

سنتر زیستی نانوذرات نقره توسط گونه استاندارد قارچ پنسیلیوم کرایسوژنوم

دکتر حامد برآبادی: داروساز، پژوهشگر مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. barabadi_87@yahoo.com
*دکتر سهیلا هنری: دانشیار، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران (*نویسنده مسئول). shonary@mazums.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: نانوذرات نقره در علم پزشکی کاربردهای بسیاری دارد که اثرات وابسته به اندازه ذره ای دارند. از طرفی نیاز روز افزون به روش های قابل اطمینان برای سنتز نانوذرات که به محیط زیست آسیب وارد نکنند، سبب شده است تا محققانی که در این زمینه فعالیت می کنند، به سیستم های بیولوژیک روی آورند. به همین دلیل تلاش برای یافتن میکروارگانیسم های جدیدی که بتوانند نانوذرات را با ابعاد کوچک تری تولید کنند، همچنان ادامه دارد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی سنتز زیستی نانوذرات نقره توسط قارچ پنسیلیوم کرایسوژنوم PTCC 5037 معادل ATCC 10003 بود.

روش کار: گونه استاندارد قارچ پنسیلیوم کرایسوژنوم در محیط کشت مایع czapek dox broth کشت داده شد و سپس به ۱۰۰ سی سی از محیط کشت فاقد قارچ (سوپرناتانت)، ۱۰۰ سی سی محلول ۳ میلی مولار نیترات نقره اضافه گردید و در دمای ۲۸ سانتی گراد برای مدت ۲۴ ساعت دور از نور انکوبه گردید. پس از آن، تولید نانوذرات به صورت ماکروسکوپی، با تغییر رنگ محیط از زرد به قهوه ای و ارزیابی نانوذرات تشکیل شده با استفاده از سنجش Max UV، اندازه میانگین قطر نانوذرات (DLS)، پتانسیل زتا، شاخص پراکندگی نانوذرات (Polydispersity Index) و میکروسکوپ الکترونی SEM و AFM انجام گرفت. جداسازی نانوذرات با دستگاه اولتراسانتریفوژ با دور ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

یافته ها: افزودن محلول نیترات نقره به سوپرناتانت سبب ایجاد رنگ قهوه ای شد که به صورت ماکروسکوپی تشکیل نانوذرات نقره را تأیید کرد. Max سوپرناتانت حاوی نانوذرات نقره با روش UV در حدود ۴۲۰ نانومتر ثبت شد که به عنوان یک روش دستگاهی تشکیل نانوذرات نقره را تأیید می کرد. بنابراین پروتئین ها و آنزیم های آزاد شده توسط قارچ پنسیلیوم کرایسوژنوم، قابلیت احیای یون های فلزی نقره و تبدیل آن ها به نانوذرات نقره را دارند. تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی SEM و AFM، نانوذرات نقره را به شکل کروی با اندازه میانگین قطر ۴۰ نانومتر و با یکنواختی بالا نشان داد. **نتیجه گیری:** این مطالعه نشان داد که گونه استاندارد قارچ پنسیلیوم کرایسوژنوم، قابلیت احیای یون های فلزی نقره و تولید نانوذرات نقره را دارد. همچنین چون نانوذرات تشکیل شده در خارج از سلول، عاری از اجزاء و ترکیبات سلولی غیر ضروری هستند، می توانند مستقیماً در کاربری های گوناگون مورد استفاده قرار گیرند.

کلیدواژه ها: سنتز زیستی، نانوذرات نقره، پنسیلیوم کرایسوژنوم.

مقدمه

آلی شناخته شده اند که به صورت درون سلولی یا برون سلولی عمل می کنند (۱-۴). نانوذرات نقره در علم پزشکی جهت درمان سوختگی، تولید مواد دندان، پوشش های فلزی، اصلاح و تصفیه آب، محلول های محافظت کننده از اشعه آفتاب، گندزدا و مواد ضد عفونی کننده، کاربرد دارند. همچنین دارای فعالیت ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد باکتریایی، سرکوب کننده التهاب، فعالیت ضد پلاکتی و ضد رگ زایی می باشند (۵). اگر چه برخی مطالعات نشان می دهد که نانوذرات نقره با اندازه ذره ای ۲۵ نانومتر دارای بیشترین فعالیت آنتی باکتریال هستند، ولی در

نانوتکنولوژی در دهه آینده تأثیرات گسترده ای را در زمینه های مختلف زندگی بشر از جمله داروسازی و پزشکی خواهد گذاشت. یکی از عرصه های مهم تحقیقات در نانوتکنولوژی، سنتز نانوپارتنیکل های مختلف است. امروزه نیاز روز افزون به روش های قابل اطمینان برای سنتز نانوذرات که به محیط زیست آسیب وارد نکنند، سبب شده است تا محققانی که در این زمینه فعالیت می کنند، به سیستم های بیولوژیک روی آورند. بسیاری از ارگانیسم ها چه به صورت تک سلولی و چه پر سلولی، برای تولید نانوذرات غیر

نانوذرات نقره با هدف یافتن یک میکروارگانیسم مناسب برای تولید صنعتی نانوذرات نقره، ارزیابی شد. نتایج این مطالعه در اداره ثبت اختراعات به شماره ثبت اختراع ۷۴۵۹۷ مورخ ۱۳۹۱/۰۱/۲۷ ثبت گردید.

روش کار

مواد: نمک نیترات نقره (AgNO_3) و ساکارز از شرکت Merck آلمان و عصاره مخمر از شرکت Liofilchem ایتالیا خریداری شد. آب مقطر دوبار تقطیر شده در آزمایشگاه آنالیز دستگاهی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه گردید. گونه استاندارد قارچ پنسیلیوم کرایسوژنوم PTCC 5037 معادل ATCC 10003 از دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه گردید.

دستگاه‌ها: دستگاه روتاری شیکر (IKA[®] L1000 IC, Germany) جهت انکوباسیون و کشت قارچ استفاده گردید. دستگاه UV-vis spectrophotometer, اسپکتروسکوپی (Genesys2, USA) جهت سنجش ماکزیمم جذب UV نانوذرات نقره استفاده گردید. دستگاه Zeta sizer شرکت Malvern انگلستان برای اندازه گیری سایز، شاخص پراکندگی (PDI) و پتانسیل زتای نانوذرات نقره استفاده گردید. میکروسکوپ الکترونی SEM مدل ۲۳۶۰ (Leo Oxford, UK) و میکروسکوپ AFM (Veeco Innova, USA) برای بررسی مورفولوژی نانوذرات نقره استفاده گردید. دستگاه اولتراسانتریفوژ (HERMLE[®] Table Top Refrigerated Centrifuge 236K, Germany) جهت جداسازی نانوذرات نقره استفاده گردید.

روش: قارچ پنسیلیوم کرایسوژنوم PTCC 5037 معادل ATCC 10003 از در محیط کشت مایع czapek dox broth (متشکل از ۳ گرم عصاره مخمر و ۲۱ گرم ساکارز در ۱ لیتر آب مقطر) کشت داده شد و پس از انکوباسیون در روتاری شیکر در دمای ۲۸ سانتی گراد با دور ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ روز، قارچ رشد یافته از محیط کشت بوسیله سانتریفوژ در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه جدا

صورتی که نانوذرات کوچکتر از ۱۰ نانومتر باشند، در این صورت علاوه بر تداخلات در روند تقسیم سلولی باکتری و سرکوب زنجیره تنفسی، اثرات الکترونیکی نیز ایجاد می نماید که قدرت واکنش نانوپارتیکل ها را تشدید و تقویت می کند. بنابراین مشهود است که اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره کاملاً وابسته به سایز می باشد (۶). لذا تلاش برای یافتن میکروارگانیسم های جدیدی که بتوانند نانوذرات را با ابعاد کوچک تری تولید کنند، همچنان ادامه دارد.

تاکنون، هنری و همکاران در چندین مطالعه تولید نانوذرات نقره را به روش شیمیایی (۷) و نیز زیست فناوری (۴-۱) از گونه های مختلف وحشی پنسیلیوم و باکتری های مختلف جدا شده از خاک و فاضلاب، در اندازه های گوناگون گزارش کردند. با توجه به اینکه در روش شیمیایی سنتز نانونقره، مواد شیمیایی سمی نظیر سدیم بورات استفاده می گردد (۷) که خطرات خاص خود و آلودگی های زیست محیطی را به دنبال دارند، لذا بیوسنتز نانو ذرات با کمک میکروب ها یک راهکار جدید در جهت غلبه بر این مشکلات است که در این روش از محیط کشت بدون سلول برای تولید نانو ذرات استفاده می کنیم و کارایی آنزیم های برون سلولی در تولید نانو ذرات بررسی می شوند. از طرف دیگر برای اینکه این سیستم زیستی همانند تولید داروی پنسیلین از قارچ پنسیلیوم کرایسوژنوم به شکل صنعتی در بیاید، نیازمند یافتن میکروارگانیسمی است که توانایی بالایی برای تولید نانوذرات فلزی داشته باشد و از طرفی ساپروفیت و غیر بیماری زا باشد.

بسیاری از مطالعات تاکنون تولید نانوذرات را از میکروارگانیسم هایی نظیر *آسپرژیلوس فلاووس* (۸)، *آسپرژیلوس نایجر* (۹)، *اشیریشیا کولی* (۴)، *باسیلوس سابتیلیس* (۱۰) و غیره گزارش کرده اند که با توجه به اینکه جزو میکرو ارگانیسم های بیماری زا هستند، برای ورود به صنعت با محدودیت همراه هستند. در مطالعه حاضر، گونه استاندارد قارچ پنسیلیوم کرایسوژنوم PTCC 5037 معادل ATCC 10003 که ساپروفیت و غیر بیماری زا است، برای بررسی قابلیت سنتز زیستی



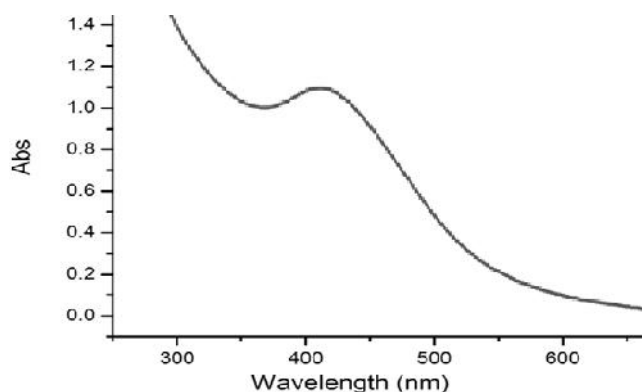
تصویر ۱- ارلن A حاوی محیط کشت شامل آنزیم های قارچی می باشد که فاقد نانوذرات نقره است و به رنگ زرد کم رنگ است. ارلن B محیط کشت مشابه ارلن A است که نانوذرات نقره در آن تشکیل شده است و به رنگ قهوه ای درآمده است.

نقره با استفاده از سمپلر برداشته شد و بر روی گریدهای مخصوص میکروسکوپ الکترونی SEM و AFM ریخته شد و پس از خشک شدن، توسط میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. جداسازی نانوذرات با دستگاه اولتراسانتریفوژ با دور ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. جهت شستشوی سطح نانونقره رسوب کرده، نانوذرات در آب مقطر دوبار تقطیر شده پراکنده گردید و دوباره با دستگاه اولتراسانتریفوژ با دور ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۵ دقیقه رسوب داده شد. این عمل ۳ بار تکرار شد تا سطح نانونقره حاصل کاملاً شسته شود.

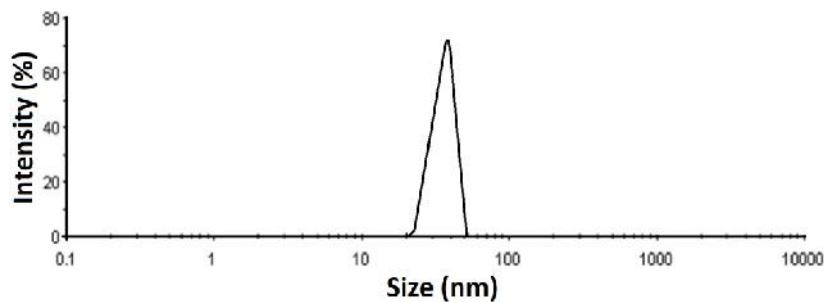
یافته‌ها

پس از افزودن محلول ۳ میلی مولار نیترات نقره به سوپرناتانت، رنگ محیط کشت از زرد به قهوه‌ای تغییر کرد که نشان دهنده تولید نانوذرات است

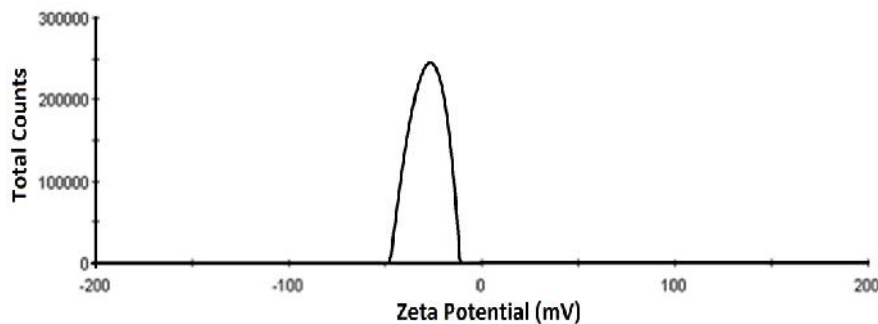
گردید. سپس به ۱۰۰ سی سی از محیط کشت (سوپرناتانت)، ۱۰۰ سی سی محلول ۳ میلی مولار نیترات نقره اضافه گردید و در دمای ۲۸ سانتی گراد برای مدت ۲۴ ساعت دور از نور در روتاری شیکر انکوبه گردید. از آنجا که نیترات نقره حساس به نور است، همه ارلن ها و ظروف توسط فویل آلومینیومی پیچیده شد تا نور سبب تخریب محلول نیترات نقره نشود. پس از ۲۴ ساعت، تولید نانوذرات به صورت ماکروسکوپی، با تغییر رنگ محیط از زرد به قهوه ای و بررسی Max با روش UV اثبات و اندازه ذرات، شاخص پراکندگی نانوذرات (PDI) و پتانسیل زتا که معرف پایداری نانوذرات است، توسط دستگاه Zeta sizer تعیین گردید. همچنین مورفولوژی نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی SEM و AFM بررسی گردید. بدین صورت که زیر هودلامینار و با رعایت شرایط استاندارد، ۱۵ میکرولیتر از محلول نانوذرات



تصویر ۲- نمودار جذب UV نانوذرات نقره که در حدود ۴۲۰ نانومتر ماکزیمم جذب دارد.



تصویر ۳- نمودار اندازه میانگین قطر نانوذرات نقره تولید شده که اندازه ذره ای ۴۰ نانومتر را نشان می دهد.



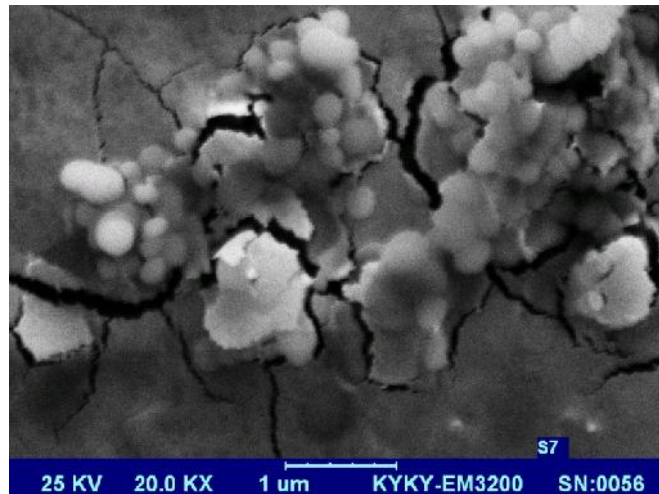
تصویر ۴- نمودار پتانسیل زتا نانوذرات نقره که پتانسیل زتای آن در -۲۸ میلی ولت ثبت گردید.

چسبیده گرفته شده و نشان داد که نانوذرات نقره بصورت کروی تشکیل شده است.

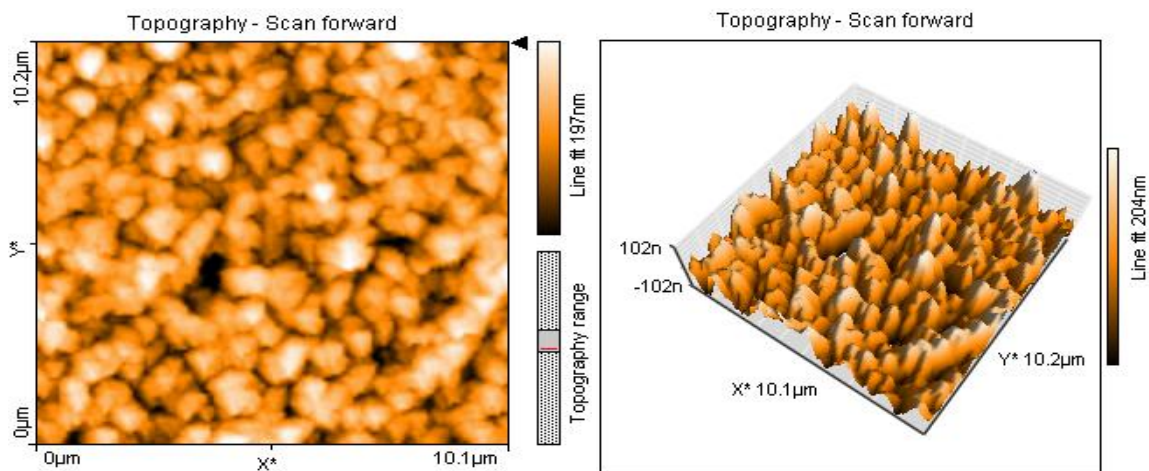
بحث و نتیجه گیری

در یک دیدگاه کلی، نتایج به دست آمده حاکی از این است که گونه استاندارد قارچ پنسیلیوم کرایسوژنوم توانایی تولید خارج سلولی نانوذرات نقره را دارد. هدف اصلی از این مطالعه، تولید نانوذرات نقره به صورت برون سلولی برای بررسی آسان تر و ایجاد شرایط مناسب برای تولید بهینه نانوذرات نقره بود. نانوذرات نقره تولید شده از راه زیستی، نسبت به ذرات تولید شده شیمیایی، به دلیل عدم وجود باقیمانده های سمی آلی در سطح، ایجاد حداقل ضایعات و مواد غیر مصرفی در فرآیند تولید، حجم بالای تولید و تکرار پذیری، ارزشمند است (۴-۱). تغییر رنگ محیط کشت حاوی نانوذرات کلوئیدی نقره از زرد به قهوه ای ناشی از پدیده ای است که به آن پلاسمون رزونانس خطی (Surface Plasmon Resonance) می گویند (تصویر ۱). در واقع الکترون های آزاد موجود در نانوذرات نقره با جذب نور مرئی برانگیخته می شوند و به یک تراز انرژی بالاتر می

(تصویر ۱). ارن A حاوی محیط کشت شامل آنزیم های قارچی می باشد که فاقد نانوذرات نقره است و به رنگ زرد کم رنگ است. ارن B محیط کشت مشابه ارن A است که نانوذرات نقره در آن تشکیل شده است و به رنگ قهوه ای درآمده است. در مرحله بعد برای اثبات تولید نانوذرات به بررسی طول موج Max با روش UV پرداختیم که Max در حدود ۴۲۰ نانومتر ثبت شد (تصویر ۲). اندازه میانگین قطر نانوذرات نقره تولید شده در این مطالعه، با استفاده از دستگاه Zeta sizer (Malvern, England) در pH=۸، ۴۰ نانومتر ثبت گردید (تصویر ۳). همانطور که در تصویر ۳ مشخص است، منحنی به شکل زنگوله ای شکل است که نشان دهنده پراکندگی یکنواخت نانوذرات نقره تشکیل شده بود. همچنین شاخص پراکندگی نانوذرات (PDI)، ۰/۲ ثبت گردید که نشان دهنده یکنواختی بالای محلول کلوئیدی نانوذرات می باشد. همچنین پتانسیل زتا، -۲۸ میلی ولت ثبت گردید که حاکی از پایداری مناسب محلول کلوئیدی نانوذرات است (تصویر ۴). تصاویر ۵ و ۶ توسط میکروسکوپ الکترونی SEM و AFM از سطح نانوذرات در حالت به هم



تصویر ۵- تصویر نانوذرات نقره تولید شده توسط میکروسکوپ الکترونی SEM در حالت به هم چسبیده.



تصویر ۶- تصویر نانوذرات نقره تولید شده توسط میکروسکوپ الکترونی AFM.

در یک طول موج مشخص برانگیخته می شوند و یک ماکزیمم جذب را خواهیم داشت. این ویژگی مختص نانوذرات است و محلول حاوی کاتیون فلزی، در آن طول موج بیشینه جذب را ندارد. بنابراین بررسی طول موج Max با روش UV روشی برای شناسایی تشکیل نانوذرات به کار می رود. تصویر ۲ نشان داد که Max در حدود ۴۲۰ نانومتر بود که این یافته با نتایج سایر محققین هم خوانی دارد (۵، و ۷). اندازه میانگین قطر نانوذرات نقره تولید شده ۴۰ نانومتر و شاخص پراکندگی نانوذرات (PDI)، ۰/۲ به دست آمد (تصویر ۳). برای یک نمونه کلئوئید یکنواخت نانوذرات، PDI بین ۰/۱ تا ۰/۷ است. نمونه های غیر یکنواخت PDI بالاتر از ۰/۷ تا ۱ دارند که نشان دهنده یک

روندو ولی چون الکترون در حالت برانگیخته ناپایدار است، بنابراین دوباره وقتی به تراز انرژی پایه بر می گردد، یک فوتونی را از خود ساطع می کند.

از آنجایی که برانگیختگی الکترون های آزاد وقتی در معرض نور قرار می گیرند به شکل رزونانسی است، بنابراین نوری که ساطع می کنند در محدوده مرئی و به رنگی خاص دیده می شود (۱). مثلاً نانوذرات طلا نور قرمز مایل به بنفش را ساطع می کنند (۳). این پدیده کمک می کند تا به لحاظ میکروسکوپی به تشکیل نانوذرات پی برده شود. وقتی نانوذرات کلئوئیدی در محدوده تابش طول موج UV قرار می گیرند، با توجه به ماهیت نانوذرات و بنابر اصل پلاسمون رزونانس سطحی،

استفاده نمودند (۱۳). ولی در مطالعه حاضر از محیط کشت بدون توده سلولی قارچ استفاده شد که موجب می شود پس از تشکیل نانوذرات، نیازی به فیلتراسیون و جداسازی نانوذرات از توده سلولی نباشد.

یکی از معایب استفاده از قارچ ها در سنتز زیستی نانوذرات نقره، مدت زمان طولانی تشکیل نانوذرات نقره است. موکورجی و همکاران نشان دادند که بیوسنتز نانوذرات فلزی توسط قارچ ها حدود ۱۲۰ ساعت طول می کشد (۱۴)، در حالی که در مطالعه حاضر، این زمان به ۲۴ ساعت رسیده است. همچنین در بسیاری از مطالعات قبلی، توانایی قارچ ها در احیای کاتیون های فلزی نانوذرات نقره در حد غلظت یک میلی مولار از نمک نیترات نقره گزارش شده است (۱، ۵ و ۱۰)، در حالی که در این پژوهش گونه استاندارد قارچ پنسیلیوم کرایسوژنوم، قابلیت احیای نانوذرات نقره را در غلظت سه میلی مولار از نمک نیترات نقره نشان داد که این امر بیانگر تولید بیشتر نانوذرات فلزی در مقایسه با گزارشات قبلی است. همچنین از دیگر مزایای مطالعه حاضر این است که برخلاف روش سنتز زیستی درون سلولی با استفاده از برخی قارچ ها نظیر قارچ *Verticillium* که طی آن نیاز به استخراج نانوذرات با استفاده از روش هایی نظیر اولتراسونیکاسیون دارد (۱۵)، در اینجا نانوذرات نقره بدون تقبل هزینه و مشکلات ناشی از استخراج می توانند مورد استفاده قرار بگیرند.

همچنین در مطالعه حاضر از قارچ ساپروفیت و غیر بیماری زای پنسیلیوم کرایسوژنوم استفاده شده است، در حالی که در بسیاری از مطالعات گذشته برای تولید نانوذرات، از میکروب های به شدت بیماری زای *شریشیا کولی* (۴)، *باسیلوس سابتیلیس* (۱۰)، *کاندیدا آلبیکنس* (۱۶) و *پسودوموناس آئروژینوزا* (۱۷) که وجود آن ها در فرآورده های دارویی و غذایی جزو آلودگی های خطرناک به شمار می رود. همچنین تولید نانوذرات از گونه های اسپرژیلوس (۹ و ۸) که تولید مواد سرطان زایی نظیر آفلاتوکسین به آن ها نسبت داده می شود، از دلایلی است که مانع از

نمونه نامناسب است (۲). پتانسیل زتای بالاتر از ۳۰ میلی ولت و کمتر از ۳۰- میلی ولت نشان دهنده پایداری بالای نانوذرات است (۱۱ و ۱۲). پتانسیل زتا نانوذرات نقره در این مطالعه ۲۸- میلی ولت به دست آمد (تصویر ۴). بنابراین عامل الکترواستاتیک به تنهایی نمی تواند پایداری نانوذرات را تأمین کند. اما به هر حال به جز نیروهای دافعه و جاذبه ذکر شده، اثرات دیگری نیز وجود دارد که در پایداری نانوذرات سهیم هستند. اثر ممانعت فضایی (Steric hindrance) به وسیله جذب مواد پلیمری بر روی سطح نانوذرات ایجاد می شود. می توان تصور کرد که لایه جذب شده در اطراف هر ذره، مانند سدی از نزدیک شدن ذرات به یکدیگر و انجام عمل انعقاد جلوگیری می کند. به عنوان مثال، هنری و همکاران (۷) برای پایداری نانوذرات نقره تولید شده به روش شیمیایی از کیتوسان استفاده کردند. اعتقاد بر این است که وجود آنزیم ها و پپتید های باند شده در سطح نانوذرات نقره در روش زیستی با استفاده از میکروارگانیزم ها علاوه بر احیای Ag^+ و تبدیل آن به فرم Ag^0 ، در پایداری نانوذرات نیز نقش دارند (۲). برخلاف پایداری الکترواستاتیک، در این مورد نیروی دافعه با محدوده طولانی وجود نداشته و هنگام تماس مولکول ها با یکدیگر، ذرات در معرض نیروهای جاذبه قرار می گیرند. در حالی که در حالت عادی نیروی دافعه الکترواستاتیک باعث دفع آن ها به وسیله یکدیگر می شوند. در عمل ترکیبی از دافعه الکترواستاتیک و ممانعت فضایی باعث ایجاد یک حالت پایدار در نانوذرات نقره تولید شده در این مطالعه شده است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM و AFM از سطح نانوذرات نقره نشان داد که نانوذرات نقره بصورت کروی تشکیل شده است. با توجه به خصوصیات مناسب نانوذرات فلزی تولید شده توسط میکروارگانیزم ها، بیوسنتز نانوذرات توسط میکروب ها اخیراً به عنوان یک جایگزین مناسب جهت تولید انبوه نانوذرات مورد توجه قرار گرفته است. به طور مثال، در ایران سجادی و همکاران از مایع حاوی توده سلولی قارچ *فوزاریوم اگریسپوریوم* جهت تولید نانوذرات نقره در مقیاس آزمایشگاهی

3. Honary S, Gharaei-Fathabad E, Barabadi H. Fungus-mediated synthesis of gold nanoparticles: a novel biological approach to nanoparticle synthesis. *J Nanosci Nanotechnol*. 2013;13:1427-30.
4. Honary S, Gharaei-Fathabad E, Khorshidi Paji Z, Eslamifar M. A novel biological synthesis of gold nanoparticle by *Enterobacteriaceae* family. *Trop J Pharm Res*. 2012;11:887-91.
5. Kalishwaralal K, Deepak V, Ram Kumar Pandian S, Kottaisamy M, Barathmani Kanth S, Kartikeyan B, et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;77:257-62.
6. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, et al. The bacterial effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005;16:2346-53.
7. Honary S, Ghajar K, Khazaeli P, Shalchian P. Preparation, characterization and antibacterial properties of silver-chitosan nanocomposites using different molecular weight grades of chitosan. *Trop J Pharm Res*. 2011;10:69-74.
8. Jain N, Bhargava A, Majumdar S, Tarafdar JC, Panwar J. Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: A mechanism perspective. *Nanoscale*. 2011;3:635-41.
9. Jaidev LR, Narasimha G. Fungal mediated biosynthesis of silver nanoparticles, characterization and antimicrobial activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;81: 430-3.
10. Dhandapani P, Maruthamuthu S, Rajagopal G. Bio-mediated synthesis of TiO₂ nanoparticles and its photocatalytic effect on aquatic biofilm. *J Photochem Photobiol B*. 2012;110:43-9.
11. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - a review (Part 1). *Trop J Pharm Res*. 2013;12:255-64.
12. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - a review (Part 2). *Trop J Pharm Res*. 2013;12:265-73.
13. Sajadi G, Shojaei A, Fazeli MR, Amini J, Jamalifar H. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by *Fusarium exisporium* in laboratory scale. *Donyay-e-Microbeha J*. 2010;1:44-47. Persian.
14. Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Ahmad A, Islam Khan M, Kumar R, et al. Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*. *Chem Biochem*. 2002;3:461-3.
15. Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar SR, Islam Khan M, et al. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis. *Nano Lett*. 2001;1:515-9.
16. Chauhan A, Zubair S, Tufail S, Sherwani A,

ورود این میکروب ها به عرصه صنعتی تولید نانوذرات می شود. تاکنون مکانیسم های مختلفی برای بیوسنتز نانوذرات فلزی گزارش شده است (۱۹ و ۱۸). توالی های پلی پپتیدی مشخصی در پروتئین های مترشحه از باکتری /شریشیا کولی شناسایی شده است که مسئول بیوسنتز نانوذرات طلا به می باشد (۱۹). این مطالعه نیز نشان داد که پروتئین ها و آنزیم های آزاد شده توسط قارچ پنسیلیوم کرایسوزنوم، قابلیت احیای یون های فلزی نقره و تولید برون سلولی نانوذرات نقره را دارند و از آنجایی که این قارچ در حال حاضر برای تولید صنعتی پنسیلین استفاده می شود، لذا کاندیدای مناسبی برای ورود به صنعت تولید نانوذرات فلزی می باشد.

یکی از محدودیت های این پژوهش، عدم بررسی نقش فاکتور های مؤثر و تداخل آن ها در اندازه ذره ای نانوذرات بود و صرفاً قابلیت تولید نانو نقره از قارچ پنسیلیوم کرایسوزنوم ارزیابی شد. بنابراین پیشنهاد می شود با استفاده از مدل سازی ریاضی و کمومتری کس، نقش فاکتورهای مختلف دخیل در اندازه ذره ای بررسی گردد تا با تغییر فاکتورهای مؤثر شرایط بهینه تولید این نانوذرات در اندازه ذره ای دلخواه مشخص گردد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران که با نظارت و داوری مستندات این پژوهش، ما را در ثبت اختراع مطالعه حاضر یاری رساندند، قدردانی می نمایم.

منابع

1. Honary S, Barabadi H, Gharaei-Fathabad E, Naghibi F. Green synthesis of silver nanoparticles induced by the fungus *Penicillium citrinum*. *Trop J Pharm Res*. 2013;12:7-11.
2. Honary S, Barabadi H, Gharaei-Fathabad E, Naghibi F. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium citrinum* and *Penicillium waksmanii*. *Dig J Nanomater Bios*. 2012;7:999-1005.

Sajid M, Raman SC, Azam A, Owais M. Fungus-mediated biological synthesis of gold nanoparticles: potential in detection of liver cancer. *Int J Nanomed*. 2011;6:2305-19.

17. Hussein MI, Abd El-Aziz M, Badr Y, Mahmoud MA. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2007;67:1003-6.

18. Reith F, Etschmann B, Grosse C, Moors H, Benotmane MA, Monsieurs P, et al. Mechanisms of gold biomineralization in the bacterium *Cupriavidus metallidurans*. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106:17757-62.

19. Shankar S, Rai A, Ankamwar B, Aingh A, Ahmad A, Sastry M. Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. *Nat Mater*. 2004;3:482-8.

Biological synthesis of silver nanoparticles using standard fungus of *Penicillium chrysogenum*

Hamed Barabadi, Pharm.D, Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. barabadi_87@yahoo.com

***Soheila Honary**, Pharm.D, PhD. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (*Corresponding author). shonary@mazums.ac.ir

Abstract

Background: Silver nanoparticles have a wide range of applications in medical sciences which their effects depend on their size. Besides, there is an ever-growing need to develop environmentally benign nanoparticles synthesis processes which created an interesting area for the researchers studying in this field. So, attempts have been made to find new microorganisms that fabricate the nanoparticles in smaller size. This study aimed to evaluate a green process for production of silver (Ag) nanoparticles synthesized using *Penicillium chrysogenum* (PTCC 5037 = ATCC 10003).

Methods: The standard colonies of *Penicillium chrysogenum* were cultured in Czapek dox broth. The supernatant of the broth was examined for the ability to produce silver nanoparticles. For that, 100mL of silver nitrate solution at a concentration of 3mM was added to 100mL of the supernatant and incubated for 24 hours at 28°C. Then, the formation of nanoparticles were confirmed by alteration of culture from yellow to brown. The synthesized silver nanoparticles were characterized by UV-visible spectroscopy, Dynamic Light Scattering (DLS), Zeta potential, Polydispersity Index (PDI), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM) for particle size and shape. The synthesized nanoparticles were centrifuged at 20,000rpm by ultracentrifuge for 5 minutes to separate nano-silvers from the solution.

Results: Addition of *Penicillium citrinum* supernatant to aqueous AgNO₃ solution led to the appearance of brown color in solution after 24h of reaction, indicating the formation of silver nanoparticles. The UV-Vis spectrum exhibit an absorption band at around 420nm suggesting the formation of silver nanoparticles. Hence, the secreted proteins and enzymes are responsible for reduction of silver ions to convert them to silver nanoparticles. SEM and AFM photographs showed that the silver nanoparticles formed were fairly uniform in size with a spherical shape and average diameter of 40nm.

Conclusion: The study showed that the standard fungus of *Penicillium chrysogenum* has the ability of cationic silver ions to produce silver nanoparticles. Moreover, as nanoparticles formed extracellularly, they are pure and free of cellular particles which help them to be used straightly for various applications.

Keywords: Biological synthesis, Silver nanoparticles, *Penicillium cherysogenum*.