski, W., Woźniak, B., Wojnarowicz, J., Stobiński, L., Małolepszy, A., Mazurkiewicz-Pawlicka, M., Łojkowski, M., Kurantowicz, N. and Chwalibog, A. 2018. Graphene oxide-based nanocomposites decorated with silver nanoparticles as an antibacterial agent. Nanoscale Res Let. 23:13(1):116.

20. Juang, Z.Y., Wu, C.Y., Lu, A.Y., Su, C.Y., Leou, K.C., Chen, F.R. and Tsai, C.H. 2010. Graphene synthesis by chemical vapor deposition and transfer by a roll-to-roll process. Carbon. 48: 3169-3174.

21. Kim, K.J., Sung, W.S., Moon, S.K., Choi, J.S., Kim, J.G. and Lee. D.G. 2008. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. J Microbiol Biotechnol. 18(8): 1482-1484.

22. Klich, M.A. and Pitt, J.I. 1988. A laboratory guide to the common Aspergillus species and their teleomorphs, N.S.W, CSIRO Division of Food Processing, 115 pp.

23. Martinez-Gutierrez, F., Olive, P.L., Banuelos, A., Orrantia, E., Nino, N., Sanches, E.M., Ruiz, F., Bach, H. and Av-Gay, Y. 2010. Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. Nanomed Nanotech Biol Med. 6 (5): 681-688.

24. Montree, S., Pattarachai, S., Poramane, C., Tanas, S. and Patcharaporn, S. 2012. Synthesis and antifungal activity of reduced graphene oxide nanosheets. Carbon. 50 (14): 5156-5161.

25. Krishnamoorthy, K., Manivannan, G., Kim, S.J., Jeyasubramanian, K. and Premanathan, M. 2012. Antibacterial activity of Mgo nanoparticles based on lipid peroxidation by oxygen vacancy. J Nanopart Res. 14: 1063-1066.

26. Naghsh, N., Doudi, M. and Safaeinejad, Z. 2013. The antifungal activity of silver nanoparticles and fluconazole on *Aspergillus Fumigatus*. Med Lab J. 7 (2): 8-14.

27. Nasrollahi, A., Pourshamsian, K.H. and Mansourkiaee, P. 2011. Antifungal activity of silver anoparticles on some of fungi. Int J Nano Dim. 1(3): 233-239.

28. Noorbakhsh, F., Rezaie, S. and Shahverdi, A.R. 2011. Antimicrobial effects of silver nanoparticle alone and with combination of antifungal drug on dermatophyte pathogen *Thrichosporon rubrum*. International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics.https://pdfs.semanticscholar.org/ddf8/f556411555b54b59b703b48512fb39d80eeb.pdf
29. Novoselov, K.S., Falko, V.I., Colombo, L., Gellert, P.K., Schwab, M.G. and Kim, K. 2012. A roadmap for grapheme. Nature. 490: 192-200.
30. Padmavathy, N. and Vijayaraghavan, R. 2008. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles-an antimicrobial study. Sci Technol Adv Mater. 9 (3): 204-218.
31. Pashova, S., Slokoska, L., Krumova, E. and Angelova, M. 1999. Induction of polymethylgalacturonase biosynthesis by immobilized cells of *Aspergillus niger*. Enzyme Microbial Technol. 24: 535-540.
32. Pitt, J.I. 1988. A laboratory guide to common Penicillium species. 2nd ed. North ryde, N.S.W, CSIRO Division of Food Processing. 185 pp.
33. Rashidi, L. and Khosravi-Darani, K. 2011. The application of nanotechnology in food industries. Crit Rev Food Sci Nutr. 51: 723-730.
34. Reeves, J.F., Davies, S.J., Dodd, N.J. and Jha, A.N. 2008. Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO 2) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. Mutat Res. 640 (2): 113-122.
35. Yousef, J.M. and Danial, E.N. 2012. In vitro antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of zinc oxide and nano-particle zinc oxide against pathogenic strains. J Health Sci. 2(4): 38-42.
36. Zhang, L., Pornpattananangkul, D., Hu, C.M.J. and Huang, C.M. 2010. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. Curr Med Chem. 17 (6): 585-594.
37. Zhi-Gang, W., Su-Yun, Ch. and Li-Ming, C. 1993. Study on pectinase and sclreotium producing abilities of two kinds of *Aspergillus flavus* isolates from Zhejiang. Mycopathologia 121: 163-168.

Study of the antifungal effects of graphene nanoparticles on *Aspergillus niger* and *Penicillium citrinum*

AliAsghari M[1], Habibi N[2*], Rokhzadi A[3]

1. M.Sc of Food Science & Technology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

2. Department of Food Science & Technology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

3. Department of Agronomy, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

***Corresponding author:** *naderhabibi45@yahoo.com*

Received: 19 July 2018 Accepted: 20 October 2018

Abstract

This study was conducted to study the antifungal effects of graphene nanoparticles on *Aspergillus niger* and *Penicillium citrinum*. Different concentrations of graphene nanoparticles were investigated to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum fungicidal concentration (MFC) and inhibition zone diameter. The results showed that the concentration of graphene nanoparticle which inhibited the growth of *Penicillium* mold was statistically more than that of *Aspergillus niger*. On the other hand, there was no difference between the concentrations of MFC for these two fungi. The MIC results for *Aspergillus niger* and *Penicillium citrinum* were 10388.9 and 10527.8 µg/ml respectively. Evaluation of the growth inhibition zone showed that up to 10500 ppm, there was no difference between the inhibition zones diameter of two microorganisms. However, with an increase in the concentration of graphene nanoparticle, the difference between the zone diameters in the two molds increased, so that the diameter of the inhibition zone of *Aspergillus niger* in higher nanoparticle concentrations was more than that of *Penicillin citrinum*. According to the results of this study it can be concluded that the effect of graphene nanoparticles on *Aspergillus niger* was higher than that of *Penicillin citrinum*.

Keywords: *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum*, Graphene Nanoparticles.