

Green synthesis and cytotoxicity effect of silver nanoparticles by using the extract of *Tuber spp.*

Shahla Nedaei¹, Hashem Yaghoubi^{2*}, Hossein Akbari³

1- M.Sc., Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

3- Assistant Professor, Department of Physics, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

*Corresponding Address: Postal Code: 5615731567, Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

Email: yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

Received: 29/Aug/2017, Accepted: 03/Oct/2017

Abstract

Objective: Recently, green synthesis of silver nanoparticles has been performed out through plants, fungi, bacteria, and algae because this is a simple, low-cost, and environmentally friendly method. This technique can be a suitable alternative to physical and chemical methods. In this study, we assess green synthesis of silver nanoparticles by the truffle fungus (*Tuber spp.*) extract and MTT assessment of its cytotoxicity.

Methods: We used the *Tuber spp.* Extract as the reducing agent for the biosynthesis of silver nanoparticles. The sizes, structural, optical and morphological properties of the nanoparticles were analyzed by FT-IR, X-ray diffraction and field emission scanning (transmission; TEM) electron microscope. The cytotoxicity effect of silver nanoparticles on cell lines was evaluated by the MTT assay after 24 h.

Result: UV-Vis spectrum exhibited an absorption band at around 400-450 nm that suggested the formation of biological silver nanoparticles. The size and morphological properties of nanoparticles were assessed by TEM which showed that the particles had spherical shapes with diameters of approximately 15-30 nm. The MTT assay revealed a dose- and time-dependent anti-proliferative effect of the silver nanoparticles.

Conclusion: The extract of *Tuber spp.* has the ability to reduce the Ag⁺ ion to silver nanoparticles. Silver nanoparticles produced by green synthesis have good anti-proliferative effects compare to the *Tuber spp.* extract.

Keywords: Green synthesis, *Tuber spp.*, Silver nanoparticle

Pathobiology Research, Vol. 20 (2017), No.3, Pages: 61-76

سنتر سبز و بررسی سمیت سلولی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره قارچ دنبلان (*Tuber spp.*)

شهلا ندایی^۱، هاشم یعقوبی^{۲*}، حسین اکبری^۳

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

۳- استادیار، گروه فیزیک، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، اردبیل، کدپستی: ۵۶۱۵۷۳۱۵۶۷، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، گروه زیست شناسی
Email: yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۶/۰۷/۱۱

دریافت مقاله: ۹۶/۰۶/۰۷

چکیده

هدف: اخیراً سنتر سبز نانوذرات نقره از طریق گیاهان، قارچ، باکتری‌ها و جلبک‌ها انجام می‌گیرد؛ به دلیل اینکه روشی ساده، کم هزینه و سازگار با محیط زیست است و می‌تواند جایگزین مناسب برای روش‌های فیزیکی و شیمیایی باشد. در این مطالعه سنتر سبز نانوذرات نقره به وسیله عصاره قارچ دنبلان و ارزیابی سمیت سلولی آن توسط MTT گزارش شده است. مواد و روش‌ها: در این تحقیق از عصاره قارچ دنبلان به عنوان عامل کاهنده برای تولید زیستی نانوذرات نقره استفاده شد. نانوذرات حاصل برای تعیین اندازه، خواص ساختاری، خواص اپتیکی، ریخت‌شناسی به ترتیب با دستگاه‌های طیف‌سنجی مادون قرمز، پراش اشعه ایکس، میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی و میکروسکوپ الکترونی عبوری تحلیل و بررسی قرار شد. آثار سمیت سلولی نانوذرات روی سلول‌ها با روش رنگ‌سنجی MTT طی ۲۴ ساعت ارزیابی شد. نتایج: تشکیل نانوذرات زیستی نقره در محدوده ۴۰۰ الی ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر نشان داده شد. اندازه و ریخت‌شناسی این نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری تعیین شد که شکل ذرات کروی و اندازه متوسط آن‌ها در حدود ۱۵-۳۰ نانومتر است. نتایج MTT نشان داد که اثر ضد تکثیری نانوذرات بستگی به غلظت و زمان دارد.

نتیجه‌گیری: عصاره قارچ قادر به احیای یون Ag^+ به نانوذرات نقره است. همچنین نانوذرات نقره تولید شده به روش سبز دارای فعالیت ضد تکثیری بیشتری نسبت به عصاره قارچ است.

کلیدواژگان: سنتر سبز، عصاره قارچ دنبلان، نانوذرات نقره

پژوهش‌های آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۲۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحات: ۶۱-۷۶

مقدمه

جاده‌ای، سومین عامل مرگ و میر در ایران است. از این رو یافتن روش‌های جدید و کم‌خطرتر برای درمان این بیماری امری ضروری است. یکی از ایده‌های نو در این حیطه،

در قرن حاضر یکی از دغدغه‌های دانشمندان در حیطه علم پزشکی یافتن راه‌هایی برای درمان قطعی بیماری سرطان است. طبق آمار سرطان پس از بیماری‌های قلبی و عروقی و حوادث

سنتر سبز و بررسی سمیت سلولی نانوذرات نقره

برخوردار باشد. همچنین خاصیت ضدسرطانی نانوذرات نقره در بسیاری از مطالعات مشخص شده است. نانوذرات نقره با اختلال در انتقال پیام سلولی، باعث ایجاد اختلال در شبکه ارتباطی سلولی می شود [۱۰، ۱۱]. همچنین، نانوذرات نقره در آسیب به DNA و در افزایش بیان مولکول پروتئینی کاسپاز ۳ و به راه انداختن مرگ برنامه ریزی شده سلولی (Apoptosis) نقش دارد و بنابراین منجر به میانجی گری تکثیر پیام های مرگ می شود. این امر در درمان سرطان بسیار دارای اهمیت است [۱۲]. اصلی ترین ویژگی نانوذرات نقره خاصیت ضدباکتریایی این نانوذرات است بنابراین از این ویژگی در زخم پوش ها (پانسمان زخم)، پماد زخم های پوستی، ضد عفونی کننده ها و پوشش های ابزار پزشکی استفاده می شود [۱۳].

توسعه روش های تولید نانوذرات نقره که سازگار با محیط زیست و فاقد مواد سمی باشند، یکی از مهم ترین جنبه های علم نانوفناوری است. برای تولید نانوذرات بیشتر از روش های فیزیکی و شیمیایی استفاده می شود که متاسفانه در این روش ها از مواد سمی و مضر استفاده می شود. از معایب دیگر این روش ها می توان به تولید کم نانوذرات، اتلاف انرژی زیاد و هزینه بالا را اشاره نمود [۱۴].

از این رو دستیابی به روشی با بازده بالا، قیمت کم، بدون تولید مواد سمی و بدون آسیب های زیست محیطی رو به افزایش است. یکی از روش های تولید نانوذرات، تولید به روش زیستی است و توجه به این روش برای تولید نانوذرات رو به افزایش است. موادی مانند گیاهان، محصولات گیاهان، جلبک ها، قارچ ها و ویروس ها در تولید زیستی نانوذرات کاربرد دارند [۱۵]. استفاده از گیاهان و قارچ ها به علت سازگاری با محیط و فراوانی معمولاً فاقد این مشکلات است و می توانند به طور گسترده ای مورد استفاده قرار گیرند، بدون اینکه منجر به بروز آسیب های زیست محیطی شوند. همچنین گیاهان و قارچ ها به علت فراوانی و عدم نیاز به شرایط و مواد غذایی خاص برای رشد، گزینه ای مناسب برای تولید نانوذرات به روش زیستی محسوب می شود [۱۶، ۱۷].

به کارگیری نانو مواد در تشخیص و درمان تعدادی از سرطان های رایج است [۱].

استفاده از نانوذرات در صنایع غذایی، الکترونیک و پزشکی رو به گسترش است. تهیه و ایجاد ذرات در اندازه نانو (کمتر از ۱۰۰ نانومتر) باعث افزایش نسبت سطح به حجم شده است و امکان واکنش آن ها با مولکول های آلی و غیر آلی را بیشتر می کند [۲]. کاربرد نانوتکنولوژی در علم پزشکی استفاده از ذرات بسیار کوچک در زمینه های تشخیص و درمان سرطان های انسانی است که باعث ایجاد یک شاخه جدید علمی در سرطان شناسی (Oncology) تحت عنوان سرطان شناسی نانو (nano Oncology) شده است [۳]. نانو ذرات برای تصویربرداری از تومور، نشان دادن نشانگرهای زیستی سرطان و همچنین هدف دار نمودن حمل دارو بیشتر مورد توجه قرار گرفته است [۴]. بر اساس تحقیقات انجام شده در بین نانو ساختارها، نانوذرات فلزی در کاربردهای زیستی مؤثرترند و بررسی های انجام شده نیز نشان دهنده آن است که ۵۶ درصد سهم نانوذرات جهان به نانوذرات نقره اختصاص یافته است [۵].

نانوذرات نقره دارای کاربردهای بالقوه ای در عرصه علوم پایه زندگی بشر به ویژه در پزشکی، شیمی مواد غذایی، علم پزشکی قانونی، کشاورزی و لوازم آرایشی است [۶]. در این میان، مطالعات بیانگر آن است که نانوذرات نقره نسبت به سایر نانوذرات آثار بیشتری در برابر باکتری ها و ویروس ها از خود نشان می دهد [۷]. به طور کلی خواص نانوذرات نقره را می توان تأثیر سریع، غیرسمی، غیرحساسیت زا، قابلیت تحمل شرایط مختلف (پایداری زیاد)، آب دوست بودن، سازگاری با محیط زیست، مقاوم در برابر حرارت، عدم ایجاد و افزایش و سازگاری در میکروارگانیسم، تأثیر داشتن روی باکتری ها، قارچ ها، از بین بردن ویروس ها نام برد [۸]. یون نقره به دلیل خواص آنتی بیوتیکی آن به مدت طولانی شناخته شده بود، اما به تازگی به دلیل ساخته شدن به صورت نانوذرات استفاده بیشتری یافته است [۹]. وجود این خاصیت ذرات نقره باعث شد تا امروزه در زیست شناسی و نانوزیست فناوری از اهمیت بالایی

۱). این قارچ ها زیر سطح خاک هایی که دارای بافت نرم و آهکی هستند یافت می شود. به همین علت تحت عنوان قارچ های زیرزمینی نیز مشهور هستند. اندام بارده این قارچ ها یک ماده غذایی سرشار از مواد ازته، نمک های معدنی کلروفسفات، چربی، کربن، اسیدهای آلی، آب و غیره است. ترکیب شیمیایی اندام های بارده بسته به میزان و نوع مواد موجود در خاک و گیاه با هم تفاوت زیادی دارند [۱۹].

بیشتر قارچ هایی که تولید اندام بارده زیرزمینی می کنند از دسته آسکومیست ها (Ascomycetes) است و تحت عنوان دنبلان (Truffle) شناسایی و معرفی می شوند [۱۸]. قارچ های دنبلان (*Tuber spp.*) معمولاً به صورت دسته ای در عمق ۳۰ سانتی متری در خاک و نزدیک به ریشه های گیاهان و درخت ها می رویند. این قارچ ها در گونه های مختلف به رنگ های قرمز تیره، خاکستری، سفید، بنفش و سیاه مشاهده می شوند (شکل



شکل ۱ تصویر قارچ دنبلان

دارد. این خصوصیات آثار مثبت زیادی بر سلامت انسان دارد و از بیماری های مربوط به تنش اکسیداتیو نظیر کرونر قلب، سرطان و سیروز کبدی (Hepatic cirrhosis) جلوگیری می کند [۲۲]. در پژوهش حاضر، هدف سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره قارچ دنبلان و همچنین مقایسه سمیت نانوذرات نقره روی سلول های سرطانی پستان MCF-7 با روش MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-] [diphenyltetrazolium bromide] ارزیابی و بررسی شد.

مواد و روش ها

تهیه عصاره آبی از قارچ

در ابتدا قارچ دنبلان (*Tuber spp.*) تهیه شده از شهر مشگین شهر اردبیل با آب مقطر به خوبی شستشو و پس از

قارچ خوراکی دنبلان یک نوع غده بسیار با ارزش از نظر تغذیه ای و دارویی است و از خواص زیستی می توان به آثار ضد ویروسی، ضد میکروبی، ضد اکسیدانی، اشاره کرد. همچنین دارای ضد اکسیدان های طبیعی توکوفرول ها (Tocopherol)، فلاونوئیدها (Flavonoids)، کوئرستین ها (Quercetins)، اسید سینامیک (Cinnamic acid)، ترکیبات پیتیدی و فنولی است [۲۰]. این ترکیبات می توانند در شیمی درمانی انواع سرطان ها و بیماری های قلبی و عروقی و سایر بیماری ها مفید باشد و همچنین می تواند در تغذیه سالم به عنوان منبع ضد اکسیدانی مشتق شده به طور طبیعی استفاده شود [۲۱]. ضد اکسیدان ها با خنثی کردن رادیکال های آزاد موجب کاهش آثار مخرب آنها و پیشگیری از انواع بیماری ها می شود. این ترکیبات به خاطر خصوصیات احیاکنندگی و ساختار خود نقش مهمی در به دام انداختن رادیکال های آزاد، فلزات واسطه و حذف اکسیژن یگانه

سنتر سبز و بررسی سمیت سلولی نانوذرات نقره

پراش اشعه ایکس از دستگاه پراش سنج پودری اشعه ایکس مدل Philips X'pert Pro ساخت کشور هلند با منبع لامپ آند مسی Cu K α استفاده شد. برای تعیین اندازه و توزیع پراکندگی نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره قارچ دنبلان، میکروسکوپ الکترونی عبوری (LEO-912AB) با ولتاژ اعمالی ۱۲۰ کیلوولت برای گسیل اشعه الکترونی استفاده شد. ریخت‌شناسی نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره توسط دستگاه میکروسکوپ الکترون روبشی میدان گسیلی (Mira-Xmu) بررسی شد. برای آماده سازی نمونه تصویربرداری، پودر نانوذرات با لایه بسیار نازکی از طلا پوشش داده می شود تا باعث رسانای سطحی شود طوری که مسیر باریکه های الکترونی برگشتی را تغییر ندهد و همچنین پودر نانوذرات نقره بایستی روی یک سطح هادی که بیشتر از جنس آلومینیوم است پخش شده باشد.

کشت سلول سرطانی MCF_7

رده سلولی سینه (MCF_7) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد و برای کشت سلول های سرطانی محیط کشت کامل شامل محیط کشت RPMI 1640 (Roswell park memorial institute) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (Fetal bovine serum: FBS) و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین / استرپتومایسین (Penicillin/Streptomycin) تهیه و به درون فلاسک های مخصوص کشت سلولی اضافه شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۹۵ درصد رطوبت و ۵ درصد CO₂ قرار داده شدند. زمانی که سلول ها ۸۰ درصد کف فلاسک را پر کردند، پاساژ صورت گرفت.

سنجش بقای سلول ها با استفاده از روش MTT

این روش بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول های زنده استوار است که طی آن محلول زرد رنگ MTT تحت تأثیر آنزیم به کریستال های نامحلول فورمازان (Formazan) بنفش رنگ تبدیل می شود. افزایش

خرد شدن به قطعات ریز، در محیط تاریک قرار داده شد تا به طور کامل خشک شود. برای تهیه عصاره آبی، ۱۰۰ گرم قارچ درون بشر ریخته شد و سپس ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر شد به آن اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دمای ۹۰ درجه سانتی گراد جوشانده شد و پس از سرد شدن، توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (Whatman filter paper 1) فیلتر و برای استفاده در یخچال نگهداری شد.

سنتر نانوذرات نقره از عصاره قارچ

۱۰ سی سی از عصاره تهیه شده با ۹۰ سی سی محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار مخلوط و محلول به مدت ۲۴ ساعت روی همزن قرار داده شد و میزان جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis (Shimadzu) در محدوده ۷۰۰-۳۰۰ نانومتر بررسی شد. محلول حاوی نانوذرات ساخته شده توسط سانتریفوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه خالص سازی شد.

نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره قارچ دنبلان، برای تعیین اندازه، خواص ساختاری، خواص نوری و ریخت شناسی به ترتیب با دستگاه های طیف سنجی مادون قرمز (Fourier-Transform infrared spectroscopy: FT-IR)، پراش اشعه ایکس (X-ray diffraction)، میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی (Field-emission scanning electron microscopy: FESEM) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission electron microscopy: TEM) تحلیل و بررسی شد. طیف های مادون قرمز نمونه ها با دستگاه Bruker Tehsor27 ساخت آلمان با استفاده از قرص برومید پتاسیم (KBr) ثبت شد. در روش مادون قرمز ارتعاش پیوندها بررسی می شود که در اثر تغییر طول پیوند یا زاویه پیوند در مولکول ها صورت می گیرد. برای تعیین فازهای بلورین (کریستالی) نانوذرات نقره سنتز شده، همچنین برای اندازه گیری ثابت های کریستالی نانوذرات نقره و محاسبه اندازه بلورک ها از الگوی پراش اشعه ایکس نمونه ها استفاده شد. برای تهیه الگوی

مصرف MTT و ایجاد کریستال‌های بیشتر و تولید رنگ بنفش پر رنگ، نشانه‌ی فعال بودن میتوکندری و حضور سلول‌های سالم در محیط است.

در این پژوهش، برای سنجش سمیت سلولی از آزمون MTT استفاده شد. برای این منظور، پس از تهیه سوسپانسیون سلولی از رده MCF_7 به مقدار 10^4 سلول زنده و سالم در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل داخل پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. ردیف اول پلیت ۹۶ خانه به عنوان شاهد، ردیف دوم به عنوان کنترل و ردیف‌های بعدی به ترتیب با غلظت‌هایی برابر ۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر

میلی‌لیتر از عصاره و نانوذره تیمار داده شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از سپری شدن زمان تیمار، محیط کشت رویی سلول‌ها خارج شد و به هر چاهک ۱۸۰ میلی‌لیتر محیط کشت بدون FBS به همراه ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه و پلیت سلولی به مدت ۴ ساعت دیگر انکوبه شد. پس از چهار ساعت محیط کشت هر چاهک تخلیه و در هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) اضافه و جذب سلول‌ها بعد از ۱۰ دقیقه در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط قرائت‌گر الایزا (ELISA reader) اندازه‌گیری شد. درصد سلول‌های زنده با استفاده از معادله زیر برای هر ردیف محاسبه شد:

$$100 \times (\text{میانگین میزان جذب نوری سلول‌های تیمار/میانگین میزان جذب نوری سلول‌های کنترل}) = \text{درصد سلول‌های زنده}$$

ANOVA) با میزان خطای ($P < 0/05$) به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 و آنالیز واریانس یک طرفه (one way Analysis of variance:



شکل ۲ ساخت نانوذرات نقره از عصاره قارچ دنبلان؛ (الف) محلول نیترات نقره، (ب) عصاره، (ج) ده دقیقه بعد از مخلوط شدن عصاره با نیترات نقره، (د) ۲۴ ساعت بعد از تکان دادن

نقره به وسیله عصاره قارچ دنبلان انجام شد. اولین نشانه تولید نانوذرات نقره تغییر رنگ نانوذرات نقره تغییر رنگ محلول است. رنگ قهوه‌ای تیره حاصل بعد از ۲۴ ساعت نشان از تولید نانوذرات نقره در محلول است که در شکل ۲ نشان داده شده است.

نتایج

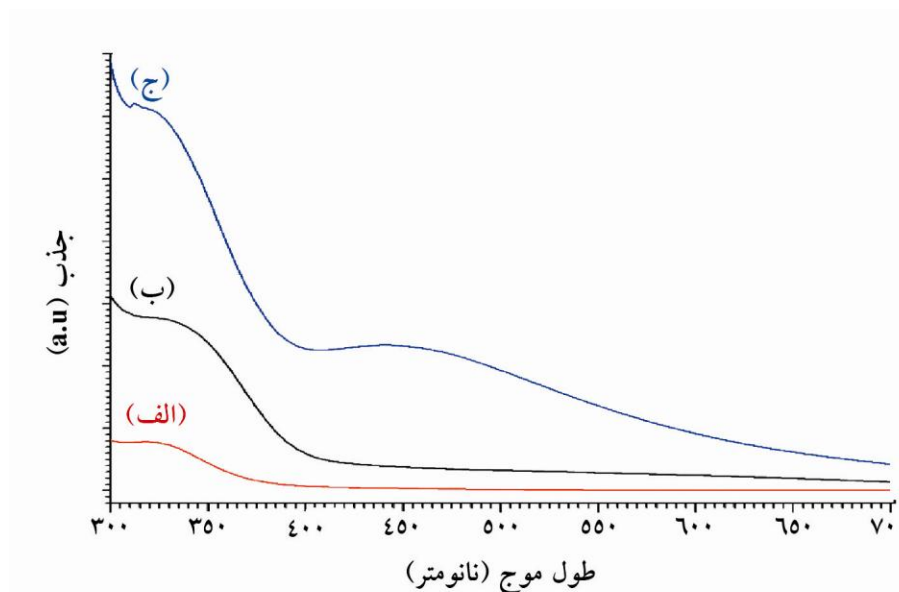
ساخت و طیف‌سنجی ماورای بنفش - مرئی نانوذرات

روش سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از احیای یون‌های

سنتر سبز و بررسی سمیت سلولی نانوذرات نقره

حالی که در عصاره چنین نقطه اوج جذبی مشاهده نمی‌شود. وجود نقطه اوج جذبی حداکثر در منحنی به دست آمده از عصاره به همراه نقره در محدوده ۴۰۰ الی ۴۵۰ یکی از نشانه‌های سنتر نانوذرات نقره است.

نتایج طیف‌سنجی ماورای بنفش مرئی عصاره قارچ دنبلان قبل و بعد از سنتر نانوذرات نقره در شکل ۳ آورده شده است. همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود عصاره به همراه نقره در محدوده ۴۰۰ الی ۴۵۰ نانومتر نقطه اوج (Peak) جذبی دارد در



شکل ۳ جذب اسپکتروفتومتری UV-Vis؛ (الف) نیترات نقره، (ب) عصاره قارچ دنبلان، (ج) نانوذرات نقره

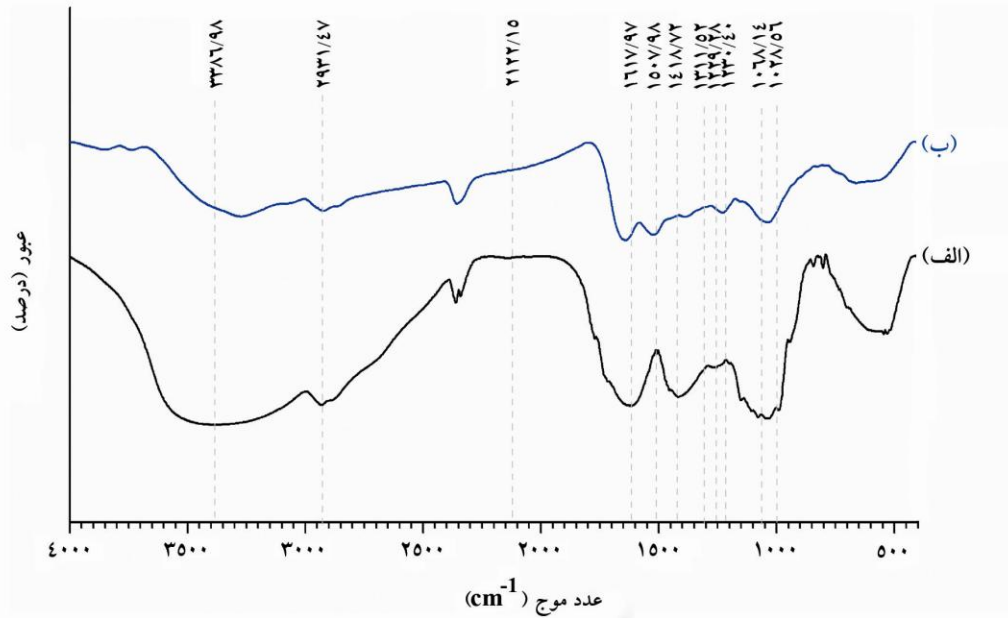
اندازه‌گیری ثابت‌های کریستالی نانوذرات نقره و محاسبه اندازه بلورک‌های نمونه‌ها، از رابطه شرر (Scherrer equation) استفاده شد. در شکل ۵ طیف پراش پرتو اشعه ایکس نانوذرات ساخته شده در زمان ۲۴ ساعت نشان می‌دهد که نقاط اوج مشاهده شده در زوایای ۳۸/۲۲ درجه، ۴۴/۱۹، ۶۴/۶۰ و ۷۷/۵۱ درجه به ترتیب مطابق با صفحات کریستالی (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۰) بودند که دقیقاً منطبق بر طیف استاندارد بالک نقره هستند. اندازه کریستالی نانوذرات نقره از رابطه شرر $D = \frac{k\lambda}{B \cos \theta}$ به دست می‌آید که در رابطه فوق $k=0.9$ عامل شکلی است، λ طول موج پرتو ایکس و معادل 1.5406 \AA است. β پهنای کامل در نصف قله نقطه اوج پراش و θ زاویه مربوط به نقطه اوج پراش است. پهنای کم نقطه اوج ظاهر شده در ۳۸/۲۲ درجه بیانگر اندازه کم

تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات نقره

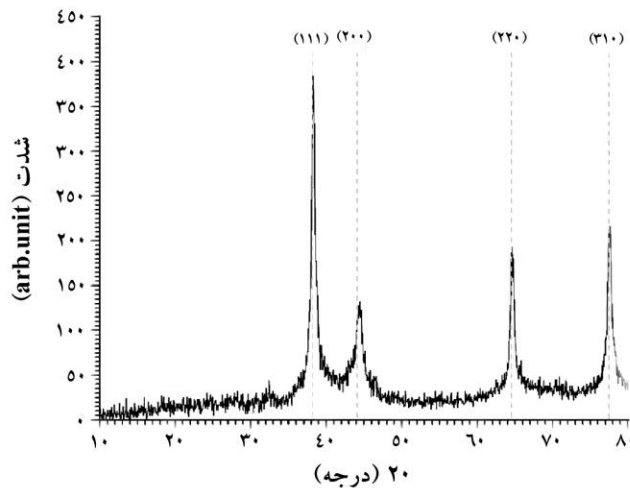
طیف‌های مادون قرمز نمونه‌ها برای تعیین گروه‌های عاملی در ترکیبات با دستگاه طیف‌سنجی FT-IR و با استفاده از قرص KBr ثبت شد. عددهای موجی ۲۹۳۱، ۳۳۸۶، ۲۱۲۲، ۱۶۱۷، ۱۵۰۷، ۱۴۱۸، ۱۳۱۱، ۱۰۲۸ به ترتیب مربوط به ارتعاشات گروه‌های OH ارتعاشی الکل (هیدروکسیل)، متیل کششی غیرمتقارن، C-O کربونیل، COOH کششی غیرمتقارن کربوکسیلات، آمید (II)، خمشی (Scissoring) متیل، متقارن کربوکسیلات، کششی ارتعاشی الکل هستند. طیف نانوذرات ساخته شده نیز به همین روش اندازه‌گیری شد (شکل ۴).

برای تأیید کریستالی بودن نوع فلز تولیدشده و همچنین

این ذره است که از رابطه شرر اندازه کریستالی این نانوذرات برابر با ۲۵ نانومتر است.



شکل ۴ (الف) طیف FT-IR عصاره قارچ دنبان (ب) طیف FT-IR نانوذرات نقره ساخته شده از عصاره قارچ دنبان

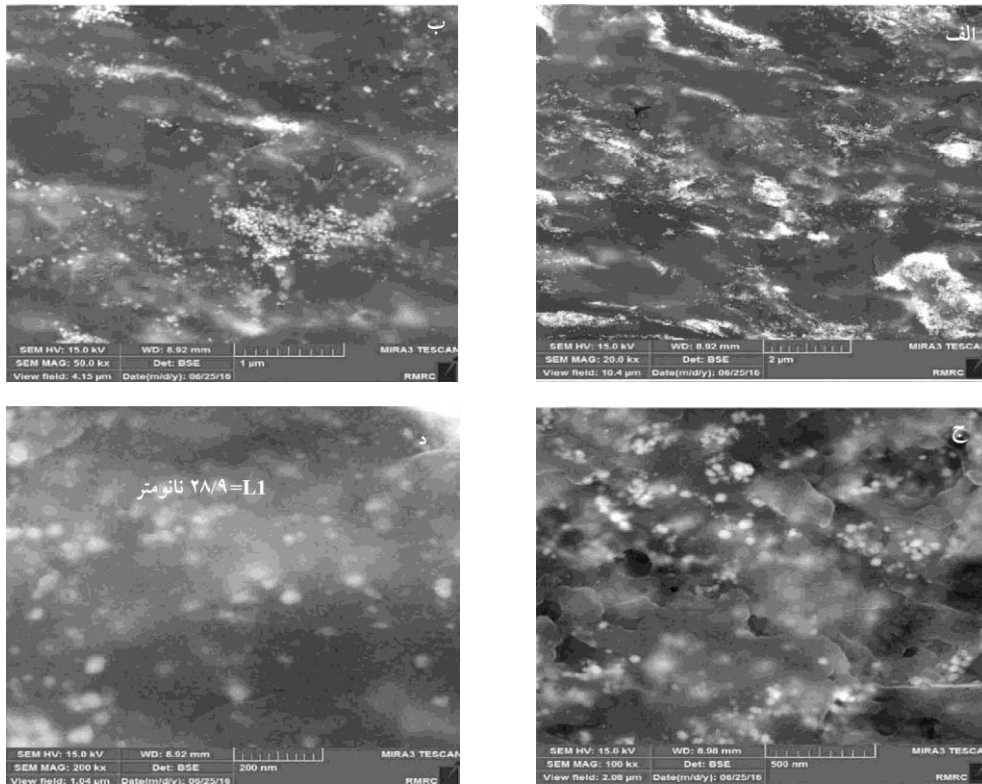


شکل ۵ الگوی پراش اشعه ایکس از نانوذرات نقره سنتز شده در مدت زمان ۲۴ ساعت از عصاره قارچ دنبان

۱ میکرومتر و ۵۰۰ و ۲۰۰ نانومتر نشان می دهد که همه این بزرگنمایی ها برای یک نمونه تهیه شده است. تصاویر نشان می دهد که اندازه تقریبی نانوذرات ساخته شده در مدت زمان ۲۴ ساعت حدود ۲۹ نانومتر است.

ویژگی های ریخت شناسی و اندازه نانوذرات تولید شده با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی بررسی شد. شکل ۶، تصاویر FESEM نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره قارچ دنبان را با بزرگنمایی های مختلف ۲ و

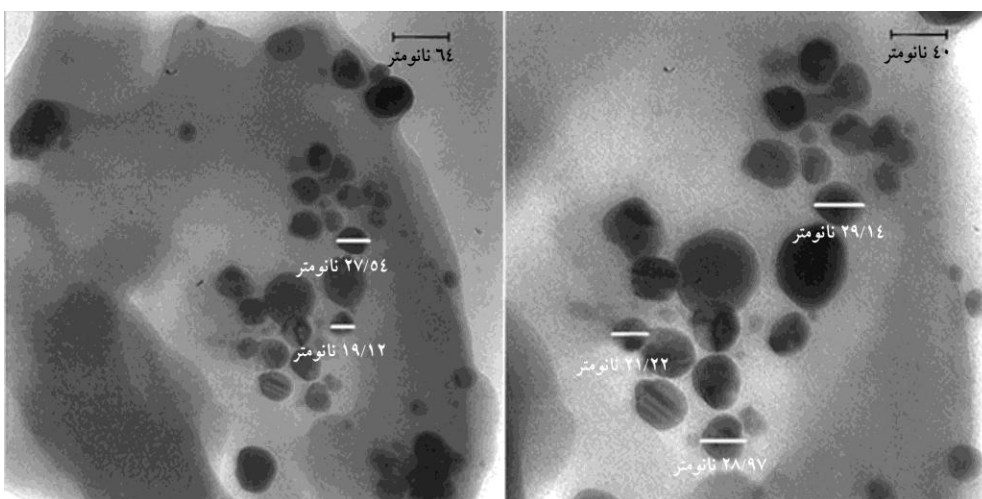
سنتر سبز و بررسی سمیت سلولی نانوذرات نقره



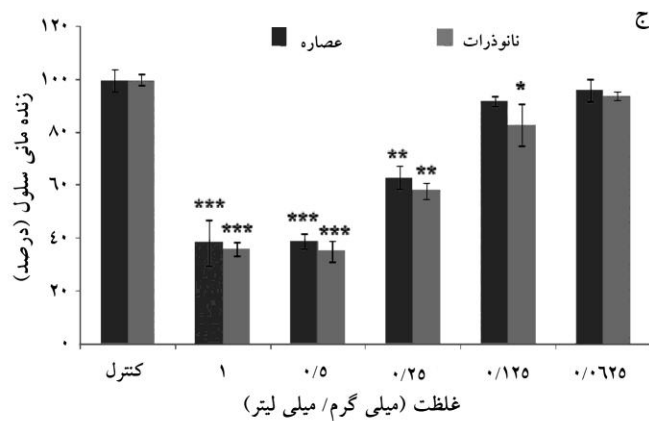
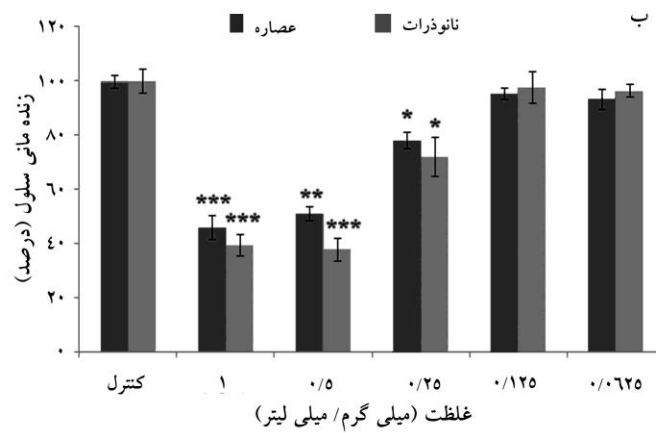
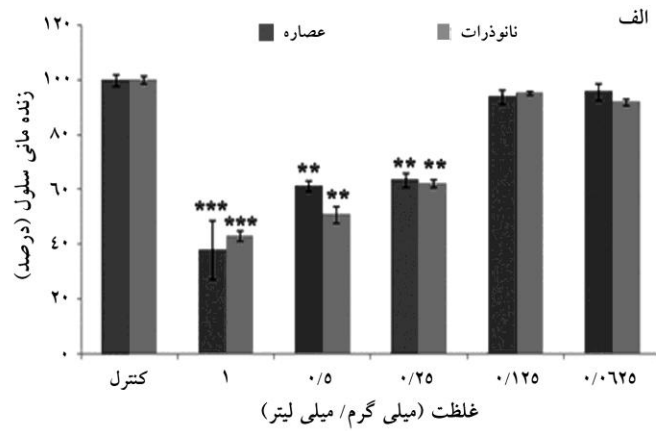
شکل ۶ تصاویر FESEM نانوذرات سنتز شده از عصاره آبی قارچ دنبان

شکل نانوذرات است. با استفاده از تصاویر به دست آمده از TEM اندازه نانوذرات در ۲۴ ساعت بین ۱۵ تا ۳۰ نانومتر تعیین شد (شکل ۷).

برای پی بردن به اندازه دقیق، شکل و توزیع نانوذرات نقره تولید شده توسط عصاره قارچ از میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد، چون راهی مطمئن برای تعیین اندازه و



شکل ۷ تصاویر TEM نانوذرات نقره ساخته شده از عصاره آبی قارچ دنبان



نمودار ۱ (الف) نمودار ستونی مقایسه میانگین زنده مانی سلول های MCF-7 تیمار شده با عصاره قارچ دنبلان و نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره قارچ دنبلان در مدت زمان ۲۴ ساعت در غلظت های مختلف ($P < 0.001$ ***) ($P < 0.01$ ***) ($P < 0.05$ *)، نمودار ستونی مقایسه میانگین زنده مانی سلول های MCF-7 تیمار شده با عصاره قارچ دنبلان و نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره قارچ دنبلان در مدت زمان ۴۸ ساعت در غلظت های مختلف ($P < 0.001$ ***) ($P < 0.01$ ***) ($P < 0.05$ *)، نمودار ستونی مقایسه میانگین زنده مانی سلول های MCF-7 تیمار شده با عصاره قارچ دنبلان و نانوذرات نقره ساخته شده از عصاره قارچ دنبلان در مدت زمان ۷۲ ساعت در غلظت های مختلف ($P < 0.001$ ***) ($P < 0.01$ ***) ($P < 0.05$ *)

و استفاده از فشار، دما و انرژی بالا طی فرآیند واکنش اشاره کرد. با توجه به مشکلات عمده‌ای که در روش‌های شیمیایی و فیزیکی برای تولید نانوذرات نقره وجود دارد نیاز به توسعه روش‌های زیستی سازگار با محیط زیست، مقرون به صرفه بودن و فاقد مواد شیمیایی وجود دارد. یکی از روش‌ها، روش زیستی است که از همگرایی نانوفناوری و زیست فناوری حاصل شده و به سمت توسعه نانوزیست فناوری پیش می‌رود. ساخت زیستی نانوذرات نقره با استفاده از میکروارگانیسم‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و جلبک‌ها جایگزین مناسب برای واکنش‌های معمول شیمیایی است. دلیل محکم برای تلاش برای ساخت نانوذرات نقره با استفاده از سامانه‌های زیستی این است که روش ایمن، ساده، با دوام، غیرسمی سازگار با محیط زیست و مقرون به صرفه است؛ به طوری که در دمای اتاق و بدون نیاز به فشار بالا قابل انجام است و هیچ‌گونه محصولات جانبی سمی تولید نمی‌کند [۱۹].

محصولی و همکاران نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره بذر گیاه کنگد ساختند. در اثر احیای یون نقره و تولید نانوذرات نقره، رنگ نمونه‌ها از زرد کم رنگ به قهوه‌ای تغییر کرد و نشان دهنده تولید سوسپانسیون کلوییدی نانوذرات نقره بود. تحلیل طیف فرابنفش سمرئی وجود نقطه اوج در ۴۲۰ نانومتر نشانگر ساخت زیستی این نانوذرات در عصاره است و تصویر TEM شکل نانوذرات را کروی و میانگین اندازه آن‌ها را در حدود ۱۴ نانومتر تعیین کرد [۲۳].

در تحقیق حاضر نیز ساخت نانوذرات به روش زیستی با استفاده از قارچ دنبلان انجام شد. تغییر رنگ مشاهده شده از زرد به قهوه‌ای پررنگ نشان‌دهنده احیای یون‌های نقره و تشکیل نانوذرات بود و اولین نشانه از تولید نانوذرات نقره محسوب می‌شود. طیف UV-Vis ثبت شده به طور کامل نشان‌دهنده افزایش ارتعاشات پلاسمون سطحی در طول موج ۴۵۰ نانومتر است [۲۴]. نمودار طیف جذبی نشان داد که λ_{max} در حدود ۴۲۰ نانومتر است که با نتایج سایر محققین هم‌خوانی دارد [۲۵-۲۸] همچنین وجود یک نقطه اوج در طیف جذبی

بررسی سمیت سلولی عصاره و نانوذرات نقره قارچ دنبلان روی سلول‌های سرطانی MCF_7 با روش MTT

نتایج حاصل از آزمون MTT با استفاده از تجزیه واریانس زنده مانی سلول‌های در سطح احتمال ۵ درصد و میانگین زنده مانی سلول‌ها بر حسب غلظت و شیب خطی مقایسه میانگین زنده مانی سلول‌ها بررسی شد. نتایج MTT نشان داد که سلول‌های سرطانی MCF_7 در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره ساخته شده به روش سبز از عصاره قارچ دنبلان (۶۲/۵-۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) اثر کشندگی وابسته به غلظت و زمان نشان می‌دهد. مقدار IC50 برای مدت زمان ۲۴ ساعت برای عصاره و نانوذرات روی سلول‌های سرطانی MCF_7 به ترتیب ۷۳۰ و ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر به دست آمد. مقدار IC50 برای مدت زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت برای عصاره و نانوذرات نیز به ترتیب ۵۰۰ و ۳۹۲ میکروگرم/میلی‌لیتر برای ۴۸ ساعت و ۳۹۸ و ۳۱۲ میکروگرم/میلی‌لیتر برای ۷۲ ساعت محاسبه شد. بررسی نمودار ستونی شکل ۸ مقایسه زنده مانی سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره و نانوذرات ساخته شده نشان می‌دهد که با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار، کشندگی نانوذرات و عصاره بیشتر شده است و با مقایسه IC50 محاسبه شده، عصاره و نانوذرات مشخص می‌شود که میزان IC50 نانوذرات پایین‌تر از عصاره است.

بحث

روش‌های مختلفی از جمله روش‌های شیمیایی و فیزیکی برای ساخت نانوذرات نقره در اندازه‌های مختلف وجود دارد. نانوذرات حاصل از این روش‌ها به دلیل استفاده از مواد شیمیایی سمی که نقش عوامل احیایی و تثبیت کننده را ایفا می‌کند، به شدت آتش‌زا است و در طبیعت به صورت تجزیه نشده باقی می‌ماند که در نهایت موجب آلودگی‌های شیمیایی محیط زیست می‌شود. از دیگر معایب این روش‌ها میزان تولید پایین

دلالتهای بر شکل کروی و ایزوتروپ ذرات است. طیف های مادون قرمز نمونه ها برای تعیین گروه های عاملی در ترکیبات با دستگاه طیف سنجی FT-IR ثبت شد. با مقایسه طیف های نانوذرات با عصاره این نتیجه حاصل شد که تغییر باندهای فرکانس ۳۳۸۶ عصاره به ۳۲۷۳ در نانوذره و تغییر فرکانس ۱۶۱۷ عصاره به فرکانس ۱۶۴۱ در نانوذره و نیز تغییر باندهای ۱۳۱۱ عصاره به فرکانس ۱۴۱۷ در نانوذره بیانگر پیوند یون های نقره با گروه های هیدروکسیل و گروه کربوکسیلات است. ایجاد نقطه اوج ضعیف و جدیدی در مقایسه با عصاره در فرکانس ۱۷۸۰ و حذف نقطه اوج ۲۱۲۲ در طیف نانوذره بیانگر ارتعاش کششی کربونیل است و وجود آن دلیل بر احیای یون های نقره از عصاره است و نشان دهنده خاصیت اکسیدکنندگی قوی عصاره قارچ دنبان است (اکسیدکنندگی گروه های هیدروکسیل و کربونیل). براساس این تغییرات (جابه جایی) در باندهای مربوط به گروه های کربونیل و هیدروکسیل و همچنین کم شدن شدت (یا از بین رفتن) گروه های کربونیل و ظهور نقاط اوج کربونیل جدید می توان به نقش این گروه ها در عصاره قارچ دنبان در ساخت نانوذرات نقره اشاره کرد. همچنین وجود نقطه اوج آمیدی (II) در ۱۵۰۷ در عصاره در مقایسه با نقطه اوج ۱۵۸۳ نانوذره بیانگر پیوند نانوذرات نقره با گروه های آمین (I) و (II) آزاد موجود در ساختار پروتئین ها است. در این مطالعه با استفاده از روش XRD از وجود و ساخت نانوکریستال های نقره توسط عصاره قارچ دنبان اطمینان حاصل شد. چهار نقطه اوج مجزا در زوایای ۳۸/۲۲، ۴۴/۱۹، ۶۴/۶۰ و ۷۷/۵۱ درجه که به ترتیب مطابق با صفحات کریستالی (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۰) بودند که منطبق بر طیف استاندارد بالک نقره هستند. با استفاده از این الگو اندازه نانوکریستال های نقره مورد بررسی قرار گرفت. به طوری که اندازه نانوکریستال ها در نانوذرات سنتز شده ۲۵ نانومتر به دست آمد که این یافته کاملاً با نتایج حاصل از پژوهش سایر محققین هم خوانی دارد [۲۹-۲۵].

تصاویر به دست آمده از FESEM نشان داد که شکل

نانوذرات کاملاً کروی است و توزیع آنها نیز یکنواخت است. اندازه تقریبی نانوذرات ۲۹ نانومتر است و تصاویر به دست آمده از TEM نمونه ها به خوبی کروی شکل بودن، توزیع یکنواخت نانوذرات را نشان می دهد. در این تصاویر اندازه نانوذرات بین ۱۵ تا ۳۰ نانومتر تعیین شد. نتیجه فوق با نتیجه حاصل از پژوهش سایر محققین هم خوانی دارد [۲۷-۳۱]، البته لازم به ذکر است که تغییرات دما و pH و مدت زمان و غلظت های مختلف بر هم کنش محلول نمکی و عصاره مورد نظر می تواند بر دامنه تغییرات اندازه نانوذرات تأثیر داشته باشد [۳۲].

وانگ (Wang) و همکاران خواص زیستی قارچ خوراکی دنبان را مطالعه کردند. در این بررسی فعالیت های زیستی بالقوه قارچ مانند آثار ضد ویروسی، ضد میکروبی، ضد اکسیدانی، ضد التهابی، و ضد میکروب سل این قارچ مشخص شد [۲۰]. در مطالعه ای صفایی پور و همکارانش نانوذرات نقره را با استفاده از گل شمعدانی در اندازه ۱۰-۱ نانومتر و متوسط ۶ نانومتر ساختند. در غلظت ۱ میلی گرم/میلی لیتر نانوذرات نقره از رشد سلول های سرطانی تا ۳۰ درصد جلوگیری کرد و در غلظت ۵ میلی گرم/میلی لیتر بیش از ۶۰ درصد از رشد آنها جلوگیری کرده است [۵].

طی مطالعه ای سلیمان (Sulaiman) و همکاران سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از احیای عصاره برگ گیاهی *Eucalyptus chapmaniana* خواص ضد میکروبی و سمیت علیه رده سلولی لوسمی میلوئید HL-60 (HL-60 myeloid leukemia) انجام دادند. تشکیل نانوذرات نقره مبتنی بر تغییر از زرد کم رنگ به قهوه ای تیره و تشکیل یک پیک شدید توسط اسپکتروفتومتر UV-Visible در محدوده ۴۳۰ نانومتر به ثبت رسیده است. در مطالعه آن ها سمیت نانوذرات نقره در زمان های ۶، ۱۲، ۲۴ ساعت بررسی شد. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان دهنده کاهش درصد زنده بودن سلول های HL-60 به صورت وابسته به غلظت در غلظت ۲ میلی مولار بر میلی لیتر در ۲۴ ساعت بود. این نانوذرات منجر به کشندگی ۸۵ درصدی این رده سلولی سرطانی شده بود [۳۳].

سنتز سبز و بررسی سمیت سلولی نانوذرات نقره

ذکر شده باعث شده است که نانوذرات نقره حاصل با استفاده از عصاره قارچ دنبلان دارای آثار مهاری بهتری نسبت به عصاره روی سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 از خود نشان دهد. البته لازم به ذکر است که خود عصاره قارچ دنبلان نیز اثر کشندگی بر سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 دارد ولی در مقایسه با نانوذرات حاصل از عصاره قارچ اثر کمتری دارد؛ بنابراین خود قارچ دنبلان نیز می‌تواند برای از بین بردن سلول‌های سرطانی استفاده شود. با توجه به مطالعات فوق می‌توان نتیجه گرفت قارچ دنبلان به علت خواص دارویی می‌تواند به‌عنوان گزینه مناسب در تولید نانوذرات به روش سبز مطرح باشد. در میان روش‌های تولید نانوذرات، روش تولید سبز روشی پاک، ارزان، کم‌خطر و سازگار با محیط زیست محسوب می‌شود. نانوذرات نقره که با این روش تولید می‌شود به علت عدم به‌کارگیری مواد شیمیایی خطرناک این پتانسیل را دارد تا در صنایع مرتبط با سلامت انسان مانند بهداشت و درمان استفاده شود و نیز نانوذرات نقره حاصل با استفاده از عصاره این قارچ دارای آثار مهاری بهتری نسبت به عصاره روی سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل که نویسندگان مقاله حاضر را در اجرای هر چه بهتر تحقیق یاری کردند صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

در این پژوهش نیز، آثار سمیت نانوذرات ساخته شده پس از تعیین خواص فیزیکی و شیمیایی روی سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 آزمون MTT بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار کشندگی بیشتر شده و مدت زمان ۷۲ ساعت بیشترین اثر کشندگی را دارد. میزان IC50 محاسبه شده برای عصاره و نانوذرات نشان داد که IC50 نانوذرات کمتر از عصاره بوده است بدین معنی که نانوذرات کشندگی بیشتری نسبت به عصاره دارد و یکی از اهداف پژوهش نیز همین بوده است. نانوذرات نقره حاصل با استفاده از عصاره قارچ دنبلان دارای آثار مهاری بهتری نسبت به عصاره قارچ دنبلان بر سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 بود. به نظر می‌رسد دلیل آن ناپایداری پتانسیل غشایی پلاسما توسط نانوذرات نقره باشد که نتیجه آن کاهش سطح آدنوزین تری فسفات (ATP) درون سلول است. این عمل با هدف قرار دادن غشای سلول انجام می‌شود و چون بین غشای سلول‌های سرطانی و طبیعی از لحاظ اندازه منافذ و ریخت شناسی تفاوت‌های وجود دارد باعث مرگ سلول می‌شود. همچنین نانونقره فقط به سطح غشای سلولی نمی‌چسبد بلکه به درون سلول‌ها هم نفوذ می‌کند، نانونقره پس از نفوذ به داخل سلول می‌تواند با تأثیر روی سامانه تنفسی سلول (فرآیند فسفوریلاسیون اکسیداتیو) در میتوکندری باعث ایجاد اختلال در عملکرد آن شود. علاوه بر این آثار نانوذرات نقره در افزایش بیان ژن پروتئاز کاسپاز ۳ در سلول‌های سرطانی و القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در مطالعات مختلف نشان داده شده است [۳۶-۳۴]. بنابراین مجموعه‌ای از عوامل

منابع

- [1] Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine* 2010; 6(2): 257-62.
- [2] Zaboli K, Aliarabi H, Bahari AA, Abbasalipourkabir R. Role of dietary nano-zinc oxide on growth performance and blood levels of mineral: A study on in Iranian Angora (Markhoz) goat kids. *J Pharm Health Sci* 2013; 2(1): 19-26.
- [3] Jain KK. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. *Clin Chim Acta* 2005; 358(1-2): 37-54.

- [4] Bahreini E, Aghaiypour K, Abbasalipourkabir R, Mokarram AR, Goodarzi MT, Saidijam M. Preparation and nanoencapsulation of L-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study. *Nanoscale Res Lett* 2014; 9(1): 340.
- [5] Safaepour M, Shahverdi AR, Shahverdi HR, Khorramizadeh MR, Gohari AR. Green Synthesis of Small Silver Nanoparticles Using Geraniol and Its Cytotoxicity against Fibrosarcoma-Wehi 164. *Avicenna J Med Biotechnol* 2009; 1(2): 111-5.
- [6] Vanaja M, Annadurai G. Coleus aromaticus leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. *Applied Nanoscience* 2013; 3(3): 217-23.
- [7] Bala M, Arya V. Biological synthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of endophytic fungus *Aspergillus Fumigatus* and its antibacterial action. *International Journal of Nanomaterials and Biostructures* 2013; 3(2): 37-41.
- [8] Tolaymat TM, El Badawy AM, Genaidy A, Scheckel KG, Luxton TP, Suidan M. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci Total Environ* 2010; 408(5): 999-1006.
- [9] Real PJ1, Cao Y, Wang R, Nikolovska-Coleska Z, Sanz-Ortiz J, Wang S, Fernandez-Luna JL. Breast cancer cells can evade apoptosis-mediated selective killing by a novel small molecule inhibitor of Bcl-2. *Cancer Res* 2004; 64(21): 7947-53.
- [10] Jia Z, Sun H, Gu Q. Preparation of Ag nano particles with triethanlamine as reducing agent and their antibacterial property. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2013; 419: 174-9.
- [11] Philip D. Green synthesis of gold and silver nano particles using *Hibicus rosa*. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* 2010; 42(5): 1417-24.
- [12] Dubey SP, Lahtinen M, Silanpaa M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nano particles. *Process Biochemistry* 2010; 45(7): 1065-71.
- [13] Shen JM, Gao FY, Yin T, Zhang HX, Ma M, Yang YJ, Yue F. CRGD-functionalized polymeric magnetic nanoparticles as a dual-drug delivery system for safe targeted cancer therapy. *Pharmacological Research* 2013; 70(1): 102-15.
- [14] Awwad AM, Salem NM, Abdeen AO. Green synthesis of silver nanoparticles using carob leaf extract and its antibacterial activity. *Int J Ind Chem* 2013; 4: 29.
- [15] Pantidos N, Horsfall LE. Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants. *J Nanomed Nanotechnol* 2014; 5: 233.
- [16] Wang Y, He X, Wang K, Zhang X, Tan W. Barbated Skullcup herb extract-mediated biosynthesis of gold nanoparticles and its primary application in electrochemistry. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009; 73(1): 75-9.
- [17] Ahmad N, Sharma S, Alam MK, Singh VN, Shamsi SF, Mehta BR, Fatma A. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried

- medicinal plant of basil. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010; 81(1): 81-6.
- [18] Miller RM, Smith CI, Jastrow JD, Bever JD. Mycorrhizal status of the genus *Carex* (Cyperaceae). *Am J Bot* 1999; 86(4): 547-53.
- [19] Rahmani HR, Mohamadi-Goltapeh E. Six Forest Species of Truffles. *Plant Pathology Science* 2016; 5(2): 1-12.
- [20] Wang S, Marcane MF. The biochemistry and biological properties of the world's most expensive underground edible mushroom; Truffles. *Food Research International* 2011; 44(9): 2567-81.
- [21] Eilbert F, Engler-Lohr M, Anke H, Sterner O. Bioactive sesquiterpenes from the basidiomycete *Resupinatus leightonii*. *J Nat Prod* 2000; 63(9): 1286-7.
- [22] Pokorný J. Natural antioxidants for food use. *Trends in Food Science & Technology* 1991; 2: 223-7.
- [23] Mohasseli T, Poursidi Sh. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using aqueous extract of *Sesamum indicum* seeds. *Biotechnology Tarbiat Modares University* 2015; 6(1): 10-20. (Persian) Available from: http://biot.modares.ac.ir/article_13481_en.html
- [24] Thangaraju N, Venkatalakshmi RP, Chinnasamy A, Kannaiyan P. Synthesis of Silver Nanoparticles and the Antibacterial and Anticancer Activities of the Crude Extract of *Sargassum Polycystum* C. Agardh. *Nano Biomed Eng* 2012; 4(2): 89-94.
- [25] Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol Adv* 2013; 31(2): 346-56.
- [26] Jagtap UB, Bapat VA. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* lam. Seed extract and its antibacterial activity. *Industrial Crops and Products* 2013; 46: 132-7.
- [27] Song JY, Kim BS. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess Biosyst Eng* 2009; 32(1): 79-84.
- [28] 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(1): 7-11.
- [29] Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using *Neem* (*Azadirachta indica*) leaf broth. *J Colloid Interface Sci* 2004; 275(2): 496-502.
- [30] Méndez-Vilas A. Bionanoparticles: Synthesis and antimicrobial applications. In: *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. 1th ed, Spain: Formatex Research Center, 2011; p: 228-44.
- [31] Shahverdi AR, Minaeian S, Shahverdi HR, Jamalifar H, Nohi AA. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of *Enterobacteria*: a novel biological approach. *Process Biochemistry* 2007; 42(5): 919-23.
- [32] Sankar R1, Karthik A, Prabu A, Karthik S, Shivashangari KS, Ravikumar V. *Origanum vulgare* mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013; 108: 80-4.
- [33] Sulaiman GM, Mohammed WH, Marzoog

- TR, Al-Amiery AA, Kadhum AA, Mohamad AB. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Eucalyptus chapmaniana* leaves extract. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; 3(1): 58-63.
- [34] Santhoshkumar T, Rahuman AA, Bagavan A, Marimuthu S, Jayaseelan C, Kirthi AV, Kamaraj C, Rajakumar G, Zahir AA, Elango G, Velayutham K, Iyappan M, Siva C, Karthik L, Rao KV. Evaluation of stem aqueous extract and synthesized silver nanoparticles using *Cissus quadrangularis* against *Hippobosca maculata* and *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Exp Parasitol* 2012; 132(2): 156-65.
- [35] Mafune F, Kohno JY, Takeda Y, Kondow T, Sawabe H. Structure and stability of silver nanoparticles in aqueous solution produced by laser ablation. *J Phys Chem B* 2000; 104(35): 8333-7.
- [36] Koyyati R, Nagati V, Merugu R, Manthurpadigya P. Biological synthesis of silver nanoparticles using *Raphanus sativus* var. *Longipinnatus* leaf extract and evaluation of their antioxidant and antibacterial activity. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences (IJMPS)* 2013; 3(4): 89-100.