



## سنتز زیستی نانوذرات نقره و سلنیم با استفاده از مایع رویی قارچ لنتینوس ادودس و مشخصه یابی ساختاری و ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی آن

حامد برآبادی: استادیار بیوتکنولوژی دارویی، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران (\*نویسنده مسئول)

barabadi@sbmu.ac.ir

حسین وحیدی: استاد بیوتکنولوژی دارویی، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

مهديه عامری شه رضا: مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران

مها سلطانی: دکتری عمومی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

کامیار جونکی: دانشجوی PhD بیوتکنولوژی دارویی، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

سالار صادقیان آبادی: دانشجوی PhD بیوتکنولوژی دارویی، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

مریم بابایی ثابت: دکتری عمومی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

سنتز زیستی،

نانوذرات سلنیم،

نانوذرات نقره،

قارچ لنتینوس ادودس،

اثر آنتی اکسیدانی

**زمینه و هدف:** سنتز زیستی نانوذرات فلزی به دلیل عدم ایجاد آلودگی های زیست محیطی و مقرون به صرفه بودن یکی از موضوعات مورد توجه پژوهشگران در نانوتکنولوژی است. هدف از این مطالعه بررسی توانایی سنتز برون سلولی نانوذرات نقره و سلنیم با استفاده از سوپرناتانت قارچ لنتینوس ادودس و ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی این نانوذرات می باشد.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی، ابتدا قارچ لنتینوس ادودس در محیط کشت مایع ساپروکستروز برات (Sabouraud Dextrose) کشت داده شد و قارچ های رشد یافته از محیط کشت جدا گردید. سپس به ۱۰۰ میلی لیتر از سوپرناتانت، ۱۰۰ میلی لیتر محلول ۱ میلی مولار نمک فلزی (نمک نقره و سلنیم) اضافه گردید و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد برای مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردید. در ادامه تشکیل نانوذرات نقره و سلنیم درون سوپرناتانت بررسی شد. سپس در گام اول از طریق مشاهدات میکروسکوپی تغییر رنگ سیستم واکنش و اثر تیندال بیوستنتز نانوذرات نقره و سلنیم درون سوپرناتانت بررسی ساختاری نانوذرات تولید شده با استفاده از انواع آنالیزهای میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانس (Field emission scanning electron microscopy-FE-SEM)، تفرق نور پویا (Dynamic light scattering-DLS) و طیف سنجی مادون قرمز (Fourier-transform infrared spectroscopy-FT-IR) بررسی شدند. در نهایت اثر آنتی اکسیدانی نانوذرات تولید شده با روش سنجش مهار رادیکال های آزاد 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** قارچ لنتینوس ادودس توانست نانوذرات نقره و سلنیم را به ترتیب با میانگین قطر هیدرودینامیک ۹۱.۷۹ و ۸۵.۷۵ نانومتر و شاخص پراکندگی ۰.۵۶ و ۰.۴۳۴ در pH برابر ۱۰ تولید کند. براساس تصاویر میکروسکوپ الکترونی FE-SEM، نانوذرات یا مورفولوژی کروی سنتز شدند. آنالیز FT-IR وجود گروه‌های عاملی مختلف روی سطح نانوذرات سنتز شده را نشان داد. همچنین نانوذرات نقره و سلنیم در غلظت تیم میلی مولار به ترتیب ۱.۵±۴۹.۰۴ و ۴۹.۸۱±۱.۷۹ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH را مهار کردند.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که قارچ لنتینوس ادودس توانست به عنوان عامل احیاء کننده با احیاء یون های نقره و سلنیم، نانوذرات نقره و سلنیم را به روش برون سلولی سنتز کند. همچنین نانوذرات سنتز شده نشان دادند که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قابل ملاحظه هستند.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت کننده:** حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Barabadi H, Vahidi H, Ameri Shah Reza M, Soltani M, Jounaki K, Sadeghian-Abadi S, Babaei Sabet M. Biosynthesis of Silver and Selenium Nanoparticles Using *Lentinus edodes* Mushroom Supernatant and Structural Characterization and Evaluation of Their Antioxidant Activity. *Razi J Med Sci.* 2025(9 Sep);32.104.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the CC BY-NC-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.en>).

\*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 4.0 صورت گرفته است.



## Biosynthesis of Silver and Selenium Nanoparticles Using *Lentinus edodes* Mushroom Supernatant and Structural Characterization and Evaluation of Their Antioxidant Activity

- Hamed Barabadi:** Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (\* Corresponding Author) [barabadi@sbmu.ac.ir](mailto:barabadi@sbmu.ac.ir)
- Hossein Vahidi:** Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- Mahdieh Ameri Shah Reza:** Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran
- Maha Soltani:** Doctor of Pharmacy, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- Kamyar Jounaki:** PhD Student, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- Salar Sadeghian-Abadi:** PhD Student, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- Maryam Babaei Sabet:** Doctor of Pharmacy, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Abstract

**Background & Aims:** Nanobiotechnology represents an interdisciplinary field that integrates the principles of biotechnology and nanotechnology to design and develop novel functional nanomaterials with broad applications in medicine, pharmaceuticals, agriculture, environmental remediation, and industrial processes. One of the most actively investigated areas within this field is the biosynthesis of metal nanoparticles with dimensions in the range of 1–100 nm. This approach has gained considerable attention because biologically mediated synthesis routes offer significant advantages over conventional physicochemical methods, including reduced energy requirements, elimination of toxic chemical reagents, and improved environmental compatibility. Moreover, biosynthesis is generally more sustainable and cost-effective, while enabling the production of nanoparticles with enhanced biocompatibility and functional surface chemistry, which are particularly desirable for biomedical and therapeutic applications. Among various biological approaches, fungus-mediated synthesis of metal nanoparticles is particularly promising because fungi are capable of producing large quantities of extracellular biomolecules that act as reducing and stabilizing agents. However, the use of certain fungal species is limited by their toxicity or lack of safety for human-related applications. Therefore, the identification and utilization of safe, non-toxic fungi capable of synthesizing metal nanoparticles with controlled size distribution and morphology remains a critical and emerging area of research. *Lentinus edodes* is a widely consumed medicinal mushroom with well-documented therapeutic properties and a strong safety profile. The present study aimed to evaluate the feasibility of extracellular synthesis of silver and selenium nanoparticles using the culture supernatant of *L. edodes*. Additionally, the antioxidant activities of the resulting mycosynthesized nanoparticles were investigated and comparatively analyzed.

**Methods:** In this experimental study, *L. edodes* was initially cultivated in Sabouraud Dextrose Broth (SDB) under controlled conditions, after which the fungal biomass was separated from the culture medium. Subsequently, 100 mL of a 1 mM aqueous metal salt solution containing either silver or selenium ions was mixed with 100 mL of the obtained fungal supernatant and incubated at 28 °C for 48 h to facilitate extracellular nanoparticle synthesis. The formation of silver and selenium nanoparticles in the supernatant was systematically examined. Preliminary confirmation of nanoparticle biosynthesis was achieved through macroscopic observations, including characteristic color changes of the reaction mixture and evaluation of the Tyndall effect to verify colloidal dispersion. Comprehensive physicochemical characterization of the biosynthesized nanoparticles was then performed using field-emission scanning electron

### Keywords

Biological synthesis,  
Selenium nanoparticles,  
Silver nanoparticles,  
*Lentinus edodes*,  
Antioxidant effect

Received: 01/03/2025

Published: 09/09/2025

microscopy (FE-SEM), dynamic light scattering (DLS), and Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). Finally, the antioxidant potential of the synthesized nanoparticles was assessed using the DPPH free radical scavenging assay.

**Results:** The successful biosynthesis of silver and selenium nanoparticles was initially indicated by a distinct color change of the reaction mixtures to brown and orange, respectively, which is characteristic of nanoparticle formation due to surface plasmon resonance phenomena. The presence of a stable colloidal system was subsequently verified by observation of the Tyndall effect, confirming the uniform dispersion of nanoparticles in the solution. In the next step, the mycofabrication of nanoparticles was confirmed by employing DLS, FE-SEM, and FT-IR. The fungal species *L. edodes* demonstrated effective biosynthetic capability, producing silver and selenium nanoparticles with mean hydrodynamic diameters of 91.79 nm and 85.75 nm, respectively. The corresponding polydispersity index (PDI) values were 0.56 for silver nanoparticles and 0.434 for selenium nanoparticles, indicating moderate size distribution under alkaline conditions (pH 10). Based on FE-SEM images, nanoparticles were synthesized with a spherical morphology. FT-IR analysis revealed the presence of various functional groups on the surface of the biosynthesized nanoparticles, indicating the involvement of fungal-derived biomolecules in their formation. These functional groups are associated with conjugated biomolecules that act as surface capping and stabilizing agents around the nanoparticles. Such biomolecular coatings play a crucial role in maintaining the stability of the nanoparticle colloidal system by preventing aggregation. Moreover, these fungal biomolecules are likely to modulate the biological activity and performance of the nanoparticles by influencing their surface chemistry and interactions with biological systems. Furthermore, at a concentration of 0.5 mM, the biosynthesized silver and selenium nanoparticles exhibited notable antioxidant activity, scavenging  $49.04 \pm 1.50\%$  and  $49.81 \pm 1.79\%$  of DPPH free radicals, respectively, indicating their comparable free radical inhibition capacity.

**Conclusion:** The findings of this study demonstrate that *L. edodes* is capable of extracellularly synthesizing silver and selenium nanoparticles by acting as a biological reducing agent, facilitating the reduction of silver and selenium ions into their corresponding nanoscale forms. The mycosynthesized nanoparticles exhibited notable antioxidant activity, representing their potential biomedical relevance. The biological performance of these nanosized materials is influenced by multiple physicochemical parameters, including particle size, morphology, surface chemistry, and the nature of the associated capping biomolecules. Although the nanoparticles displayed significant antioxidant activity under *in vitro* conditions, comprehensive *in vivo* investigations are essential to validate their antioxidant efficacy within biological systems. Furthermore, future animal-based studies are required to determine the pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of these nanoparticles, which are significant for assessing their safety and therapeutic applicability.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

### Cite this article as:

Barabadi H, Vahidi H, Ameri Shah Reza M, Soltani M, Jounaki K, Sadeghian-Abadi S, Babaei Sabet M. Biosynthesis of Silver and Selenium Nanoparticles Using *Lentinus edodes* Mushroom Supernatant and Structural Characterization and Evaluation of Their Antioxidant Activity. *Razi J Med Sci.* 2025(9 Sep);32:104.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the CC BY-NC-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.en>).

**\*This work is published under CC BY-NC-SA 4.0 licence.**

## مقدمه

با توجه به ظهور خواص مفید در مقیاس نانو و تفاوت ویژگی نانوذرات سنتز شده با توجه به اندازه و شکل و سایر خصوصیات فیزیکوشیمیایی، سنتز نانوذرات مختلف، در طول زمان برای محققین دغدغه‌ای جدی بوده است. ساخت نانوذرات یکی از بخش‌های مورد توجه در رشته‌های نانوتکنولوژی و نانوبیوتکنولوژی است. در میان نانوذرات متعدد، نانوذرات فلزی به دلیل خواص کاربردی جدید، توجه بیشتری را به خود جلب کرده‌اند. تاکنون روش‌های مختلفی از جمله سنتز فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی برای سنتز نانوذرات فلزی توسط محققان توسعه یافته است (۱، ۲).

هر کدام از این روش‌ها مزایا و معایب خود را دارند. با این حال، رویکرد بیولوژیکی که به روش سنتز سبز مشهور است، به دلیل فواید چشمگیرش در دهه‌های گذشته توجه بیشتری را به خود جلب کرده است. در سنتز سبز، فرآیند سنتز نانوذرات فلزی توسط منابع بیولوژیکی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها و قسمت‌های مختلف گیاهان انجام می‌گیرد. استفاده از منابع طبیعی برای ساخت نانوذرات فلزی، دوستدار محیط زیست است و هزینه‌ی کمتری دارد.

در مقایسه بین روش‌های ذکر شده در بالا، رویکرد بیولوژیکی پایدارترین مسیر برای سنتز نانوذرات فلزی و رویکردی کم‌ضررتر برای جامعه فعلی و نسل آینده است (۱، ۳، ۴). از معایب قابل توجه روش‌های فیزیکی و شیمیایی می‌توان به انرژی‌بر بودن، پرهزینه بودن و ایجاد پسماندهای شیمیایی سمی اشاره کرد. یکی دیگر از مزایای روش‌های بیولوژیکی، توانایی سنتز مؤثر نانوذرات در مورفولوژی‌ها و اندازه‌های متعدد، با اصلاح عوامل ساده مانند دما، اسیدیته، مدت زمان واکنش و مقدار عوامل کاهش دهنده و تثبیت کننده است. تنوع سنتزی که با روش‌های بیوژنیک انجام می‌شود، نسبت به سایر استراتژی‌ها قابل کنترل‌تر است (۵، ۶).

سنتز سبز نانوذرات فلزی با دو رویکرد اصلی صورت می‌گیرد، سنتز خارج سلولی و یا سنتز درون سلولی. با این حال، روش‌های خارج سلولی به دلیل ایجاد امکان استخراج آسان‌تر نانوذرات فلزی ترجیح داده می‌شوند (۷). در رویکرد سبز، منابع بیولوژیکی مانند قارچ‌ها،

باکتری‌ها، گیاهان و جلبک‌ها، موجودات طبیعی هستند که می‌توانند برای تولید نانوذرات واسطه شوند. در این میان این نکته حائز اهمیت است که منبع بیولوژیکی مورد استفاده سمیت نداشته باشد و غیربیماری‌زا باشد، تا در جهت استفاده‌های مرتبط با فرآورده‌های دارویی و غذایی مشکل‌ساز نشود (۴).

تاکنون منابع مختلف بیولوژیکی برای بیوسنتز نانوذرات فلزی گزارش شده است. به عنوان مثال، سیتراراسو و همکاران نانوذرات سلنیم را از عصاره آبی گیاه سروپوژیا بالبوژا (*Ceropegia bulbosa*) با میانگین اندازه ذره ای ۵۵.۹ نانومتر و مورفولوژی کروی سنتز کردند و نشان دادند که نانوذرات سلنیم در طی ۴۸ ساعت با متوسط غلظت مهارتی (IC<sub>50</sub>) معادل ۳۴ میکروگرم بر میلی لیتر اثر سمیت سلولی بر علیه رده سلولی MDA-MB-231 دارند. همچنین رشد دو سویه باکتری پاتوژن باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) و اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) توسط این نانوذرات در حداکثر غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۰.۴۷ ± ۱۷ و ۱.۴۱ ± ۱۵ میلی متر مهار شد. این در حالی است که آنتی بیوتیک متی سیلین به عنوان کنترل باعث ایجاد هاله‌های عدم رشد با قطر ۰.۸۱ ± ۱۴ و ۰.۸۱ ± ۵ میلی متر به ترتیب در محیط کشت حاوی *B. subtilis* و *E. coli* شد (۸). در مطالعه ریاض و همکاران، فعالیت ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی نانوذرات نقره سنتز شده توسط باکتری لاکتوباسیلوس برویس (*Lactobacillus brevis* - *L. brevis*) مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه نانوذرات نقره با میانگین اندازه ذره ای ۴۵ نانومتر و مورفولوژی کروی با استفاده از باکتری *L. brevis* سنتز گردید و فعالیت ضد باکتریایی این نانوذره با استفاده از روش‌های انتشار از دیسک و تعیین حداقل غلظت مهارتی (Minimum inhibitory concentration - MIC) بر روی باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده دارای اثر ضد باکتریایی علیه باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب با حداقل غلظت مهارتی ۸/۲ و ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است (۹).

سال های اخیر از منابع بیولوژیکی مورد توجه جهت سنتر نانوذرات فلزی بوده‌اند (۱۳). قارچ ها به طور کلی به عنوان محصولات مفید با کاربردهای متعدد در صنایع غذایی و بهداشتی در نظر گرفته می‌شوند. در این میان، قارچ مورد استفاده در این مطالعه، لنتینوس ادودس، یکی از قارچ‌های پرورش‌یافته و پرمصرف در سراسر جهان است. امروزه با توجه به بروز پیچیدگی بیشتر در علم پزشکی و پدیده‌هایی مانند مقاومت آنتی بیوتیکی، دانشمندان در جهت جست و جوی جایگزین‌هایی برای درمان و پیشگیری از بیماری‌ها برآمده‌اند. قارچ لنتینوس/ادودس از نظر تغذیه‌ای غنی است. این قارچ حاوی مواد معدنی متعدد و ویتامین ها است که آن را به یک منبع بالقوه‌ی تغذیه تبدیل می‌کند. قارچ لنتینوس/ادودس حاوی ماکرو و ریز مغذی های ضروری و همچنین بسیاری از ترکیبات فعال زیستی از جمله پلی ساکاریدها، آنتی اکسیدان‌ها، فیبر غذایی و ارگوسترول است. ترکیبات زیست فعال می‌توانند برای حفظ سلامتی کاربران و پیشگیری از بیماری ها مفید باشند. قارچ لنتینوس/ادودس حاوی فنل ها، پلی ساکاریدها و استرول ها است که در عملکردهای بدن نقش دارند و در نتیجه سلامت افراد را بهبود می‌بخشد (۱۴). از ترکیبات فعال زیستی این قارچ می‌توان در جهت سنتر نانوذرات فلزی بهره گرفت که در این مطالعه پتانسیل آن جهت تولید نانوذرات سلنیم و نقره به صورت برون‌سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

نانوذرات سلنیم تاکنون فعالیت‌های ضد میکروبی، ضد سرطانی، آنتی اکسیدانی و مهارکننده‌ی آنزیمی را نشان داده‌اند (۱۵). ذرات سلنیم در اندازه نانو به دلیل ویژگی‌های مزیتی که نسبت به شکل حجیم دارند، مثل دوز کم، سمیت کم و واکنش‌پذیری بهتر، برای کاربردهای زیادی استفاده می‌شوند که مطالعات متنوعی حول این محور تاکنون انجام شده است (۱۶). (۱۷)

در خصوص کاربردهای مفید نانوذرات نقره، می‌توان در درجه اول، به نقش آن‌ها در حوزه‌ی پزشکی و سلامت اشاره کرد. نانوذرات نقره به طور قابل توجهی

در مطالعه دیگر، نوری و همکاران در مطالعه ای به بررسی خصوصیات ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتر شده از گیاه نعناعی آبی (*Mentha aquatica*) پرداختند. در این بررسی نانوذرات نقره با میانگین اندازه ذره ای ۴۵ نانومتر و مورفولوژی کروی با استفاده از عصاره گیاه *Mentha aquatica* سنتر شد و فعالیت ضد باکتریایی این نانوذره با استفاده از روش تعیین MIC بر روی دو باکتری گرم منفی شامل *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آروژینوزا* و دو باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره سنتر شده دارای اثر ضد باکتریایی علیه باکتری های *سودوموناس آروژینوزا*، *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب با حداقل غلظت مهاری ۲/۲، ۵۸، ۲۰ و ۱۹۸ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است (۱۰). همچنین، الحربی و همکاران نانوذرات نقره را با استفاده از آنزیم لاکاز خالص سازی شده از قارچ *آلترناریا (Alternaria arborescens)* با اندازه ذره ای کمتر از ۱۰۰ نانومتر و مورفولوژی کروی سنتر کردند (۱۱). در مطالعه دیگر، سودا و همکاران نانوذرات نقره را با استفاده از آنزیم کراتیناز استخراج شده از باکتری *سراثیا (Serratia ficaria)* با اندازه ذره‌ای ۱۴ تا ۴۴ نانومتر و مورفولوژی کروی سنتر کردند (۱۲).

در میان منابع بیولوژیکی مورد استفاده برای تولید نانوذرات، هرکدام دارای خواص منحصر به فرد و ویژگی‌های مفید خود هستند؛ قارچ‌ها نیز از این قاعده مستثنی نیستند. قارچ ها توانایی کمک به سنتر بیولوژیکی نقره و سلنیم را در مسیر خارج سلولی و درون سلولی دارند. از دیگر ویژگی‌های قارچ‌ها این است که کشت آن‌ها در شرایط مختلف قابل دسترسی است، از جمله در مقیاس صنعتی یا آزمایشگاهی. دلیل ویژگی ذکر شده وجود میسلیموم در آن‌ها است که قابلیت مقاومت در برابر شرایط سخت را ایجاد می‌کند. همچنین قابل ذکر است که یکی از ویژگی های منحصر به فرد قارچ ها توانایی آن‌ها در ترشح مقادیر زیادی آنزیم های مفید برای فرآیند تشکیل نانوذرات فلزی است. با توجه به خصوصیات ذکر شده قارچ‌ها در

استفاده از سانتریفیوژ در دور ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه از محیط کشت جدا شدند. سپس به ۱۰۰ میلی‌لیتر از سوپرناتانت (فاقد سلول‌های قارچ)، ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ۱ میلی‌مولار نمک فلزی (سدیم سلنیت یا نیترات نقره) اضافه کرده و بلافاصله در ارلن‌های جداگانه به pH های ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ رسانیده شد و متعاقباً در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. در ادامه تشکیل نانوذرات درون سوپرناتانت بررسی گردید. برای اثبات تولید نانوذرات در این روش، از طریق مشاهده ماکروسکوپی تغییر رنگ از زرد به نارنجی برای نانوذرات سلنیم و تغییر رنگ از زرد به قهوه‌ای برای نانوذرات نقره استفاده گردید. هم‌زمان برای بررسی اثر تیندال با استفاده از یک لیزر در صورت تشکیل نانوذرات و ایجاد یک سیستم کلوئیدی، مسیر لیزر در محتوای کلوئیدی قابل‌رؤیت خواهد بود و به لحاظ ماکروسکوپی نشان دهنده تشکیل یک سیستم کلوئیدی می‌باشد. در ادامه مشخصه‌های ساختاری نانوذرات ارزیابی شد.

#### بررسی مشخصه‌های ساختاری نانوذرات نقره و

**سلنیم:** جداسازی نانوذرات با دستگاه اولتراسانتریفیوژ مدل L90k ساخت شرکت Beckman کشور آمریکا با دور ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. جهت شستشوی سطح نانوذرات رسوب کرده، در آب مقطر دیونیزه پراکنده گردیدند و دوباره با دستگاه اولتراسانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۳۰ دقیقه رسوب داده شدند. این عمل ۳ بار تکرار گردید تا سطح نانوذرات حاصل کاملاً شسته شد. بررسی مورفولوژی نانوذرات از طریق عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (Field emission scanning electron microscopy -FE-SEM) انجام شد. برای آماده‌سازی نمونه جهت عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی، ابتدا یک قطره از کلوئید نانوذرات سنتز شده بر روی گریدهای مسی پوشش داده شده با کربن قرار داده شد و در دمای اتاق خشک گردید و سطح نمونه به‌وسیله یک‌لایه فوق نازک از آلیاژ طلا-پالادیوم پوشش داده شد تا رسانای جریان الکتریکی شود. سپس از میکروسکوپ الکترونی

اثراتی مانند پاسخ ضد میکروبی وسیع الطیف، خواص ضد سرطانی و سایر اهداف درمانی دارند و همچنین قادر به تشکیل نانو ساختارهای منحصر به فرد و متنوع و تولید کم هزینه هستند (۱۸، ۱۹). علاوه بر این مطالعات مختلفی نشان داده است که نقره در مقیاس نانو خواص ضد ویروسی و ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی هم دارد. در مجموع می‌توان گفت که نانوذرات نقره ابزاری کارآمد برای کاربردهای زیست پزشکی متعددی مانند ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد ویروسی، کاتالیزوری، بهبود زخم و پانسمان، ایمپلنت، مهندسی بافت، درمانی ضد سرطان و دستگاه‌های پزشکی (کاتتر، پروتز، پیوند عروقی) است (۲۰-۲۲). با توجه به خواص مفید و بسیار نانوذرات مذکور، در این مطالعه، از سوپرناتانت قارچ *لنتینوس/دودس* جهت سنتز نانوذرات نقره و سلنیم استفاده شده است و اثر آنتی‌اکسیدانی این نانوذرات سنتز شده به روش سبز، مورد بررسی قرار گرفت.

#### روش کار

این پژوهش از نوع بنیادی بوده که به روش تجربی انجام شد.

**مواد و محیط‌های کشت استفاده شده:** همه مواد استفاده شده شامل سدیم سلنیت، نیترات نقره، پودر (DPPH) (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) و محیط کشت ساپرو دکستروز براث (SDB - Sabouraud - Dextrose Broth) و محیط کشت ساپرو دکستروز آگار (Sabouraud dextrose agar - SDA) از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا خریداری شد.

**تهیه سویه قارچ مورد استفاده:** قارچ *لنتینوس/دودس* از هرباریم آزمایشگاه قارچ گروه بیوتکنولوژی دارویی دانشکده داروسازی شهید بهشتی تهیه شد.

**سنتز برون سلولی نانوذرات نقره و سلنیم با استفاده از سوپرناتانت قارچ *لنتینوس/دودس*:**

ابتدا قارچ *لنتینوس/دودس* در محیط کشت مایع کشت ساپرو دکستروز براث کشت داده شد و پس از انکوباسیون در دمای ۲۸ سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ روز، قارچ‌های رشد یافته با

محلول به‌عنوان کنترل استفاده شد. جهت انجام آزمون به ۲.۵ میلی لیتر از هر یک از رقت‌های نمونه مورد ارزیابی مقدار یک میلی لیر محلول DPPH اضافه گردید و در کنار آن‌ها محلول بلانک و کنترل نیز آماده شد. محلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در محلی تاریک و در دمای اتاق نگهداری شدند. پس از گذشت این مدت جذب آن‌ها در طول موج ۵۱۸ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتوفتومتر UV-vis اندازه‌گیری شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد DPPH} = \frac{OD_c - (OD_s - OD_b)}{OD_c} \times 100$$

در فرمول فوق،  $OD_c$  میزان جذب کنترل،  $OD_s$  میزان جذب نمونه و  $OD_b$  میزان جذب بلانک می‌باشد. جهت اندازه‌گیری میزان جذب نمونه، بلانک و کنترل، ابتدا دستگاه اسپکتوفتومتر UV-Vis توسط اتانول ۹۰ درجه کالیبر گردید. آزمایش برای هر رقت ۳ بار تکرار شد. همچنین در این آزمایش ویتامین C به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. در نهایت به‌وسیله نرم‌افزار R ورژن ۳.۴.۱ و با استفاده از آزمون ANOVA اثر آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف با یکدیگر مقایسه شدند و در صورت معنادار بودن این آزمون ( $P < 0.05$ )، آزمون تعقیبی بونفرونی (Bonferroni) برای شناسایی جفت گروه‌های معنادار به کار گرفته شد.

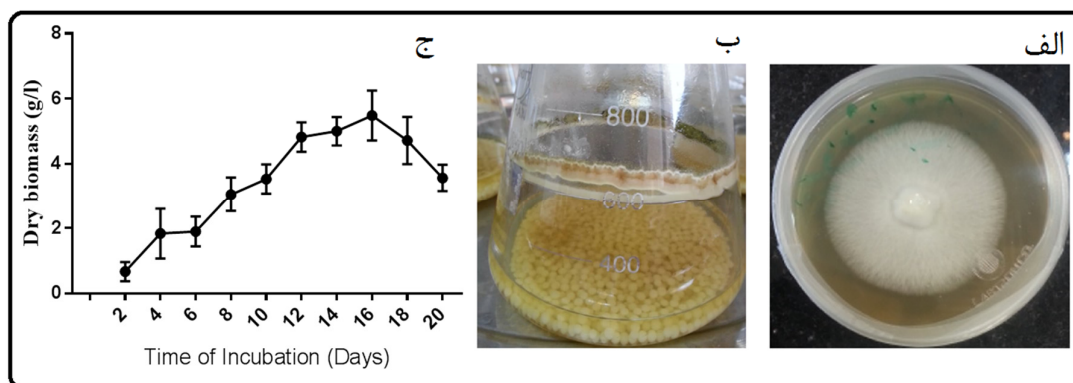
### یافته‌ها

**تعیین میزان رشد میسلیمی قارچ در محیط کشت مایع ساپروتوکستروز برات (SDB) با استفاده از روش وزن توده خشک:** شکل ۱ رشد قارچ لنتینوس/ادودس را در محیط کشت جامد و مایع در مرحله رویشی نشان می‌دهد (الف و ب). به دلیل وجود فاز تأخیر در نمودار رشد قارچ لنتینوس/ادودس و حصول یکنواختی رشد، شروع نمودار رشد از روز دوم می‌باشد. شکل ۱(ج) نمودار منحنی رشد میسلیمی در محیط کشت مایع SDB نشان می‌دهد که قارچ لنتینوس/ادودس به دلیل ایجاد توده زیستی (پلت) و نحوه رشد، تغییرات زیادی در وزن‌های اندازه‌گیری

FE-SEM مدل MIRA3 ساخت کشور جمهوری چک با قدرت ۱۵ کیلوولت جهت تهیه عکس استفاده شد. به‌علاوه، برای ارزیابی یون‌ها و مولکول‌های به‌کاررفته در ساختار نانوذرات از روش پراش اشعه ایکس طیف تحلیلی عناصر موجود در نمونه تهیه شد. همچنین ارزیابی اندازه ذره ای نانوذرات و شاخص پراکندگی (Polydispersity Index) نانوذرات در حالت کلئیدی به‌وسیله دستگاه Zetasizer مدل ۳۶۰۰ ساخت کشور انگلیس با زاویه پراکندگی (Scattering angle) ۹۰ درجه انجام گردید. در ادامه برای ارزیابی گروه‌های عاملی بیومولکول‌های متصل به سطح نانوذرات سنتز شده از پودر خشک نانوذرات با استفاده از دستگاه FT-IR [Fourier-transform infrared spectroscopy IR] (FT-IR) مدل Cary 630 ساخت کشور آمریکا آنالیز انجام شد. جهت آماده‌سازی نمونه مقدار یک میلی گرم از پودر خشک نانوذرات با نسبت ۱ به ۱۰۰ با KBr مخلوط کرده و سپس مقداری از آن را در قالب فلزی مخصوص ریخته و با دستگاه پرس هیدرولیک تحت فشار ۵ تن بر سانتی‌متر مربع قرار گرفت تا یک قرص به دست آید. قالب فلزی حامل قرص درون دستگاه قرار گرفت و طیف FT-IR در محدوده ۴۵۰ تا  $\text{cm}^{-1}$  ۴۰۰۰<sup>۱</sup> سنجیده شد.

### ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات نقره و سلنیم

آزمون آنتی‌اکسیدانی DPPH برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات نقره و سلنیم انجام شد. ابتدا جهت تهیه محلول استاندارد DPPH، ۰.۰۰۶۰ گرم از پودر آن توسط ترازوی با دقت  $10^{-4}$  توزین گردید و با اتانول ۹۰ درجه در بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری به حجم رسانده شد تا نهایتاً محلولی با غلظت ۰.۳ میلی مولار از DPPH حاصل گردید. محلول تهیه‌شده از DPPH همواره در محیط تاریک و در یخچال نگهداری شد. سپس جهت تهیه محلول بلانک، ۲.۵ میلی لیتر از رقت‌های تهیه‌شده از نمونه مورد ارزیابی با یک میلی لیر اتانول ۹۰ درجه مخلوط گردید و به‌عنوان بلانک به‌کاربرده شد. همچنین جهت تهیه محلول کنترل، ۲.۵ میلی لیر اتانول ۹۰ درجه با یک میلی لیر محلول DPPH مخلوط گردید و از این



**شکل ۱- الف)** رشد قارچ *لنتینوس/ادوس* در محیط کشت جامد SDA، **ب)** رشد قارچ *لنتینوس/ادوس* در محیط کشت مایع SDB، **ج)** نمودار رشد و تولید توده زیستی قارچ *لنتینوس/ادوس* در محیط کشت مایع SDB در یک دوره ۲۰ روزه. کلیه آزمایش‌ها ۳ بار تکرار و نتایج به صورت  $\text{Means} \pm \text{SD}$  نشان داده شده است.

شده نشان می‌دهد که در کشت مایع بازیدیومیست‌ها طبیعی می‌باشد. جداسازی فازهای چهارگانه رشد میکروارگانیسم به دلیل نحوه رشد قارچ در محیط مایع نمی‌تواند به طور کامل روند رشد میکروارگانیسم را در فازهای مختلف نشان دهد، اما با توجه به نمودار رشد فازهای مختلف رشد که شامل فاز لگاریتمی رشد که تا روز دوازدهم ادامه دارد و از روز دوازدهم تا روز شانزدهم با میزان فاز سکون مشاهده و از روز شانزدهم به بعد فاز مرگ مشاهده می‌گردد.

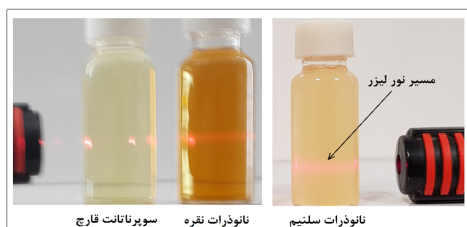
شده نشان می‌دهد که در کشت مایع بازیدیومیست‌ها طبیعی می‌باشد. جداسازی فازهای چهارگانه رشد میکروارگانیسم به دلیل نحوه رشد قارچ در محیط مایع نمی‌تواند به طور کامل روند رشد میکروارگانیسم را در فازهای مختلف نشان دهد، اما با توجه به نمودار رشد فازهای مختلف رشد که شامل فاز لگاریتمی رشد که تا روز دوازدهم ادامه دارد و از روز دوازدهم تا روز شانزدهم با میزان فاز سکون مشاهده و از روز شانزدهم به بعد فاز مرگ مشاهده می‌گردد.

واکنش ارزیابی شد (شکل ۲). مطابق شکل ۲ با توجه به اینکه مسیر نور لیزر در محیط واکنش حاوی نانوذرات قابل‌ردیابی بود، لذا نتیجه‌گیری شد که یک سیستم کلوییدی تشکیل شده است.

**اثر pH بر بیوسنتز نانوذرات نقره و سلنیم:**

میزان شدت رنگ در pH برابر با ۱۰ برای هر دو نانوذره از سایر pHها بیشتر است. بر اساس مطالعات گذشته، شدت رنگ بیشتر نشان دهنده سنتز بیشتر نانوذرات می‌باشد. این شدت رنگ بر اثر پدیده ای است که به آن پلاسمون رزونانس (Plasmon resonance) می‌نامند. در این پدیده الکترون‌های آزاد لایه ظرفیت با دریافت نور مرئی در طول موجی خاص برانگیخته می‌شوند و چون در حالت برانگیخته ناپایدار هستند، وقتی به تراز پایه خود برمی‌گردند نوری را با طول موج دیگر ساطع می‌کنند که موجب می‌شود سیستم کلوییدی نانوذرات به صورت رنگی دیده شود.

**سنتز زیستی نانوذرات نقره و سلنیم با استفاده از سوپرناتانت قارچ *لنتینوس/ادوس*:** از لحاظ میکروسکوپی، مشخصه اصلی سنتز نانوذرات نقره و سلنیم، تغییر رنگ سیستم واکنش به محدوده رنگی قهوه ای برای نانوذرات نقره و محدوده رنگی صورتی تا نارنجی برای نانوذرات سلنیم است. یافته‌ها نشان داد که سوپرناتانت قارچ *لنتینوس/ادوس* به طور موفقیت آمیزی توانست به عنوان یک ترکیب احیاءکننده یون های نقره و سلنیم را احیاء کند و آن‌ها را به فرم نانوذرات نقره و سلنیم تبدیل نماید. اثبات اولیه تشکیل نانوذرات، از طریق مشاهده میکروسکوپی تغییر رنگ سیستم واکنش و اثر تیندال (Tyndall effect) انجام پذیرفت. این درحالی است که در نمونه کنترل منفی تغییر رنگی مشاهده نشد. همچنین اثر تیندال برای اثبات کلوییدی بودن نانوذرات پراکنده در محیط



**شکل ۲- سیستم کلوییدی نانوذرات نقره و سلنیم سنتز شده با استفاده از سوپرناتانت قارچ *لنتینوس/ادوس***

### اندازه گیری قطر هیدرودینامیک نانوذرات نقره

و سلنیم: روش پراکندگی دینامیکی نور یا تفرق نور پویا [Dynamic light scattering (DLS)] یکی از روش‌های مناسب برای تعیین توزیع ابعاد ذرات است. در این روش، از روی حرکت براونی نانوذرات در فاز سیال می‌توان توزیع ابعاد نانوذرات را در یک سیستم کلوئیدی مشخص کرد. سرعت حرکت براونی ذرات با اندازه آن‌ها در ارتباط است، به طوری که حرکت براونی ذرات بزرگ‌تر، آرام‌تر از حرکت براونی ذرات کوچک‌تر است. با استفاده از الگوریتم‌های به دست آمده از حرکات براونی، این دستگاه می‌تواند توزیع اندازه ذرات

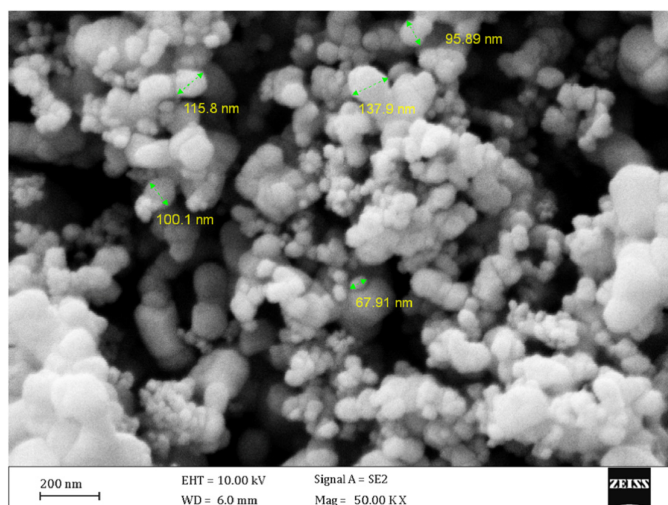
### بررسی مشخصه‌های ساختاری نانوذرات نقره و

#### سلنیم

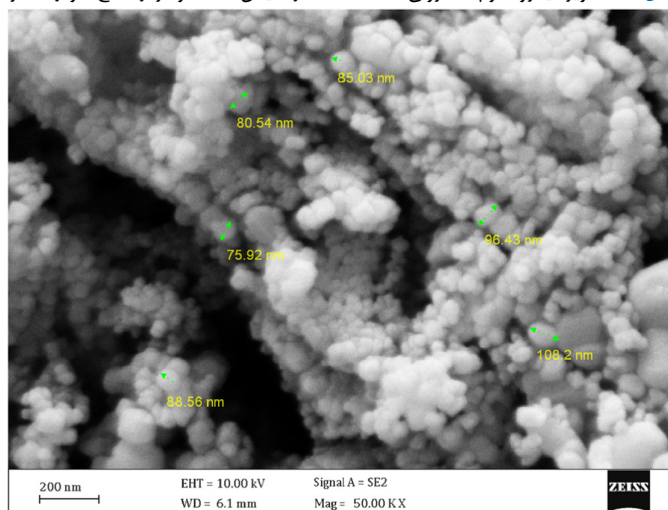
#### مشاهدات میکروسکوپی: شکل ۳ تصویر

میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی را از سطح نانوذرات نقره بیوسنتز شده در pH برابر با ۱۰ نشان می‌دهد. بر اساس شکل ۳، نانوذرات نقره با مورفولوژی کروی تشکیل شده‌اند.

شکل ۴ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی را از سطح نانوذرات سلنیم بیوسنتز شده در pH برابر با ۱۰ نشان می‌دهد. بر اساس شکل ۴، نانوذرات سلنیم با مورفولوژی کروی تشکیل شده‌اند.



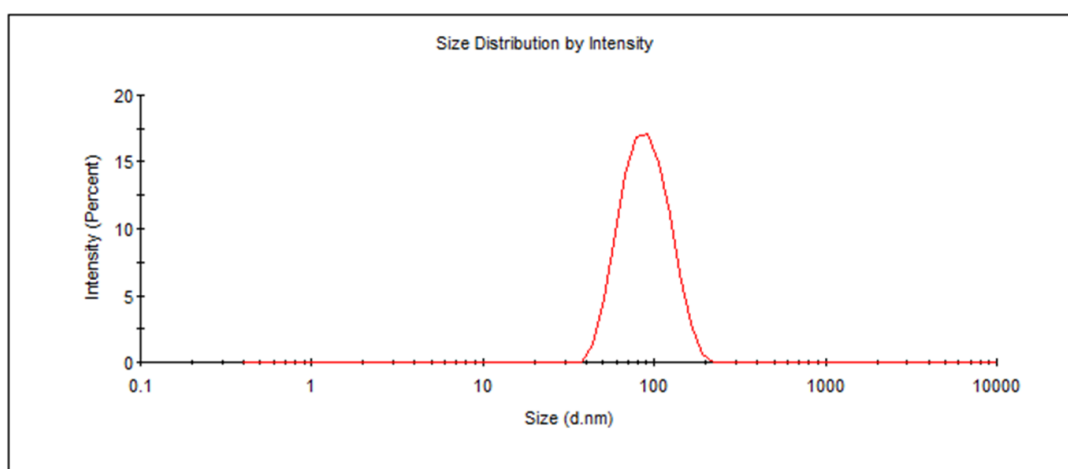
شکل ۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی FE-SEM در مقیاس ۲۰۰ نانومتر از سطح نانوذرات نقره



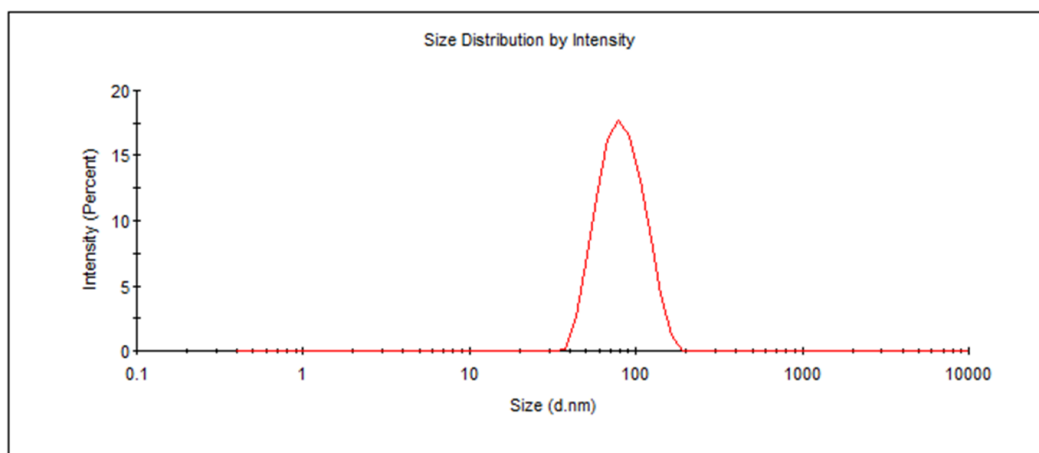
شکل ۴- تصویر میکروسکوپ الکترونی FE-SEM در مقیاس ۲۰۰ نانومتر از سطح نانوذرات سلنیم

**آنالیز طیف‌سنجی FT-IR:** اشکال ۹-۷ به ترتیب طیف FT-IR نانوذرات نقره، سلنیم و توده زیستی قارچ *لنتینوس/دودس* را نشان می‌دهد. شکل ۷ اتصال گروه‌های عاملی به سطح نانوذرات نقره را نشان می‌دهد. در طیف FT-IR نانوذرات نقره، پیک‌های مختلفی در محدوده ۴۵۰ تا  $4000\text{ cm}^{-1}$  به ثبت رسید. طیف FT-IR اگرچه ساختار روشن و دقیقی از ترکیبات کونژوگه شده به نانوذرات را نشان نمی‌دهد، اما حضور انواع گروه‌های عاملی در نمونه را آشکار می‌کند. در مورد نانوذرات نقره، پیک‌های ناحیه  $3294.97$ ،

مورد آزمایش را بر حسب شدت نور متفرق شده از ذرات ارائه دهد. همان‌طور که در اشکال ۵ و ۶ مشاهده می‌شود اندازه میانگین قطر هیدرودینامیک نانوذرات نقره و سلنیم تولیدشده در این مطالعه، در pH برابر با ۱۰ به ترتیب ۹۱.۷۹ و ۸۵.۷۵ نانومتر و همچنین شاخص پراکندگی [Polydispersity index (PDI)] ۰.۴۳۴ و ۰.۵۶ ثبت گردید. همان‌طور که در اشکال ۵ و ۶ مشخص است، منحنی به شکل زنگوله‌ای شکل و مونودیسپرس است که نشان‌دهنده پراکندگی یکنواخت نانوذرات تشکیل‌شده است.



**شکل ۵-** اندازه میانگین قطر هیدرودینامیک نانوذرات نقره تولیدشده در pH برابر با ۱۰ معادل ۹۱.۷۹ نانومتر و شاخص پراکندگی نانوذرات (PDI)، معادل ۰.۵۶ به دست آمد.

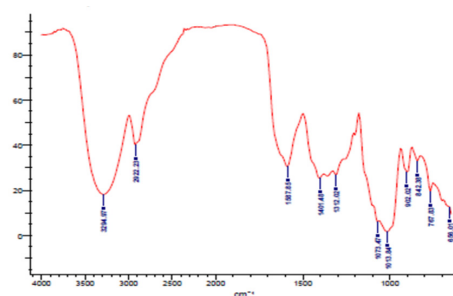


**شکل ۶-** اندازه میانگین قطر هیدرودینامیک نانوذرات سلنیم تولیدشده در pH برابر با ۱۰ معادل ۸۵.۷۵ نانومتر و شاخص پراکندگی نانوذرات (PDI)، معادل ۰.۴۳۴ به دست آمد.

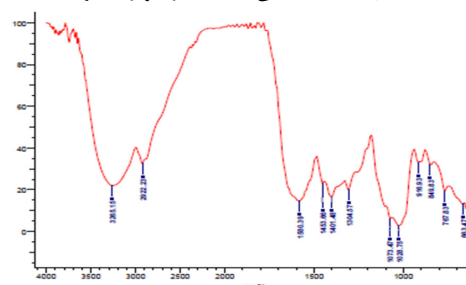
FT-IR توده زیستی قارچ لنتینوس/ادودس (شکل ۹)، پیک های ناحیه ۳۲۶۵.۱۵، ۲۹۲۲.۲۳، ۱۶۲۵.۱۲، ۱۴۰۸.۹۳، ۱۳۰۴.۵۷، ۱۱۴۸.۰۲، ۱۰۲۸.۷۵، ۹۳۱.۸۳، ۸۶۴.۷۴ و  $670.92 \text{ cm}^{-1}$  ممکن است به ترتیب مربوط به ارتعاش پیوندهای O-H، C-H، C=C، C=C، C-O، C-O، C-O، C-O، O-H حضور پیک های مشترک در طیف FT-IR نانوذرات بیوسنتز شده و توده زیستی قارچ نشان می دهد که سطح نانوذرات نقره و سلنیم به وسیله بیومولکول های موجود در سوپرناتانت قارچ لنتینوس/ادودس پوشیده شده است.

**ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات نقره و سلنیم:** مطابق شکل ۱۰، فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات نقره، محلول نیترات نقره و سوپرناتانت با استفاده از آزمون DPPH ارزیابی شد. یافته ها نشان داد که نانوذرات نقره بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را در مقایسه با سایر غلظت های محلول نیترات نقره و همچنین سوپرناتانت قارچ لنتینوس/ادودس دارا هستند ( $P < 0.05$ ). نانوذرات نقره، محلول نیترات نقره (غلظت ۴ میلی مولار) و سوپرناتانت به ترتیب  $38.50 \pm 2.22$  و  $26.35 \pm 0.78$  و  $1.50 \pm 49.04$  درصد از رادیکال های آزاد DPPH را مهار کردند. آزمون ANOVA نشان داد که بین اثر آنتی اکسیدانی نانوذرات نقره، محلول نیترات نقره (غلظت ۴ میلی مولار) و سوپرناتانت اختلاف معناداری وجود دارد ( $P < 0.05$ ). همچنین مطابق شکل ۱۰ بین اثر آنتی اکسیدانی برخی از غلظت های نمک نیترات نقره اختلاف معنی داری وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). در شکل ۱۰، تفاوت گروه هایی که دارای حرف مشترک هستند، از نظر آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی دار نیست ( $P > 0.05$ ) و تفاوت گروه هایی که دارای حرف مشترک نیستند از نظر آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی دار است ( $P < 0.05$ ).

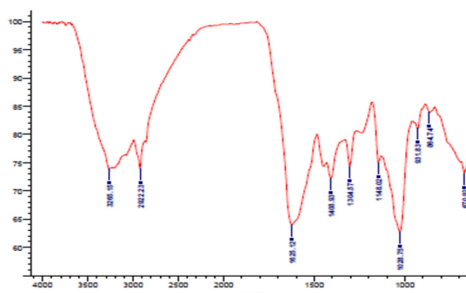
مطابق شکل ۱۱، فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات سلنیم، محلول سدیم سلنیت و سوپرناتانت با استفاده از آزمون DPPH ارزیابی شد. یافته ها نشان داد که نانوذرات سلنیم بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را در



شکل ۷- طیفسنجی FT-IR از نانوذرات نقره

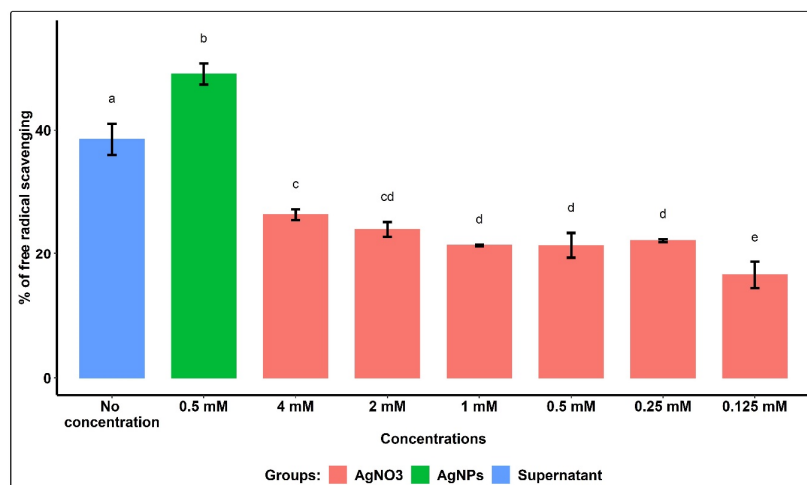


شکل ۸- طیفسنجی FT-IR از نانوذرات سلنیم

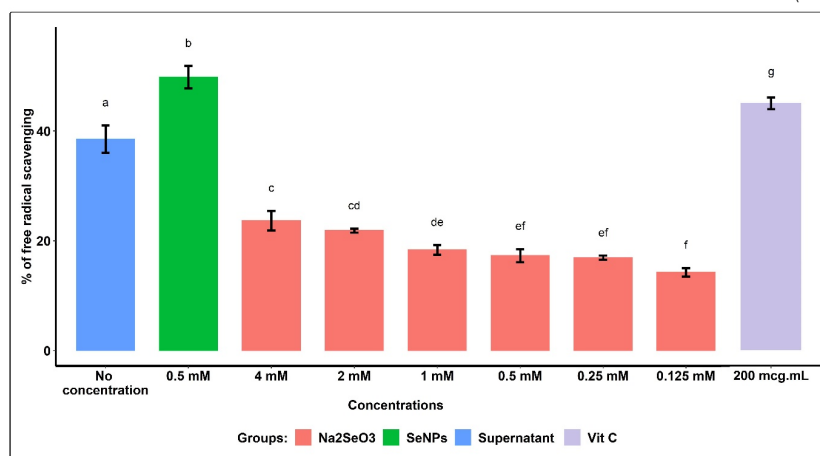


شکل ۹- طیفسنجی FT-IR از توده زیستی قارچ لنتینوس/ادودس

۲۹۲۲.۲۳، ۱۵۸۷.۸۵، ۱۴۰۱.۴۸، ۱۳۱۲.۰۲، ۱۰۷۳.۴۷، ۱۰۱۳.۸۴، ۹۰۲.۰۲، ۸۴۲.۳۸، ۷۶۷.۸۳ و  $656.01 \text{ cm}^{-1}$  ممکن است به ترتیب مربوط به ارتعاش پیوندهای O-H، C-H، N-H، O-H، C-O، C-O، C-O، C-H، C=C، C=C، C=C، C=C، O باشد. براساس طیف FT-IR نانوذرات سلنیم (شکل ۸)، پیک های ناحیه ۳۲۶۵.۱۵، ۲۹۲۲.۲۳، ۱۵۸۰.۳۹، ۱۴۵۳.۶۶، ۱۴۰۱.۴۸، ۱۰۷۳.۴۷، ۱۳۰۴.۵۷، ۱۰۲۸.۷۵، ۹۱۶.۹۳ و  $767.83 \text{ cm}^{-1}$  ممکن است به ترتیب مربوط به ارتعاش پیوندهای O-H، C-H، N-H، O-H، C-O، C-O، C-O، C=C، C=C، C=C، C=C، C=C باشد. همچنین براساس طیف



**شکل ۱۰-** درصد مهار DPPH نانوذرات نقره (AgNPs=Silver nanoparticles)، نمک نیترات نقره (AgNO<sub>3</sub>) و سوپرناتانت قارچ *لنتینوس ادودس*. داده‌ها به صورت (Mean ± SD) نمایش داده شده است و هر آزمایش ۳ بار تکرار شده است. تفاوت گروه‌هایی که دارای حرف مشترک هستند، از نظر آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار نیست ( $P>0.05$ ) و تفاوت گروه‌هایی که دارای حرف مشترک نیستند از نظر آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار است ( $P<0.05$ ).



**شکل ۱۱-** درصد مهار DPPH نانوذرات سلنیم (SeNPs=Selenium nanoparticles)، نمک سدیم سلنیت (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>)، سوپرناتانت قارچ *لنتینوس ادودس* و آسکوربیک اسید (Vit C). داده‌ها به صورت (Mean ± SD) نمایش داده شده است و هر آزمایش ۳ بار تکرار شده است. تفاوت گروه‌هایی که دارای حرف مشترک هستند، از نظر آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار نیست ( $P>0.05$ ) و تفاوت گروه‌هایی که دارای حرف مشترک نیستند از نظر آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار است ( $P<0.05$ ).

آزاد DPPH را مهار کردند. آزمون ANOVA نشان داد که بین اثر آنتی‌اکسیدانی نانوذرات سلنیم، محلول سدیم سلنیت (غلظت ۴ میلی مولار) و سوپرناتانت اختلاف معناداری وجود دارد ( $P<0.05$ ). همچنین مطابق شکل ۱۱ بین اثر آنتی‌اکسیدانی برخی از غلظت‌های نمک سدیم سلنیت اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ( $P>0.05$ ). در شکل ۱۱، تفاوت

مقایسه با سایر غلظت‌های محلول سدیم سلنیت و همچنین سوپرناتانت قارچ *لنتینوس ادودس* دارا هستند ( $P<0.05$ ). نانوذرات سلنیم، محلول سدیم سلنیت (غلظت ۴ میلی مولار)، سوپرناتانت و آسکوربیک اسید (غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به ترتیب  $49.81 \pm 1.79$ ،  $45.79 \pm 1.23$ ،  $23.65 \pm 1.58$  و  $2.22 \pm 38.50$  درصد از رادیکال‌های

۱۲

میکروبی، ضد دیابتی، ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی. با توجه به شیوع بسیار انواع سرطان‌ها در سال‌های اخیر و اثرات نامطلوب درمان‌های رایج آن که شامل شیمی‌درمانی و رادیوتراپی هستند، خواص نانوذرات سلنیم در این راستا امیدبخش است (۱۵، ۱۶).

این مطالعه، با توجه به خواص بی‌شمار نانوذرات نقره و سلنیم که تنها به موارد معدودی از آن‌ها اشاره شد و همچنین لزوم سنتر سبز نانوذرات ذکر شده، انجام شد. در مطالعه اخیر توانایی تولید نانوذرات نقره و سلنیم به وسیله‌ی یک نوع قارچ *بازیدومیست* در شرایط رشد رویشی در محیط کشت مایع بررسی شد. نتایج به دست آمده از این مطالعه حاکی از آن بود که سوپرناتانت قارچ *لنتینوس ادودس* توانایی تولید خارج سلولی نانوذرات نقره و سلنیم را دارد. نانوذرات نقره و سلنیم تولید شده از راه سنتر زیستی نسبت به نانوذرات تولید شده به روش شیمیایی، به علت عدم وجود باقی‌مانده‌های سمی آلی در سطح، ایجاد حداقل ضایعات و مواد مورد نیاز در فرآیند تولید، پتانسیل تولید در حجم بالا و امکان تکرارپذیری، ارزشمندتر هستند. به منظور اثبات تولید نانوذرات نقره و سلنیم در مطالعات از دو روش *ماکروسکوپی* و *میکروسکوپی* استفاده شد. در روش *ماکروسکوپی* تغییر رنگ محیط واکنش نشان از تولید نانوذرات نقره و سلنیم و به ترتیب به قهوه‌ای و نارنجی بود. این تغییر رنگ به دلیل وجود پدیده‌ای به نام *پلاسمون رزونانس سطحی* صورت می‌گیرد. در واقع الکترون‌های آزاد موجود در نانوذرات فلزی با جذب نور مرئی برانگیخته می‌شوند و به یک تراز انرژی بالاتر می‌روند و چون الکترون در حالت برانگیخته ناپایدار است، بنابراین دوباره وقتی به تراز انرژی پایه برمی‌گردد، یک فوتون را از خود ساطع می‌کند. از آنجایی که برانگیختگی الکترون‌های آزاد وقتی در معرض نور قرار می‌گیرند به شکل رزونانسی است، بنابراین نوری که ساطع می‌کنند در محدوده مرئی و به رنگی خاص دیده می‌شود (۲۷). در روش‌های آنالیتیکال با استفاده از آنالیزهای FT-IR و DLS مشخصات ساختاری نانوذرات تولید شده، بررسی شدند. میکروسکوپ الکترونی نشان داد که

گروه‌هایی که دارای حرف مشترک هستند، از نظر آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار نیست ( $P > 0.05$ ) و تفاوت گروه‌هایی که دارای حرف مشترک نیستند از نظر آماری در سطح اطمینان ۹۵ معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ).

## بحث

در میان روش‌های مختلف سنتر نانوذرات، رویکردهای بیولوژیکی به دلیل مزایای چشمگیرشان در سال‌های اخیر مورد توجه بوده‌اند. امروزه آلودگی محیط زیستی بیش از هر زمان دیگری نگران‌کننده است. افزایش مصرف انرژی و منابع طبیعی جهت تأمین بسیاری از نیازهای مورد نظر بشر، دلیل اصلی تولید آلاینده‌ها در محیط زیست بوده است. بر این اساس، نیاز جدی جهت استفاده از روش‌های جایگزین سازگار با محیط زیست برای سنتر نانوذرات وجود دارد. روش‌های بیولوژیک تولید نانوذرات سازگار با محیط‌زیست هستند و به کارگیری آن‌ها باعث می‌شود که پسماندهای سمی تولید نشوند و انرژی کمتری مصرف شود (۲۳). جدای از این، مهندسی زیستی نانوذرات مزایای دیگری مانند مقرون به صرفه بودن و کنترل راحت‌تر جهت تولید نانوذرات با اشکال و اندازه‌های مطلوب را دارد. بنابراین کمک گرفتن از منابع بیولوژیکی را می‌توان از بهترین تکنیک‌های تولید نانوذرات دانست.

بین نانوذرات متنوع، نانوذرات فلزی کاربردهای عملی زیادی در زمینه‌های مختلف دارند (۲۴). در این میان کاربردهای فراوان نانوذرات نقره و سلنیم قابل توجه است. در حوزه‌های پزشکی و دارویی، نانوذرات نقره دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد توموری هستند (۲۵). در حوزه‌ی غذایی نیز، نانوذرات نقره برای تولید، بسته‌بندی و ذخیره‌سازی مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۶). موارد اشاره شده تنها بخشی از کاربردهای عظیم نانوذرات نقره بود. اگر بخواهیم به کاربردهای مختلف سلنیم اشاره کنیم، می‌توانیم چندین کاربرد مفید آن‌ها در حوزه‌ی زیست پزشکی را نام ببریم که عبارتند از اثر ضد سرطانی، ضد

رادیکال آزاد DPPH را مهار کردند (۲۹). این در حالی است که در مطالعه حاضر نانوذرات نقره  $49.04 \pm 1.50$  درصد از رادیکال آزاد DPPH را مهار کردند. تفاوت در نتایج به دست آمده می تواند مربوط به تفاوت در توزیع اندازه ذره ای و همچنین تفاوت در منبع بیولوژیک استفاده شده در سنتز نانوذرات باشد. همچنین، عبدالله و همکاران با استفاده از جلبک سبزی با نام علمی *Spirogyra hyalina*، نانوذرات نقره کروی شکل بیوسنتز کردند. این نانوذرات بیوسنتز شده در این مطالعه دارای میانگین اندازه ذره ای  $52.7$  نانومتر بودند. در این مطالعه فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی و حشره کشی این نانوذرات بررسی شد. نتیجه این مطالعه نشان داد این نانوذرات بیوسنتز شده دارای عملکرد مناسبی در هر چهار ویژگی مورد بررسی بودند. در خصوص فعالیت آنتی اکسیدانی، این نانوذرات در غلظت های  $25$ ،  $50$ ،  $100$ ،  $200$  و  $400$  میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب  $14.13$ ،  $24.62$ ،  $31.39$ ،  $43.26$  و  $53.43$  درصد از رادیکال آزاد DPPH را مهار کردند (۳۰). در تفسیر یافته های این مطالعه با یافته های مطالعه حاضر می توان به نقش مؤثر منبع بیولوژیک استفاده شده در فرآیند سنتز نانوذرات اشاره کرد. با توجه به اینکه بیومولکول های موجود در منابع بیولوژیک به سطح نانوذرات متصل می شوند، لذا می توانند در فعالیت بیولوژیک نانوذرات نیز تأثیرگذار باشند. بنابراین، به نظر می رسد که در این مطالعه ترکیبات جلبک متصل به سطح نانوذرات نیز در فعالیت آنتی اکسیدانی نقش ایفا کرده اند.

در مطالعه دیگر، چیرومامیلا و همکاران با استفاده از عصاره برگ گیاه *Solanum khasianum* نانوذرات نقره را سنتز کردند. این نانوذرات دارای میانگین اندازه  $15/96$  نانومتر بودند. در این مطالعه تأثیر این نانوذرات بر دیابت بررسی شد و نشان داد که می تواند اثر مفیدی در پایین آوردن میزان قند خون داشته باشند. از دیگر یافته های این مطالعه می توان به اثر ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی نانوذرات نقره تهیه شده اشاره نمود. در خصوص فعالیت آنتی اکسیدانی، نانوذرات نقره توانستند  $87.98$  درصد از

نانوذرات نقره و سلنیم با مورفولوژی کروی سنتز شده اند. علاوه بر این، آنالیز FT-IR وجود گروه های عاملی مختلف روی سطح نانوذرات نقره و سلنیم سنتز شده را نشان داد. اندازه میانگین قطر هیدرودینامیک نانوذرات نقره و سلنیم تولید شده در این مطالعه، در pH برابر با  $10$  به ترتیب معادل  $91.79$  و  $85.75$  نانومتر ثبت گردید. یافته های آنالیز DLS برای هر دو نانوذره بیوسنتز شده نشان داد که منحنی به شکل زنگوله ای شکل و مونودیسپرس است که نشان دهنده پراکندگی یکنواخت نانوذرات تشکیل شده است. همچنین شاخص PDI نانوذرات نقره و سلنیم به ترتیب  $0.56$  و  $0.434$  به دست آمد. برای یک نمونه کلئید یکنواخت نانوذرات، PDI بین  $0.01$  تا  $0.7$  است. نمونه های غیریکنواخت، PDI بالاتر از  $0.7$  تا  $1$  دارند که نشان دهنده یک نمونه پلی دیسپرس است (۲۸). با توجه به اثرات و کاربردهای متفاوت نانوذرات با مورفولوژی و اندازه های مختلف، استفاده از منابع بیولوژیک متفاوت جهت بررسی و دستیابی به پارامترهای مطلوب و مدنظر نانوذرات، ضروری است. در مطالعه ای حاضر نشان داده شد که بیومولکول های ترشح شده توسط قارچ *لنتینوس/ادوس* در سوپرناتانت، قابلیت احیای یون های نقره و سلنیم و تولید برون سلولی نانوذرات نقره و سلنیم را دارند و لذا این قارچ کاندیدای مناسبی برای ورود به صنعت تولید نانوذرات فلزی می باشد.

تاکنون مطالعات مختلفی برای سنتز نانوذرات انجام گرفته است. به عنوان مثال، برآبادی و همکاران با استفاده از سوپرناتانت قارچ *پنیسیلیوم فیموروم (Penicillium fimorum)* نانوذرات نقره را به روش برون سلولی با اندازه ذره ای کمتر از  $100$  نانومتر بیوسنتز کردند. نانوذرات بیوسنتز شده دارای شکل کروی بودند. این نانوذرات بیوسنتز شده دارای فعالیت متعددی از جمله عملکرد ضد مخمری، مهار بیوفیلمی، آنتی کوآگولانت، ترومبولیتیک و آنتی اکسیدانی بودند. در خصوص فعالیت آنتی اکسیدانی، این نانوذرات در غلظت های  $16$ ،  $100$  و  $500$  میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب  $15.96$ ،  $33.49$  و  $73.96$  درصد از

در این مطالعه، قارچ *لنتینوس/دودس* توانست به طور موفقیت‌آمیز نانوذرات نقره و سلنیم را به روش برون‌سلولی سنتز کند. باتوجه به اینکه نانوذرات تشکیل شده در خارج سلول عاری از اجزاء و ترکیبات درون سلولی غیرضروری هستند، می‌توانند مستقیماً برای کاربردهای مختلفی استفاده شوند. از مزیت‌های سنتز با قارچ *لنتینوس/دودس* می‌توان به همین قابلیت سنتز برون سلولی آن اشاره کرد که موجب می‌شود پس از تشکیل نانوذرات، نیازی به فیلتراسیون و جداسازی نانوذرات از توده سلولی نباشد. این رویکرد برخلاف روش سنتز زیستی درون سلولی است که طی آن نیاز به مراحل زمان‌بر و پیچیده‌ی استخراج نانوذرات است. قارچ *لنتینوس/دودس* برای رشد خود به محیط کشت غنی و شرایط پیچیده نیاز ندارد و به همین دلیل استفاده از آن بسیار مقرون به صرفه می‌باشد. از دیگر مزیت‌های قارچ *لنتینوس/دودس* هم عدم سمیت آن و به همراه نداشتن مشکلات خطرهای احتمالی ورود آن‌ها به فرآورده‌های دارویی و غذایی است.

در این مطالعه ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات نقره و سلنیم با استفاده از سنجش میزان مهار رادیکال آزاد DPPH انجام شد. این روش به دلیل ساده بودن و حساسیت بالا یکی از رایج ترین روش های مورد استفاده در ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات مختلف به شمار می رود. اساس این روش بر جذب هیدروژن توسط رادیکال آزاد DPPH و تغییر رنگ آن از ارغوانی به زرد می باشد که سبب کاهش میزان جذب در طول موج ۵۱۸ نانومتر می گردد، زیرا رادیکال های آزاد DPPH بیشترین میزان جذب را در طول موج ۵۱۸ نانومتر دارند. در این مطالعه نانوذرات نقره و سلنیم سنتز شده فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی نشان دادند. عوامل متعددی در فعالیت بیولوژیک نانوذرات فلزی مؤثر هستند که در آن میان می‌توان به اندازه ذره ای، مورفولوژی، بار سطحی و عوامل پوشش دهنده سطح نانوذرات اشاره کرد (۲۸).

رادیکال آزاد DPPH را مهار کنند (۳۱). به نظر می رسد در این مطالعه به دلیل سنتز نانوذرات با اندازه ذره ای بسیار کم، فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجه مشاهده می شود. اگرچه که از نقش ترکیبات موجود در عصاره برگ درخت *S. khasianum* نیز نباید غافل شد، زیرا این ترکیبات به سطح نانوذرات متصل شده و در فعالیت بیولوژیک این نانوذرات نیز اثر گذاشته اند. در مطالعه دیگر، آلاگسان و همکاران نیز از عصاره برگ گیاه *ویتانیا سامنیفرا (Withania somnifera)* برای سنتز نانوذرات سلنیم با ساختار کروی و میانگین اندازه ی ذره ای ۶۷.۵ نانومتر استفاده کردند. اثر آنتی اکسیدانی این نانوذرات نیز بر علیه رادیکال های آزاد DPPH با  $IC_{50}$  معادل ۱۴.۸۱ میکروگرم بر میلی گرم گزارش شد (۳۲). این در حالی است که در مطالعه حاضر نانوذرات سلنیم  $49.81 \pm 1.79$  درصد از رادیکال آزاد DPPH را مهار کردند. تفاوت در نتایج به دست آمده می تولد مربوط به تفاوت در توزیع اندازه ذره ای و همچنین تفاوت در منبع بیولوژیک استفاده شده در سنتز نانوذرات باشد. در مطالعه دیگر، ژانگ و همکاران نیز توانستند با استفاده از عصاره چای سبز نانوذرات سلنیم را تهیه کنند. این نانوذرات دارای مورفولوژی کروی و مثلثی و میانگین اندازه ذره ای ۱۲۵ نانومتر بودند و خاصیت آنتی اکسیدانی چشمگیری نشان دادند. نانوذرات سلنیم در غلظت ۲۲ میکرومولار ۵۰٪ رادیکال های آزاد DPPH را مهار کردند (۳۳). در تفسیر یافته های این مطالعه با نتایج مطالعه حاضر علاوه بر تفاوت در اندازه ذره ای و منبع بیولوژیک می توان به تفاوت در مورفولوژی نانوذرات سلنیم سنتز شده اشاره کرد. در مطالعه ژانگ و همکاران، نانوذرات سلنیم دارای مورفولوژی کروی و مثلثی هستند و میانگین اندازه ذره ای بالای ۱۰۰ نانومتر است. درحالی که در مطالعه حاضر نانوذرات سلنیم با مورفولوژی کروی تشکیل شده اند و همچنین اندازه میانگین قطر هیدرودینامیک نانوذرات سلنیم تولیدشده در pH مورد مطالعه معادل ۸۵.۷۵ نانومتر به دست آمد که این عوامل سبب شده است تا فعالیت آنتی اکسیدانی متفاوتی از این نانوذرات مشاهده شود.

Nanoscale Res Lett. 2021;16:1-12.

3. Shahcheraghi N, Golchin H, Sadri Z, Tabari Y, Borhanifar F, Makani S. Nano-biotechnology, an applicable approach for sustainable future. 3 Biotech. 2022;12(3):65.

4. Harinisri K, Jayanthi N, Kumar RS. Diverse application of green nanotechnology—A review. Materials Today: Proceedings. 2023.

5. Fawcett D, Verduin JJ, Shah M, Sharma SB, Poinern GEJ. A review of current research into the biogenic synthesis of metal and metal oxide nanoparticles via marine algae and seagrasses. J Nanosci. 2017;2017:8013850

6. Sharma D, Kanchi S, Bisetty K. Biogenic synthesis of nanoparticles: a review. Arabian Journal of Chemistry. 2019;12(8):3576-600.

7. Alfryyan N, Kordy MGM, Abdel-Gabbar M, Soliman HA, Shaban M. Characterization of the biosynthesized intracellular and extracellular plasmonic silver nanoparticles using Bacillus cereus and their catalytic reduction of methylene blue. Sci Rep. 2022;12(1):12495.

8. Cittrarasu V, Kaliannan D, Dharman K, Maluventhen V, Easwaran M, Liu WC, et al. Green synthesis of selenium nanoparticles mediated from Ceropogia bulbosa Roxb extract and its cytotoxicity, antimicrobial, mosquitocidal and photocatalytic activities. Sci Rep. 2021;11:1032.

9. Riaz Rajoka MS, Mehresh HM, Zhang H, Ashraf M, Fang H, Zeng X, et al. Antibacterial and antioxidant activity of exopolysaccharide mediated silver nanoparticle synthesized by Lactobacillus brevis isolated from Chinese koumiss. Colloids Surf B Biointerfaces. 2020;186:110734.

10. Nouri A, Tavakkoli Yarak M, Lajevardi A, Rezaei Z, Ghorbanpour M, Tanzifi M. Ultrasonic-assisted green synthesis of silver nanoparticles using Mentha aquatica leaf extract for enhanced antibacterial properties and catalytic activity. Colloid and Interface Science Communications. 2020;35:100252.

11. Alharbi RM, Alshammari SO, Abd El Aty AA. Statically improved fungal laccase-mediated biogenesis of silver nanoparticles with antimicrobial applications. J Appl Pharma Sci. 2023;13(1):241-53.

12. Sudha B, Sumathi S, Swabna V. Enzyme mediated synthesis and characterization of silver nanoparticles using keratinase enzyme producing micro-organisms. Ann Phytomed. 2020;9:147.

13. Anjum S, Vyas A, Sofi T. Fungi-mediated synthesis of nanoparticles: characterization process and agricultural applications. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2023;103(10):4727-41.

14. Ahmad I, Arif M, Mimi X, Zhang J, Ding Y, Lyu F. Therapeutic values and nutraceutical

## نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که قارچ *لنتینوس اودوس* توانست به عنوان عامل احیاء کننده با احیای یون های نقره و سلنیم، نانوذرات نقره و سلنیم را به روش برون سلولی سنتز کند. همچنین نانوذرات سنتز شده نشان دادند که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قابل ملاحظه هستند.

## تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به دلیل حمایت و تأمین هزینه این طرح کمال تشکر را دارند. (کد طرح پژوهشی: ۲۷۴۸۱).

## ملاحظات اخلاقی

مقاله حاضر حاصل مطالعه ای است که تأییدیه پروتکل پژوهش توسط کمیته اخلاق در پژوهش های زیستی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی را با کد IR.SBMU.PHARMACY.REC.1400.032 دارد.

## مشارکت نویسندگان

ایده پردازی و مفهوم سازی: حامد برآبادی، حسین وحیدی؛ طراحی روش شناسی: حامد برآبادی، مهدیه عامری شه رضا؛ اجرای آزمایشات: مریم بابایی ثابت، سالار صادقیان آبادی، کامیار جونکی، مها سلطانی؛ تحلیل و تفسیر داده ها: حامد برآبادی، حسین وحیدی، مهدیه عامری شه رضا؛ تصویر سازی و تهیه نمودارها: سالار صادقیان آبادی، کامیار جونکی؛ نگارش پیش نویس اولیه مقاله: حامد برآبادی، مها سلطانی. همه نویسندگان نسخه نهایی مقاله را خوانده و تأیید کرده اند.

## References

1. Chopra H, Bibi S, Singh I, Hasan MM, Khan MS, Yousafi Q, et al. Green metallic nanoparticles: biosynthesis to applications. Front Bioengin Biotechnol. 2022;10:548.
2. Habibullah G, Viktorova J, Ruml T. C urrent strategies for noble metal nanoparticle synthesis.

- properties of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*): A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2023;134:123-35.
15. Alvi GB, Iqbal MS, Ghaith MMS, Haseeb A, Ahmed B, Qadir MI. Biogenic selenium nanoparticles (SeNPs) from citrus fruit have anti-bacterial activities. *Sci Rep*. 2021;11(1):4811.
  16. Karthik KK, Cheriyan BV, Rajeshkumar S, Gopalakrishnan M. A review on selenium nanoparticles and their biomedical applications. *Biomed Technol*. 2024;6:61-74.
  17. Bisht N, Phalswal P, Khanna PK. Selenium nanoparticles: a review on synthesis and biomedical applications. *Mat Adv*. 2022;3(3):1415-31.
  18. Cadinoiu AN, Rata DM, Daraba OM, Ichim DL, Popescu I, Solcan C, et al. Silver Nanoparticles Biocomposite Films with Antimicrobial Activity: In Vitro and In Vivo Tests. *Int J Mol Sci*. 2022;23(18):10671.
  19. Yang Y, Duan S, Xiao W, Zhao H. Silver nanowire-based stretchable strain sensors with hierarchical wrinkled structures. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2022;343:113653.
  20. Vijayaram S, Razafindralambo H, Sun Y-Z, Vasantharaj S, Ghafarifarsani H, Hoseinifar SH, et al. Applications of Green Synthesized Metal Nanoparticles—A Review. *Biological Trace Element Research*. 2023;202:360-86.
  21. Moldovan B, David L, Vulcu A, Olenic L, Perde-Schrepler M, Fischer-Fodor E, et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory properties of green synthesized silver nanoparticles using *Viburnum opulus L.* fruits extract. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;79:720-7.
  22. Ojemaye MO, Okoh SO, Okoh AI. Silver nanoparticles (AgNPs) facilitated by plant parts of *Crataegus ambigua* Becker AK extracts and their antibacterial, antioxidant and antimalarial activities. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2021;14(1):51-61.
  23. Khan SH. Green nanotechnology for the environment and sustainable development. *Green materials for wastewater treatment*. 2020:13-46.
  24. Ahmad S, Munir S, Zeb N, Ullah A, Khan B, Ali J, et al. Green nanotechnology: A review on green synthesis of silver nanoparticles—An ecofriendly approach. *Int J Nanomed*. 2019:5087-107.
  25. Kaushal A, Khurana I, Yadav P, Allawadhi P, Banothu AK, Neeradi D, et al. Advances in therapeutic applications of silver nanoparticles. *Chem Biol Interact*. 2023;382:110590.
  26. Istiqola A, Syafiuddin A. A review of silver nanoparticles in food packaging technologies: Regulation, methods, properties, migration, and future challenges. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 2020;67(11):1942-56.
  27. Ammari H, Deng Y, Millien P. Surface plasmon resonance of nanoparticles and applications in imaging. *Archive for Rational Mechanics and Analysis*. 2016;220:109-53.
  28. Barabadi H, Honary S, Ali Mohammadi M, Ahmadvpour E, Rahimi MT, Alizadeh A, et al. Green chemical synthesis of gold nanoparticles by using *Penicillium aculeatum* and their scolicidal activity against hydatid cyst protoscolices of *Echinococcus granulosus*. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017;24(6):5800-10.
  29. Barabadi H, Mobaraki K, Jounaki K, Sadeghian-Abadi S, Vahidi H, Jahani R, et al. Exploring the biological application of *Penicillium fimorum*-derived silver nanoparticles: In vitro physicochemical, antifungal, biofilm inhibitory, antioxidant, anticoagulant, and thrombolytic performance. *Heliyon*. 2023;9(6):e16853.
  30. Abdullah, Al-Radadi NS, Hussain T, Faisal S, Ali Raza Shah S. Novel biosynthesis, characterization and bio-catalytic potential of green algae (*Spirogyra hyalina*) mediated silver nanomaterials. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2022;29(1):411-9.
  31. Chirumamilla P, Dharavath SB, Taduri S. Eco-friendly Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Leaf Extract of *Solanum khasianum*: Optical Properties and Biological Applications. *Appl Biochem Biotechnol*. 2023;195(1):353-68.
  32. Alagesan V, Venugopal S. Green synthesis of selenium nanoparticle using leaves extract of *withania somnifera* and its biological applications and photocatalytic activities. *Bionanoscience*. 2019;9:105-16.
  33. Zhang W, Zhang J, Ding D, Zhang L, Muehlmann LA, Deng S-e, et al. Synthesis and antioxidant properties of *Lycium barbarum* polysaccharides capped selenium nanoparticles using tea extract. *Artificial Cells, Nanomedicine, Biotechnology Advances*. 2018;46(7):1463-70.