

Paper Type: Original Article



Characterization and Optimization of Biosynthesized Silver Nano-Particles by Resting Cells of *Aspergillus niger* Using Taguchi Method

Morahem Ashengroph^{1,*} , Somayeh Fattahi¹

¹ Associate Professor in Industrial Microbiology, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Kurdistan, Sanandaj, Iran; m.ashengroph@uok.ac.ir.

¹ MSc Student in Biochemistry, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Kurdistan, Sanandaj, Iran; somayeh.fattahi71@gmail.com.

Citation:

Ashengroph, M., & Fattahi, S. (2024). Characterization and optimization of biosynthesized silver nano-particles by resting cells of *Aspergillus niger* using Taguchi method. *The quarterly scientific journal of applied biology*, 36(4), 24-37.

Received: 11/01/2023

Accepted: 29/04/2023

Abstract

Introduction: Silver nanoparticles (AgNPs) are used in a variety of industries, including coatings, disinfectants, water purification, and medicine, due to their small size and unique physical and chemical properties. To avoid the use of chemicals, extracellular biosynthesis of AgNPs using fungal systems is an appropriate method. In this study, the extracellular biosynthesis of AgNPs by the resting cell of the fungus *Aspergillus niger* ZRS14 was investigated, and the synthesis process was optimized using Taguchi's statistical method.

Methods: The effect of biomass parameters, incubation time, pH, and silver nitrate concentration in three levels was performed using Qualitek-4 software. The characteristics of the synthesized AgNPs were determined by spectroscopic analysis including UV-Vis spectroscopy, X-Ray Diffraction (XRD), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, and Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM).

Results: The results showed that the selected strain under optimal conditions including 2 mM silver nitrate, pH 6, temperature 32 °C, and after 72 hour incubation, spherical silver nanoparticles with an average size of 24 to 38 nm in extracellular form synthesized under resting cell strategy.

Conclusion: Because of the coating of fungi-secreted proteins, synthetic spherical elemental AgNPs have a crystalline nature, a small size, and high stability.

Keywords: Fungal biosynthesis, Spectroscopy, Electron microscope, Elemental silver nanoparticle.



مشخصه‌یابی و بهینه‌سازی نانوذرات نقره سنتز شده توسط سلول در حال استراحت قارچ *Aspergillus niger* به روش ناگوچی

مراحم آشننگرف^۱، سمیه فتاحی^۱

^۱دانشیار میکروبیولوژی صنعتی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، کردستان، سنندج، ایران.
^۲دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، کردستان، سنندج، ایران.

نویسنده مسئول: M.ashengroph@uok.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۳

چکیده

مقدمه: نانوذرات نقره به دلیل اندازه کوچک آن‌ها و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد، در بسیاری از صنایع مانند پوشش‌دهی، ضدعفونی‌کننده، تصفیه آب و بهینه‌سازی در پزشکی استفاده می‌شوند. سنتز زیستی برون سلولی نانوذرات نقره با استفاده از سیستم قارچی، یک روش مناسب برای جلوگیری از استفاده از مواد شیمیایی است. هدف این مطالعه، سنتز زیستی برون نانوذره‌ی نقره توسط سلول در حال استراحت سویه‌ی بومی قارچی *Aspergillus niger* ZRS14 و بهینه‌سازی فرآیند سنتز به روش آماری ناگوچی است.

روش‌ها: اثر پارامترهای زیست توده، زمان گرماگذاری، pH و غلظت نیترات نقره در سه سطح با استفاده از نرم افزار 4-Qualitek انجام شد. تعیین ویژگی نانوذرات نقره سنتز شده توسط آنالیزهای طیف سنجی شامل طیف سنجی UV-Vis، طیف پراش اشعه ایکس (XRD)، طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) و میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد سویه‌ی مذکور تحت شرایط بهینه شامل غلظت ۲ میلی مولار نیترات نقره، pH برابر ۶، دمای برابر ۳۲ درجه‌ی سلسیوس و پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری، نانوذرات نقره کروی با میانگین اندازه‌ی ۲۴ تا ۳۸ نانومتر به صورت برون سلولی و تحت استراتژی سلول در حال استراحت سنتز می‌نماید.

نتیجه‌گیری: نانوذرات نقره عنصری کروی سنتز شده، دارای ماهیت کریستالی، اندازه‌ی نسبتاً کوچک و پایداری بالا به علت پوشش دهی توسط پروتئین‌های ترشح شده از قارچ هستند.

کلیدواژه‌ها: تجزیه مولفه اصلی، جنگل‌کاری خالص و آمیخته، مناطق نیمه خشک، ویژگی‌های رویشی، ویژگی‌های خاک.

۱- مقدمه

فناوری نانو، توانایی طراحی، ساخت و تولید در مقیاس نانومتر یا سطوح اتمی و مولکولی است. به عبارت دیگر، می‌توان گفت که در فناوری نانو، روش‌های مناسب برای تولید سازه‌هایی که حداقل یک بعد آن‌ها در ابعاد نانومتری است، مورد مطالعه قرار می‌گیرد. این فناوری توانسته است توانایی بشر را برای مداخله در ساختار مواد افزایش دهد و او را قادر به طراحی و ساخت در ابعاد بسیار کوچک کند [1]. در سال‌های اخیر روش‌های زیادی از جمله روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای سنتز نانوذرات طراحی شده است که معمولاً منجر به مصرف برخی از واکنشگرها، معرف‌های سمی و صرف انرژی زیاد برای تامین فشار و دمای بالا می‌شود. متداول‌ترین روش شیمیایی برای تولید نانوذرات فلز، کاهش شیمیایی فلز مورد نظر جهت

احیای یک نمک یونی در یک محیط مناسب در حضور سورفاکتانت (عامل احیا کننده) است. بیشتر روش های فیزیکی، فرآیند ساخت دشواری دارند، به انرژی زیادی نیاز دارند و وقت گیر هستند [2]. سنتز میکروبی نانوذرات روشی از شیمی سبز است که ترکیبی از فناوری نانو و فناوری میکروبی است. در روش سنتز میکروبی، کنترل بهتری در توزیع اندازهی نانوذرات تولید شده نسبت به روش های دیگر وجود دارد. میکروارگانیسم ها توانایی بالایی برای تولید نانوذرات با کاربردهای گسترده دارند. سنتز میکروبی نانوذرات به پدیده ای اشاره دارد که در اثر فرآیندهای زیستی یا واکنش های آنزیمی رخ می دهد که تاکنون ساخت نانوذرات طلا، نقره، آلیاژ طلا- نقره، سلنیوم، تلوریوم، پلاتین، پالادیوم، سیلیس، تیتانیوم با استفاده از باکتری ها، قارچ ها، مخمرها، جلبک ها، اکتینومیست ها و ویروس ها ثابت شده است. میکروارگانیسم ها از طریق کاهش یون های فلزی یا تشکیل سولفیدهای فلزی در دفع فلزات سمی نقش مهمی دارند [3]. نانوذرات نقره حاوی ۲۰ تا ۱۵۰۰۰۰ اتم نقره هستند. در مقیاس نانو، نقره خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی قابل توجهی از خود نشان می دهد [4]. نقره کلونیدی به دلیل خواص عالی مانند هدایت خوب و پایداری شیمیایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. فلز نقره بهینه سازی دارای خواص ضد میکروبی خوبی است و با تبدیل آن به اندازه های نانومتر و افزایش نسبت سطح به حجم، این خاصیت را افزایش می دهد. نانوذرات نقره به دلیل مساحت سطح ویژه بالا و بهینه سازی تراکم زیاد اتم های سطح در زمینه های مختلف پزشکی به طور گسترده مورد استفاده قرار می گیرند [4]، [5]. درخشش این فناوری در نانو پزشکی با ارائه امکان تشخیص بیماری ها و حامل های دارو در بدن مشهود است و در ارتباط با شناسایی دقیق و به موقع علت اصلی سرطان، تمرکز فعالیت های تحقیقاتی در سراسر جهان است. نانوذرات نقره بهینه سازی می توانند ویروس ها را از بین ببرند. این ذرات (قطر متوسط ۰/۱ نانومتر) مانع از بازسازی ویروس HIV می شوند. نانوذرات نقره در مقایسه با سایر نانوذرات اثرات بیشتری بر روی باکتری ها و ویروس ها دارند. قبل از آنتی بیوتیک ها، نقره برای درمان زخم ها و سوختگی های شدید استفاده می شد. به دلیل خاصیت ضد میکروبی نقره، آن را در فیلترها برای تصفیه آب آشامیدنی و بهینه سازی برای ضد عفونی آب استخر استفاده می کردند [6]. علاوه بر مصارف متعدد پزشکی، از نانوذرات نقره به دلیل خصوصیات متمایز آن در صنایع کشاورزی، دامپروری، لوازم خانگی، لوازم آرایشی، بسته بندی و صنایع نظامی استفاده می شود [7]. گونه های مختلف قارچی شامل *Fusarium*، *Verticillium sp.*، *Cladosporium*، *A. fumigatus*، *A. niger*، *Aspergillus flavus*، *Penicillium italicum*، *F. semitectum*، *Oxysporum*، *Chaetomium thermophilum* و *Trichoderma longibrachiatum*، *C. halotolerans*، *cladosporioides* سنتز نانوذرات نقره گزارش شده است [5]، [8]، [9]. قارچ ها به دلیل تولید مقادیر زیادی از پروتئین های گوناگون، کنترل راحت و داشتن سمیت پایین، برای سنتز نانوذرات نقره به عنوان احیا کننده و پایدارکننده بسیار مفید هستند. مولکول های زیستی تولید شده توسط قارچ ها می توانند عدم سمیت و پایداری مناسبی را برای نانوذرات سنتز شده توسط قارچ ها تضمین نمایند. قارچ ها در مقایسه با سیستم های باکتریایی توانایی تولید توده ی زیستی بسیار خوبی دارند و فیلتراسیون آن ها بسیار آسان تر است. بهینه سازی در مقایسه با گیاهان، زیست توده ی قارچی در مقایسه با فشارها و استرس های وارده در حین فرآیند سنتز زیستی مقاوم تر می باشد. شایان ذکر است، قارچ ها هم به شکل درون سلولی و هم به شکل برون سلولی قادر به سنتز نانوذرات مختلف هستند [10]. با توجه به مزایای استفاده از سویه های قارچی در سنتز صنعتی نانوذرات فلزی، در این پژوهش بررسی امکان سنتز برون سلولی نانوذرات نقره توسط زیست توده ی سویه ی بومی قارچی *A. niger* ZRS14 تحت استراتژی سلول در حال استراحت و بهینه سازی بررسی و بهینه سازی فاکتورهای مختلف بر روی سنتز نانوذرات نقره توسط روش طراحی تاگوچی مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- قارچ استفاده شده و تهیه سوسپانسیون اسپور

سویه ی بومی قارچ *A. niger* ZRS14 (شماره دسترسی در بانک اطلاعات ژنی KF414527) جداسازی شده از نمونه های خاک جمع آوری شده از معادن روی و سرب انگوران، واقع در استان زنجان، از کلکسیون میکروبی گروه علوم زیستی دانشگاه کردستان تهیه شد. از سویه ی قارچی مذکور در مطالعات قبلی با هدف سنتز برون سلولی نانوذرات اکسید روی [11] و بهینه سازی فرآیند سونوبیولجینگ به منظور استخراج فلزات با ارزش از کاتالیزت فرسوده آگروز خودرو [12] استفاده شده است. با هدف تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ، سویه ی قارچی مذکور روی محیط کشت جامد PDA (Potato dextrose agar) (۲۰۰ گرم در لیتر عصاره ی سیب زمینی لیوفیلیزه شده، ۲۰ گرم در لیتر دکستروز و ۱۵ گرم در لیتر آگار)، در ظروف پتری دیش با قطر ۹ سانتی متر کشت داده شد و به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۰ درجه ی سلسیوس گرما گذاری شد. قارچ رشد کرده در محیط PDA در ابتدا سفید رنگ است که هم زمان با تولید اسپورها رنگ آن سیاه شده و حالت پرزی دارد. پس از گذشت این مدت، زمانی که قارچ به خوبی تولید اسپور کرده باشد، با افزودن ۵ میلی لیتر آب دوبار تقطیر به هر ظرف پتری و با کمک یک میله ی شیشه ای، اسپورها از سطح محیط کشت برداشت شدند. پس از عبور سوسپانسیون حاصل از یک پارچه ی تطهیر به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور، سانتریفیوژ گردید. بعد از دور ریختن فاز

روی، با افزودن آب دوبار تقطیر حاوی ۰/۸۵ نمک کلرید سدیم (وزنی/حجمی) و ۱٪ حجمی/حجمی توین ۸۰ سوسپانسیون اسپور تهیه و با هموسیتومتر (لام نئوبار)، غلظت 10^6 spore/mL از سوسپانسیون اسپور قارچ تنظیم شد [11]، [12].

۲-۲- بررسی سنتز نانوذرات نقره توسط سلول در حال استراحت

۱٪ از سوسپانسیون اسپور تهیه شده در غلظت 10^6 spore/mL را در ارلن‌های ۲۵۰ mL حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع PDB (Potatodextrose broth) (۲۰۰ گرم در لیتر عصاره‌ی سیب زمینی لیوفیلیزه شده، ۲۰ گرم در لیتر دکستروز)، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بر روی شیکر مدور (۱۵۰ دور در دقیقه)، به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد. برای جدا کردن زیست توده‌ی قارچی از محیط کشت PDB از کاغذ صافی واتمن سویه شماره ۴ استفاده گردید. پس از شستشو زیست توده سویه‌ی قارچی مذکور با آب دمن، ۴ گرم در لیتر از زیست توده‌ی قارچی (وزن تر) به‌عنوان زیست کاتالیست در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه سویه غنی شده با ۱ میلی مولار نیترات نقره (خلوص ۹۹٪ و خریداری شده از شرکت سیگماآلدریج) تلقیح شد. ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه‌ی سلسیوس و دور شیکر ۱۵۰ rpm گرماگذاری شد. به‌طور هم‌زمان از محلول نیترات نقره (بدون تلقیح زیست توده‌ی قارچ) و زیست توده‌ی قارچی (بدون حضور نیترات نقره) تحت شرایط کشت مشابه به‌عنوان محیط‌های کنترل استفاده شد. ویژگی نانوذرات نقره عنصری تشکیل شده در واکنش، مورد آنالیزهای چشمی و طیف سنجی مرئی ماورای بنفش قرار داده شد [13].

۲-۳- بهینه‌سازی سنتز نانوذرات نقره توسط روش‌های تک عاملی و طراحی تاگوچی

پارامترهای مختلفی از جمله غلظت پیش ماده نیترات نقره (۱، ۲، ۳، ۴ میلی مولار)، غلظت زیست توده‌ی قارچ (۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ گرم در لیتر بر حسب وزن تر، دما (۲۴، ۲۸، ۳۲ و ۳۶)، pH (۵، ۶، ۷، ۸ و ۹) و زمان گرماگذاری واکنش (۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲ و ۸۴ ساعت) بر روی نرخ سنتز نانوذرات نقره به‌روش تک عاملی بررسی شد. بر اساس مقادیر حاصل از آزمایش‌های بهینه‌سازی تک عاملی، در طراحی آزمایش تاگوچی چهار فاکتور اولیه شامل غلظت نیترات نقره، غلظت زیست توده‌ی قارچ، pH و زمان گرماگذاری مورد بررسی قرار گرفتند و براین اساس برای پارامترها آرایه متعامد L9 طراحی گردید. به منظور انجام آزمایش‌ها از ارلن ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر از آب دیونیزه استفاده شد. تمامی آزمایش‌های طراحی شده توسط روش تاگوچی ۳ بار تکرار شد. تاثیر پارامترهای مختلف، درجه آزادی، مجموع مربعات، واریانس آماری و درصد سهم هر فاکتور در نرخ سنتز نانوذرات نقره توسط روش آماری ANOVA با استفاده از نرم‌افزار 4-Qualtiek تعیین گردید. در نهایت شرایط بهینه واکنش تخمین و آنالیزهای میکروسکوپ الکترونی و طیف سنجی تحت شرایط بهینه به‌دست آمده مورد سنجش قرار گرفت.

۲-۴- استخراج نانوذرات سنتز شده و آنالیزها

با هدف رسوب و تخلیص نانوذرات نقره سنتز شده در واکنش زی تبدیلی تحت سلول در حال استراحت سویه‌ی قارچی *A. niger* ZRS14، ابتدا سوپرناتانت عاری از زیست توده‌ی قارچی از فیلترهای سرسرنگی ۰/۲ میکرونی عبور داده شد. سپس از سانتریفیوژ با دور بالا (۱۳۰۰۰ دور به مدت ۴۰ دقیقه) استفاده شد. رسوب حاصل سه بار با آب دیونیزه استریل و اتانول شستشو داده شد. در نهایت نمونه‌ها توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک (Christ Alpha 1-2Dplus, Germany) و جهت آنالیزهای بعدی مورد بررسی قرار داده شد [13].

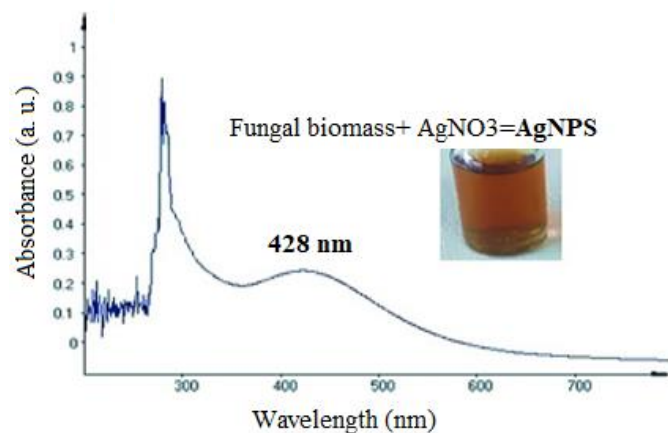
به منظور بررسی اندازه و ریخت‌شناسی سطح نانوذرات سنتز شده و ترکیب عنصری آن‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی مجهز به آشکار ساز EDX استفاده شد که تصاویر ثبت شده از آنالیز با دستگاه MIRA 3-TESCAN ساخت کشور چک حاصل شد. برای تعیین ترکیب‌های شیمیایی و شکل کریستالی نانوذرات نقره سنتز شده توسط زیست توده‌ی قارچی از آنالیز پراش اشعه ایکس استفاده می‌شود. در این پژوهش از دستگاه XRD دارای ولتاژ شتاب‌دهنده ۴۰ کیلووات و آمپراژ ۳۰ میلی‌آمپر با مدل EQUINOX3000 ساخت فرانسه استفاده شد. با هدف بررسی اتصال ترکیبات آلی به سطح نانوذرات و بررسی نقش احتمالی آن‌ها در احیای پیش ساز نقره و به‌عنوان عامل پوشاننده در پایداری نانوذرات زیستی سنتز شده، از آنالیز FTIR (VECTOR 22 Bruker, Germany) برای بررسی پیوندهای شیمیایی و گروه‌های عاملی دخیل در سنتز و پایداری نانوذرات استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

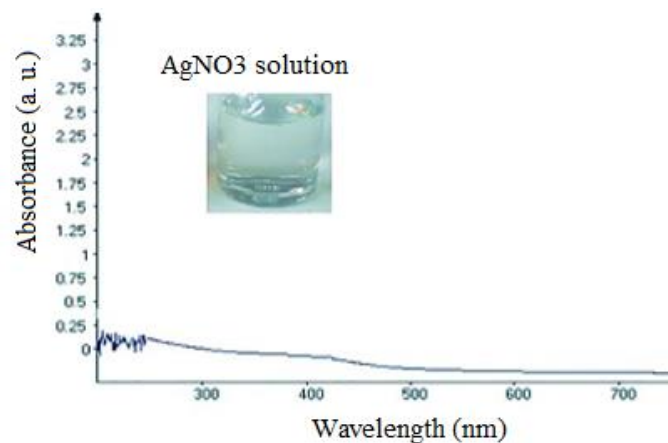
۳-۱- بررسی اولیه سنتز نانوذرات نقره توسط زیست توده‌ی سلول در حال استراحت *A. niger* ZRS14

استفاده از سویه‌های قارچی در تولید نانوذرات به دلیل وجود مقادیر قابل ملاحظه‌ای از آنزیم‌ها و پروتئین‌های ویژه در این میکروارگانیسم‌ها، سهولت کار با آن‌ها در آزمایشگاه، سهولت دسترسی به مقادیر زیاد زیست توده و ایمن بودن آن‌ها از جذابیت بالایی برخوردار است [10]. قارچ‌ها در مقایسه با جمعیت باکتریایی توانایی زیادی در رشد و تحمل یون‌های فلزی دارند و حجم بالایی از نانوذرات تولید می‌کنند. در نتیجه به دلیل کاهش هزینه‌های مالی به باکتری‌ها ترجیح داده می‌شوند [14].

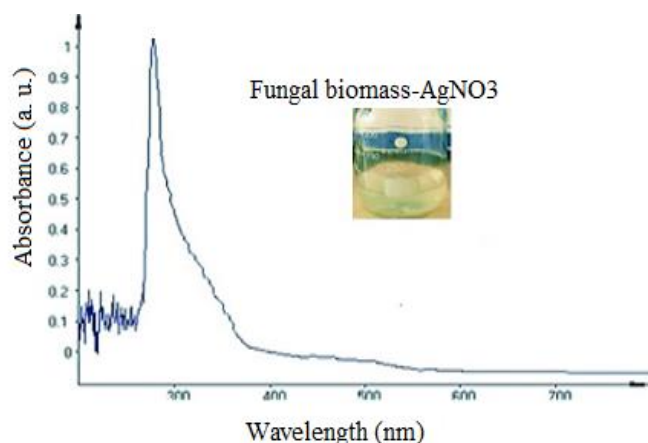
تایید اولیه نانوذرات نقره با مشاهدات چشمی و مطالعه طیف جذبی مری-فرابنفش قابل مشاهده است (شکل ۱-الف). در اثر احیای زیستی نمک نترات نقره به نانوذره‌ی نقره رنگ محلول واکنش به رنگ قهوه‌ای تبدیل شده که براساس منابع موجود نمایانگر تشکیل سوسپانسیون کلوئیدی نانوذرات نقره است. آنالیز نمونه‌ها توسط طیف سنجی مری ماورای بنفش پس از ۲۴ ساعت واکنش زیر تبدیلی تحت سلول در حال استراحت سویه‌ی قارچی مورد مطالعه، یک پیک جذبی مشخص را در طول موج ۴۲۸ نانومتر نشان داد که براساس منابع معتبر حکایت از سنتز نانوذرات نقره عنصری در مخلوط واکنش است [13]. در نمونه‌های کنترل شامل زیست توده‌ی قارچ بدون وجود نترات نقره و محلول نترات نقره بدون تلقیح زیست توده‌ی قارچ، در طول موج مذکور پیک جذبی نانوذرات نقره مشاهده نشده است (شکل ۱-ب و ۱-ج).



الف-



ب-



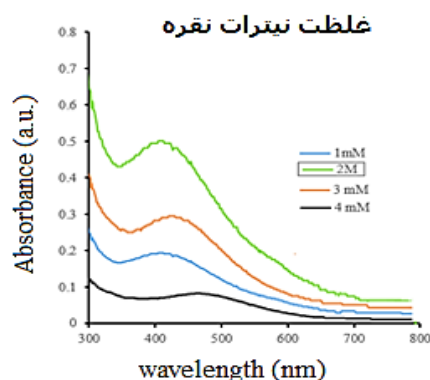
ج-

شکل ۱- مشاهدات چشمی و آنالیزهای طیف سنجی مریی ماورای بنفش محلول نیترات نقره (۱ میلی مولار) تیمار شده با زیست توده‌ی سویه‌ی قارچی *A. niger* ZRS14 (الف) و نمونه‌های کنترل (ب و ج) تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سلسیوس و دور شیکر rpm ۱۵۰ پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری. پیک نمایان شده در محدوده‌ی ۳۰۰ نانومتر مربوط به پروتئین‌های ترشح شده توسط سویه‌ی قارچی است.

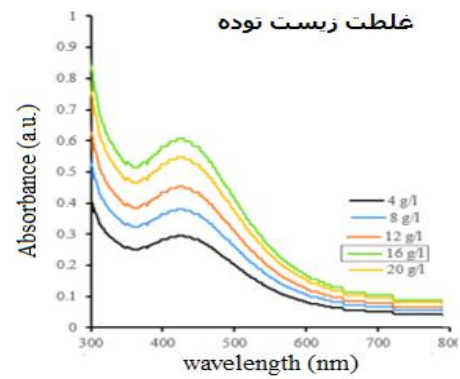
Figure 1- Visual observations and UV- visible absorption spectra of silver nitrate solution (1 mM) treated with the biomass of the fungal strain *A. niger* ZRS14 (a) and control samples (b, c) under experimental conditions: temperature 30 °C, shaker speed 150 rpm, and time incubation 24h.

۳-۲- بهینه‌سازی فاکتورهای موثر در فرآیند تولید نانوذرات نقره به روش تک عاملی

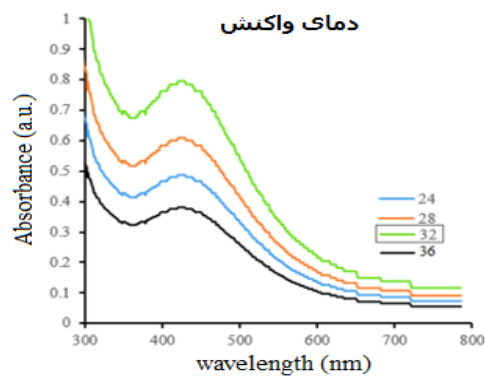
علی‌رغم مزایای فراوان بیوسنتز نانوذرات، تولید نانوذرات با اشکال و اندازه‌های مختلف و بهینه‌سازی افزایش راندمان تولید، همواره یک چالش بوده است، زیرا به خوبی درک شده است که کاربردهای بالقوه و متنوع نانوذرات به شدت به شکل و اندازه آن‌ها بستگی دارد و به همین دلیل نیاز فوری به کنترل اندازه، شکل و افزایش راندمان تولید نانوذرات از طریق تاثیر پارامترهای مختلف بر روی راندمان سنتز وجود دارد [15]. توانایی سنتز برون سلولی نانوذرات نقره شامل ترشح آنزیم‌ها و سایر ملکول‌های زیستی توسط قارچ است که می‌تواند یون‌های نقره را به نانوذرات تبدیل نمایند. برای بهینه‌سازی تولید نانوذرات نقره با استفاده از قارچ *A. niger* ZRS14، عوامل مختلفی باید نظر گرفته شوند. این عوامل شامل شرایط کشت (دما، pH و در دسترس بودن مواد مغذی)، غلظت یون نقره در محیط کشت که می‌تواند بر اندازه و شکل نانوذرات سنتز شده تاثیر بگذارد و زمان گرماگذاری مورد نیاز برای سنتز نانوذرات نقره است. با بهینه‌سازی این عوامل می‌توان کارایی و راندمان نرخ سنتز نانوذرات نقره را با استفاده از قارچ مذکور افزایش داد. بهینه‌سازی بهینه‌سازی فرآیند می‌تواند ابزار مفیدی برای دستیابی به نانوذرات با کیفیت بالا با خواص مطلوب باشد. در این پژوهش بهینه‌سازی فاکتورهای مختلفی از جمله دما، pH شرایط کشت، وزن زیست توده‌ی قارچی، غلظت نیترات نقره و زمان گرماگذاری انجام گرفت. به طور کلی هدف از بهینه‌سازی این عوامل دستیابی به نانوذرات با اندازه همگن و پایدارتر و بهینه‌سازی افزایش راندمان تولید بود (شکل ۲-الف تا شکل ۲-ه).



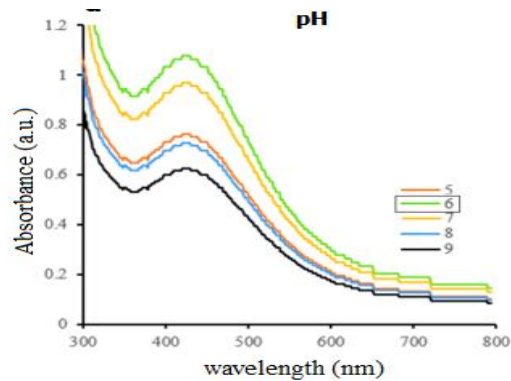
الف-



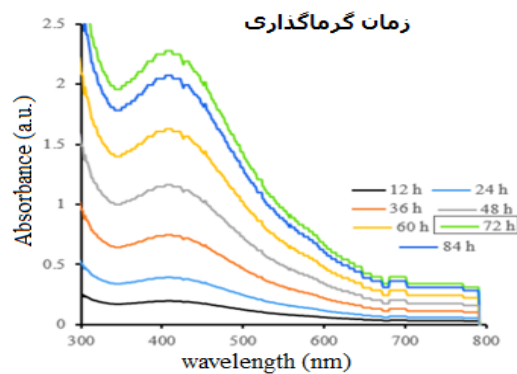
ب-



ج-



د-



ه-

شکل ۲- مشاهدات چشمی و آنالیزهای طیف سنجی مری ماورای بنفش محلول نیترات نقره (۱ میلی مولار) تیمار شده با زیست توده سویه قارچی *A. niger* ZRS14 (الف) و نمونه‌های کنترل (ب و ج) تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سلسیوس و دور شیکر ۱۵۰ rpm پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری. پیک نمایان شده در محدوده ۳۰۰ نانومتر مربوط به پروتئین های ترشح شده توسط سویه قارچی است.

Figure 2- Visual observations and UV- visible absorption spectra of silver nitrate solution (1 mM) treated with the biomass of the fungal strain *A. niger* ZRS14 (a) and control samples (b, c) under experimental conditions: temperature 30 °C, shaker speed 150 rpm, and time incubation 24h.

بعد از گذشت ۲۴ ساعت از واکنش زیست توده‌ی قارچی در حضور غلظت‌های مختلف نمک نیترات نقره، هر نمونه به طور جداگانه مورد آنالیز اسپکتروفتومتری قرار داده شد. براساس مشاهدات به‌دست‌آمده، حداکثر نرخ سنتز نانوذرات نقره در غلظت ۲ میلی‌مولار از محلول نیترات نقره به دست آمد (شکل ۲-الف). وجود نیترات نقره در مخلوط واکنش تبدیل زیستی به نحوی باعث آزاد شدن عامل احیا کننده از سلول قارچی می‌شود. افزایش غلظت نیترات نقره موجب افزایش میزان آزاد شدن عامل احیا کننده شده که در نتیجه آن نیترات نقره، بیشتر در معرض عامل احیا کننده قرار گرفته و میزان تولید نیز بالاتر می‌رود. اما نکته مهم در اینجا این است که این افزایش غلظت و تاثیر متقابل آن در افزایش راندمان تولید دارای حد آستانه است و غلظت‌های بالاتر از حد آستانه باعث کاهش راندمان تولید می‌شود. در این مطالعه، میزان این حد آستانه یا به عبارتی همان غلظت بهینه نیترات نقره برابر با ۲ میلی‌مولار به دست آمد. نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری تحت غلظت بهینه ۲ میلی‌مولار از نمک نیترات نقره و در حضور غلظت‌های مختلف از زیست توده‌ی قارچی تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سلسیوس و دور شیکر ۱۵۰ rpm با اسپکتروفتومتر مورد آنالیز قرار گرفت (شکل ۲-ب). مقایسه نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که با افزایش وزن زیست توده‌ی قارچی از ۴ تا ۱۶ گرم بر لیتر، یک افزایش تدریجی در طیف جذبی مرتبط با تشکیل نانوذرات نقره در مخلوط واکنش زی‌تبدیلی مشاهده شد. با این حال حداکثر تولید نانوذرات نقره مربوط به غلظت ۱۶ گرم در لیتر زیست توده‌ی قارچی است که به‌عنوان وزن بهینه زیست توده‌ی قارچی در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. بهینه‌سازی در این مطالعه، سنتز نانوذرات در دماهای ۲۴، ۲۸، ۳۲ و ۳۶ درجه سلسیوس مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست‌آمده دمای بهینه ۳۲ درجه سلسیوس حاصل شد (شکل ۲-ج). نتایج تاثیر pH‌های مختلف بر روی نرخ سنتز نانوذرات، حکایت از pH بهینه برابر ۶ دارد (شکل ۲-د). در نهایت و به منظور بهبود واکنش احیای زیستی نمک نیترات نقره به نانوذرات نقره، اثرات دوره‌ی گرماگذاری تحت شرایط بهینه شده توسط روش تک عاملی (غلظت ۲ میلی‌مولار نیترات نقره، غلظت ۱۶ گرم در لیتر زیست توده‌ی قارچی، دمای بهینه ۳۲ درجه سلسیوس و pH بهینه برابر ۶) در مخلوط واکنش زی‌تبدیلی مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۲-ه). براساس نتایج به‌دست‌آمده، یک افزایش تدریجی در طیف جذبی نانوذرات نقره از ساعت ۱۲ تا ۷۲ وجود دارد که حداکثر جذب در ساعت ۷۲ مشاهده گردید. قارچ‌های رشته‌ای در خط مقدم سنتز زیستی نانوذرات مختلف شامل طلا، نقره، مس، سلنیوم، تلوریوم، اکسید روی، اکسید آهن و اکسید کبالت بوده‌اند. در بین جنس‌های قارچی، دو جنس *Aspergillus* و *Fusarium* بیشترین پژوهش‌ها را برای سنتز سبز نانوساختارهای متنوع داشته‌اند. ویگنشاواران و همکاران [16] در مطالعه خود قارچ *A. flavus* را از خاک جدا نمودند و به‌عنوان بیوکاتالیست در سنتز نانوذرات نقره مورد بررسی قرار دادند. قارچ مذکور در هنگام مواجهه با یون‌های نقره آبی، موفق به سنتز نانوذرات نقره در اندازه‌ی زیر ۹ نانومتر بعد از ۷۲ ساعت واکنش زیست تبدیلی در دیواره سلولی خود شد. نانوذرات تولید شده به کمک پروتئین به صورت پایدار درآمدند که به نظر می‌رسد پروتئین‌های قارچی مسئول این پایداری بودند. گاد و همکاران [17]، قارچ *A. niger* را از خاک جدا نموده و جهت سنتز خارج سلولی نانوذرات نقره از آن استفاده کردند. تغییر رنگ از زرد به سیاه مایل به قهوه‌ای گرماگذاری شده با محلول نیترات نقره با غلظت ۲ میلی‌مولار در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت، نشان‌دهنده تشکیل نانوذرات نقره بود. میزان pH محیط واکنش زیست تبدیلی، نقش بسیار مهمی در فرآیند سنتز نانوذرات فلزی ایفا می‌کند. در این مطالعه سنتز نانوذرات با اندازه‌های مختلف در pH‌های ۵ تا ۷ مورد بررسی قرار گرفت. سگر و آشوک [18] موفق به سنتز نانوذرات نقره در محدوده‌ی اندازه‌ی بین ۱ تا ۲۰ نانومتر، در محلول واکنش حاوی ۱۰ میلی‌مولار نیترات نقره در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری تحت استراتژی عصاره‌ی عاری از توده‌ی میسیلیوم قارچ *A. niger* شدند. گیوکاد و همکاران [19] با موفقیت سنتز سبز نانوذرات نقره را از شش گونه *Fusarium* یعنی *F. solani*، *F. graminearum*، *F. oxysporum*، *F. culmorum*، *F. scirpi* و *F. tricinctum* گزارش کرده‌اند. اندازه نانوذرات سنتز شده توسط گونه‌های مختلف از ۲۴ تا ۴۵ نانومتر بود که در این بین *F. oxysporum* کوچک‌ترین و *F. tricinctum* بزرگترین نانوذرات را سنتز کرده‌اند. فاراگ و همکاران [20] در مطالعه‌ی خود سنتز نانوذرات نقره با استفاده از قارچ *A. niger* جدا شده از خاک به صورت خارج سلولی و بررسی آن از نظر قابلیت بهبودی زخم مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها خاصیت ضد میکروبی کارآمد ذرات نقره را تایید کردند و نشان دادند که نانوذرات نقره به طور قابل توجهی سمیت سلولی را بر روی سلول‌های میزبان کاهش داد. اگرچه روش سنتز زیستی نانوذرات ساده به نظر می‌رسد، اما استاندارد سازی چندین فاکتور مانند دما، غلظت پیش ساز، pH، نوع محیط و کمیت زیست توده می‌تواند منجر به ساخت نانوساختارهایی با ویژگی‌های مطلوب شود؛ بنابراین، بهینه‌سازی مناسب برای دستیابی به نانوذراتی با توزیع مناسب، پایداری و زیست سازگاری نانوذرات کاملاً ضروری است. دما یک فاکتور حیاتی در برخی مطالعات است، زیرا زمان لازم برای سنتز با ساخت نانوذرات را کنترل می‌کند. شهزاد و همکاران [21] با استفاده از *A. fumigatus*، نانوذرات نقره‌ای با ابعاد ۳۲۲/۸ نانومتر و ۱۰۷۳/۴۵ نانومتر را به ترتیب در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و ۵۵ درجه سلسیوس به دست آوردند. با این حال، کاهش اندازه نانوذرات با افزایش دما در *F. oxysporum* و *Trichoderma viride* مشاهده شد. پارامتر دیگری که بر خصوصیات نانوذرات تاثیر دارد، pH محیط واکنش است. pH بالاتر برای افزایش سنتز نانوذرات فلزی، به ویژه نقره در *F. oxysporum*، *Penicillium oxalicum*، *Epicoccum nigrum* و

Colletotrichum sp مورد شناسایی قرار گرفته است. این موضوع به افزایش رقابت بین پروتون‌ها و یون‌های فلزی برای شروع تشکیل پیوند با دامین‌های دارای بار منفی نسبت داده شده است. با این حال، سنتز موفقیت آمیز در pH خنثی یا کمی قلیایی در *Guignardia mangiferae* و *Isaria fumosorosea* گزارش شده است [22]. ترکیب محیط واکنش حاوی سوبستراهای پیش ساز که باعث سنتز و آزادسازی آنزیم‌های مورد استفاده در احیای فلز می‌شود، اثر متوسطی دارد. در مورد تشکیل نانوذرات مقدار زیست توده قارچی مورد استفاده، تاثیر قابل توجهی بر ویژگی‌های نانوذرات دارد، زیرا مطالعات متعددی سرعت سنتز نانوذرات را در استفاده از غلظت کم زیست توده گزارش می‌کنند. در حالی که سایرین نرخ سنتز بالاتری را با غلظت‌های بالاتر نشان می‌دهند؛ بنابراین، تعادل مناسب بین مقدار زیست توده قارچی و مقدار نمک فلزی، پیش نیاز سنتز بهینه نانوذرات است.

۳-۳- بهینه‌سازی سنتز زیستی نانوذرات نقره به‌وسیله‌ی روش طراحی تاگوچی

در این بخش از پژوهش با هدف دستیابی به اثر تغییر سطح هر یک از متغیرهای واکنش بر روند نرخ سنتز نانوذرات نقره، برهمکنش بین متغیرهای واکنش، تعیین سهم نسبی هر فاکتور، تعیین شرایط بهینه و در نهایت سنجش نرخ سنتز نانوذرات نقره تحت شرایط بهینه شده واکنش، از روش آماری تاگوچی به‌عنوان یکی از پرکاربردترین روش‌های فاکتوریل جزئی استفاده شد [23]. برای این منظور نیترات نقره در سه غلظت ۱، ۲ و ۳ میلی مولار، غلظت زیست توده‌ی قارچ در غلظت‌های ۱۲، ۱۶ و ۲۰ گرم در لیتر، pH‌های برابر ۵، ۶ و ۷ و زمان گرماگذاری ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، به‌عنوان فاکتورهای موثر در نظر گرفته شدند. آرایه متعامد برای متغیرها و سطوح انتخاب شده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- فاکتورها و سطوح انتخاب شده در مدل تاگوچی برای بررسی سنتز نانوذرات نقره توسط قارچ *A. niger* ZRS14
Table 1- Factors and their levels employed in the Taguchi experimental design for silver nanoparticle production by *A. niger* ZRS14.

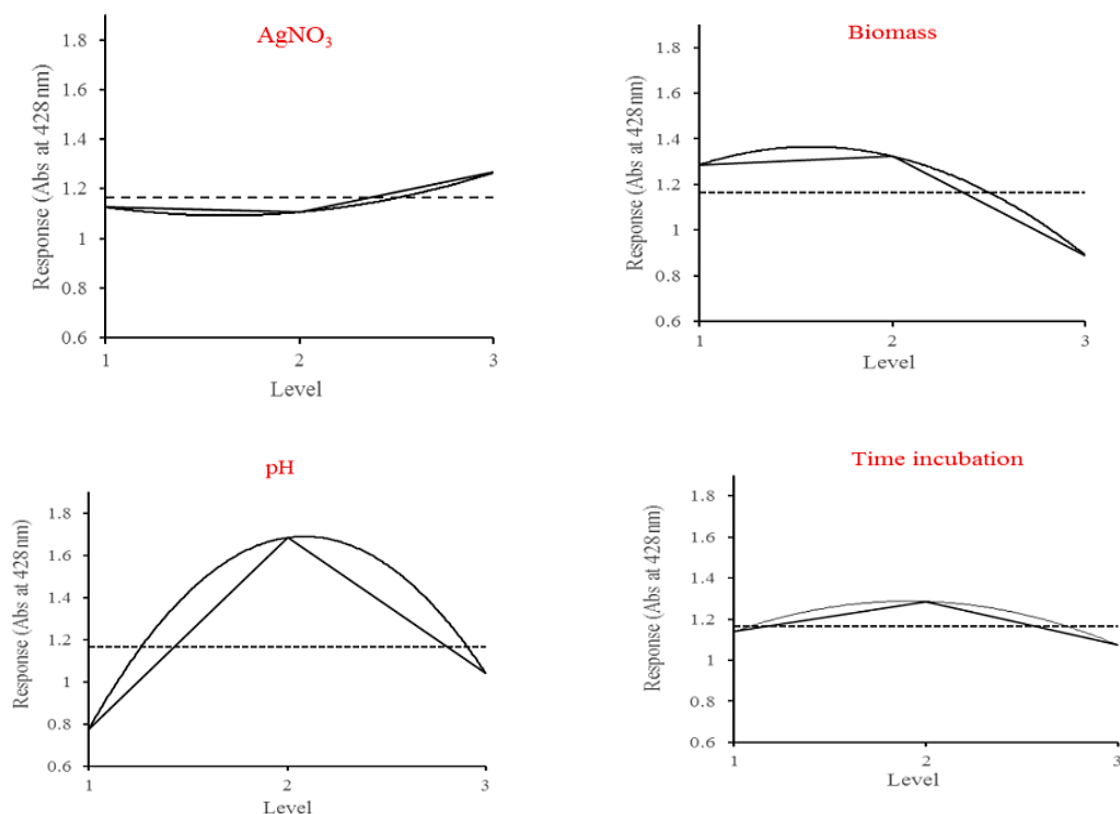
Factor	Level 1	Level 2	Level 3
AgNO ₃ (mM)	1	2	3
Fungal biomass (g/l)	12	16	20
pH	5	6	7
Incubation time (h)	48	72	96

با توجه به تعداد متغیرها، سطوح انتخاب شده و اثر متقابل بین جفت فاکتورها، درجه آزادی برابر ۸ است که لزوم انتخاب آرایه متعامد L9 با ۹ آزمایش مختلف را ایجاب می‌کند (جدول ۲). همانطور که در جدول نشان داده شده است نرخ سنتز نانوذرات نقره به‌دست‌آمده از طیف جذبی نانوذرات نقره در طول موج ۴۲۸ نانومتر و بر مبنای اثر ترکیبی فاکتورهای انتخاب شده در محدوده ۰/۵۶ تا ۱/۹۲ است.

جدول ۲- طراحی آرایه متعامد L9 تاگوچی برای بهینه‌سازی سنتز نانوذرات نقره توسط قارچ *A. niger* ZRS14
Table 2- L9 orthogonal array of designed experiments for optimization of silver nanoparticles production by *A. niger* ZRS14.

Serial No.	1 (AgNO ₃)	2 (Biomass)	3 (pH)	4 (Time Incubation)	Response (Abs at 428 nm)
1	1	1	1	1	0.83
2	1	2	2	2	1.92
3	1	3	3	3	0.63
4	2	1	2	3	1.65
5	2	2	3	1	1.11
6	2	3	1	2	0.56
7	3	1	3	2	1.38
8	3	2	1	3	0.94
9	3	3	2	1	1.48

در ادامه این مطالعه، اثر تغییر سطح هر کدام از متغیرهای مورد بررسی بر نرخ سنتز نانوذرات نقره تحت سلول در حال استراحت سویه قارچی *A. niger* ZRS14 بررسی شد (شکل ۳). همانگونه که در شکل مشاهده می‌شود بالاترین راندمان نرخ سنتز نانوذرات نقره در سطح سه نمک نیترات نقره (۳ میلی مولار) و سطح‌های دو زیست توده‌ی قارچ (۱۶ گرم در لیتر بر حسب وزن تر)، pH (۶) و زمان گرماگذاری (۷۲ ساعت) مشاهده گردید.



شکل ۳- اثر تغییر سطح هر یک از متغیرهای واکنش بر روند بیوسنتز نانوذرات نقره توسط قارچ *A. niger* ZRS14
 Figure 3- The effect of individual factors at different levels on the biosynthesis of silver nanoparticles by *A. niger* ZRS14.

در ادامه ارزیابی میانکنش بین جفت فاکتورهای مورد آزمایش در سنتز نانوذرات نقره توسط قارچ *A. niger* ZRS14 بررسی شد که نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است. همانطور که در جدول مشاهده می شود در مجموع شش میانکنش مشاهده شده که بالاترین درصد تاثیر شدت متقابل معادل ۶۰/۲۹٪ بین دو فاکتور نیترات نقره و زمان گرماگذاری مشاهده شد. این در حالی است که کمترین درصد میانکنش معادل تقریباً ۰٪ بین نیترات نقره و pH مشاهده گردید. با بررسی میانکنش بین جفت فاکتورهای یک واکنش می توان نتیجه گرفت که تاثیر یک متغیر واکنش روی فرآیند بهینه سازی کاملاً وابسته به شرایط متغیرهای دیگر واکنش است [24].

جدول ۳- میانکنش بین جفت فاکتورهای مورد آزمایش در سنتز نانوذرات نقره توسط قارچ *A. niger* ZRS14

Table 3- Interaction between pairs of factors tested in the synthesis of silver nanoparticles by *A. niger* ZRS14.

Factors	% Severity Index (SI)	Optimum Conditions
AgNO ₃ × Time incubation	60.29	(2, 1)
AgNO ₃ × Biomass	59.92	(2, 1)
pH × Time incubation	26.1	(2, 2)
Biomass × Time incubation	9.55	(2, 2)
Biomass × pH	5.88	(2, 2)
AgNO ₃ × pH	0	(1, 2)

در جدول ۴، نتایج آنالیز واریانس مربوط به سنتز نانوذرات نقره توسط قارچ *A. niger* ZRS14 با ۹۵٪ اطمینان در قالب جدول ANOVA ارائه شده است. ستون آخر جدول ANOVA سهم نسبی هر فاکتور در فرآیند بهینه سازی نرخ سنتز نانوذرات نقره را نشان می دهد. فاکتور pH موثرترین عامل و پس از آن غلظت زیست توده ی قارچی و زمان گرماگذاری به ترتیب بیشترین تاثیر پذیری را داشتند. غلظت نیترات نقره کمترین تاثیر پذیری را در بهینه سازی فرآیند سنتز زیستی نانوذرات نقره توسط سویه ی قارچی *A. niger* ZRS14 داشته است.

جدول ۴- نتایج آنالیز واریانس مربوط به سنتز نانوذرات نقره توسط قارچ *A. niger* ZRS14
 Tabel 4- ANOVA of Taguchi experimental results related to silver nanoparticle synthesis by *A. niger* ZRS14.

Factor	DOF	Sums of Squares	Variance	Pure Sum	% Influence of each Factor
AgNO ₃	2	0.45	0.022	0.045	2.577
Biomass	2	0.346	0.173	0.346	19.586
pH	2	1.305	0.652	1.305	73.789
Time incubation	2	0.071	0.035	0.071	4.04
Other/error total	8	1.768			%100

به منظور تخمین ترکیب سطح بهینه فاکتورهای استفاده شده در فرآیند سنتز زیستی نانوذرات نقره توسط سلول در حال استراحت سویه ی بومی قارچی *A. niger* ZRS14 از روش آماری "هرچه بزرگتر بهتر (Bigger to Bigger Analysis)" پیشنهاد شده توسط نرم افزار Qualitek-4 استفاده شد. سطح مطلوب فاکتورهای مورد آزمایش، مقدار بهینه هر فاکتور و درصد سهم هر فاکتور در سنتز نانوذرات نقره و هم چنین ماکزیمم جذب نانوذرات نقره در طول موج ۴۲۸ نانومتر پیش بینی شده تحت شرایط بهینه در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول ۵- شرایط بهینه پیش بینی شده توسط نرم افزار Qualitek برای بهبود عملکرد قارچ *A. niger* ZRS14 در سنتز نانوذرات نقره.

Tabel 5- Optimum conditions predicted using Qualitek-4 software to improve the performance of *A. niger* in the synthesis of silver nanoparticles.

Factor	Level Description	Level	Contribution
AgNO ₃	3 mM	3	0.099
Biomass	16 g/L	2	0.156
pH	6	2	0.516
Time incubation	72 h	2	0.12

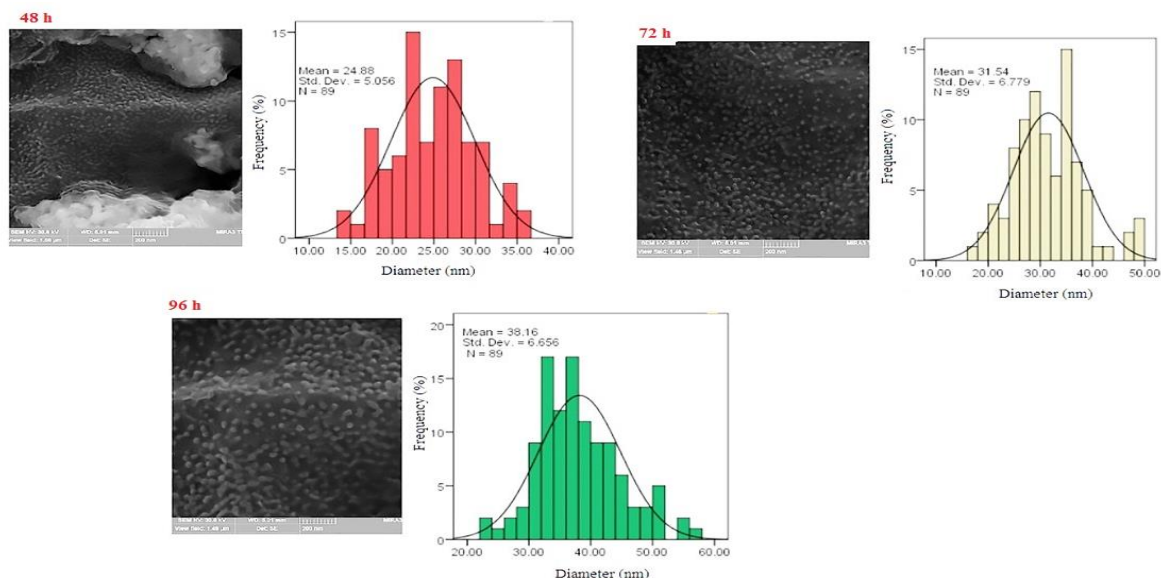
Current grand average of performance: 2.057
 Expected result at optimum condition: 2.105

همانگونه که در جدول ۵ مشاهده می شود بر مبنای شرایط پیش بینی شده توسط روش طراحی تاگوچی انتظار می رود که میزان پاسخ پیش بینی شده (جذب نانوذرات نقره در طول موج ۴۲۸ نانومتر) بر اساس ترکیب بهینه فاکتورهای مورد آزمایش ۲/۰۵۷ باشد. برای انجام آزمایش تاییدی میزان جذب نانوذرات نقره پیش بینی شده تحت شرایط بهینه با میزان جذب به دست آمده در شرایط آزمایش با یکدیگر مقایسه می شود و چنانچه در فاصله مطلوب قرار گیرد، طراحی آزمایش درست و بهینه سازی به پایان می رسد.

به همین علت آزمایشی با استفاده از زیست توده ی قارچی و بر اساس ترکیب سطح بهینه فاکتورهای به دست آمده در جدول ۵ انجام و جذب نانوذرات نقره ارزیابی شد. همان گونه که در جدول مشخص است، جذب نانوذرات نقره در طول موج ۴۲۸ نانومتر پیش بینی شده در شرایط بهینه (۲/۰۵۷) با میزان جذب نانوذرات نقره در طول موج ۴۲۸ نانومتر مشاهده شده در شرایط بهینه (۲/۰۵) در فاصله مطلوب قرار گرفته که حکایت از صحت بهینه سازی فرآیند توسط روش طراحی تاگوچی است.

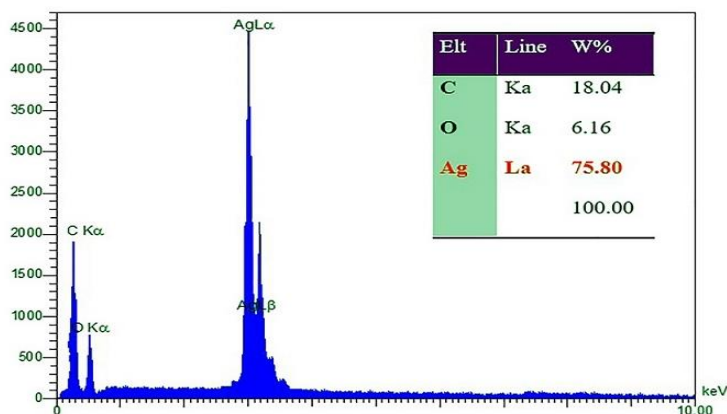
۳-۴- نتایج آنالیزهای میکروسکوپ الکترونی روبشی و طیف سنجی نانوذرات نقره

در ادامه و با هدف بررسی آنالیزهای میکروسکوپی و طیف سنجی نانوذرات نقره سنتزی، تولید نانوذرات نقره توسط سلول در حال استراحت سویه قارچی *A. niger* ZRS14 تحت شرایط بهینه به دست آمده از آزمایشات طراحی تاگوچی مورد بررسی قرار گرفت. میکروگرافهای حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی سنتز نانوذرات نقره کروی شکل با متوسط اندازه ی ۲۴/۸ نانومتر پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری را نشان داد (شکل ۴). با افزایش زمان گرماگذاری به ۷۲ ساعت سایز نانوذرات به ۳۱/۵ نانومتر و پس از ۹۶ ساعت گرماگذاری به ۳۸/۱ نانومتر افزایش یافت.



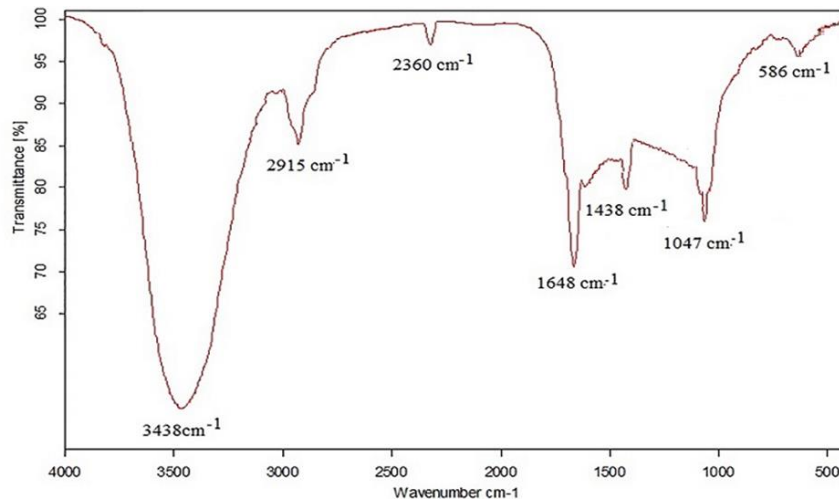
شکل ۴- تصاویر حاصل از FESEM و هیستوگرام توزیع اندازه نانوذرات نقره سنتز شده توسط سلول در حال استراحت سویه فارچی *A. niger* ZRS14 تحت شرایط بهینه به دست آمده از روش طراحی تاگوچی. Figure 4- FESEM images and histogram of particle size distribution of silver nanoparticles synthesized by resting cells of *A. niger* ZRS14 under optimal conditions obtained in Taguchi design.

آنالیز طیف سنجی پراش پرتو اشعه ایکس حضور مقدار قابل توجهی از عنصر نقره را در ترکیب نانوذرات سنتزی نشان داد که حکایت از بیوستنتز نانوذرات نقره عنصری است (شکل ۵).



شکل ۵- طیف EDX نانوذرات نقره سنتز شده توسط سلول در حال استراحت سویه فارچی *A. niger* ZRS14 تحت شرایط بهینه به دست آمده از روش طراحی تاگوچی. Figure 5- Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) of silver nanoparticles synthesized by resting cells of *A. niger* ZRS14 under optimal conditions obtained in Taguchi design.

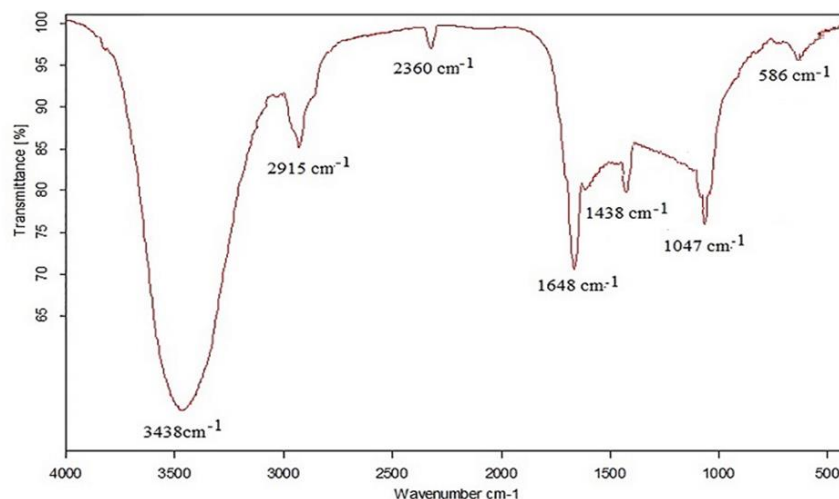
در ادامه و با هدف تایید کریستالی بودن نانوذرات نقره سنتز شده توسط سویه فارچی مذکور، از روش پراش اشعه ایکس (XRD) استفاده شد. با توجه به پیک‌های نشان داده شده حضور کریستال‌های نانوذرات نقره تایید گردید (شکل ۶). نانوذرات نقره در سطوح ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰ و ۳۱۱ به ترتیب پیک‌هایی با مقادیر $3\pi/85$ ، $4\pi/25$ ، $6\pi/98$ و $7\pi/06$ درجه را نشان دادند که با نمونه‌ی استاندارد نانوذرات نقره عنصری کاملاً همخوانی دارد [13]، [25].



شکل ۶- الگوی پراش پرتو X نانوذرات نقره سنتز شده توسط سلول در حال استراحت سویه قارچی *A. niger* ZRS14 تحت شرایط بهینه به‌دست‌آمده از روش طراحی تاگوچی.

Figure 6- X-ray diffraction (XRD) pattern of silver nanoparticles synthesized by resting cells of *A. niger* ZRS14 under optimal conditions obtained in Taguchi design.

در نهایت از آنالیز طیف سنجی تبدیل فوریه مادین قرمز (FTIR) به‌عنوان معیاری برای بررسی حضور ماکرومولکول‌های زیستی به‌عنوان عوامل پوشاننده که سبب افزایش پایداری نانوذرات سنتزی شده، استفاده شد. آنالیز FTIR در محدوده‌ی $4000-500\text{ cm}^{-1}$ وجود شش پیک اصلی به ترتیب در محدوده‌ی 1047 ، 1438 ، 1648 ، 2360 ، 2915 و 3438 cm^{-1} را نشان داد. حداکثر جذب مربوط به پیک ظاهر شده در عدد موجی 3438 cm^{-1} است که به باندهای جذبی وابسته به گروه عاملی O-H کششی حاصل از کربوکسیلیک اسیدها می‌باشد. پیک‌های ظاهر شده در محدوده‌های 1438 cm^{-1} و 2915 cm^{-1} مربوط به گروه‌های C-H کششی موجد در ترکیبات آلی است. پیک ظاهر شده در عدد موجی 2360 cm^{-1} متعلق به گروه کربونیل (C=O) می‌باشد. پیک ظاهر شده در محدوده‌ی 1648 cm^{-1} وجود گروه‌های آمیدی را نشان می‌دهد. پیک ظاهر شده در 1047 cm^{-1} به ارتعاشات منحرافی C-OH ناشی از پروتئین‌ها اشاره دارد (شکل ۷). در مجموع به نظر می‌رسد که گروه‌های عاملی -OH، -C-OH، C-H، C=O و گروه‌های پیوند آمیدی مرتبط با ماکرومولکول‌های زیستی بالاخص پروتئین‌ها به‌عنوان عامل پوشاننده در سنتز زیستی نانوذرات نقره توسط زیست توده‌ی قارچی نقش داشته است [26].



شکل ۷- نتایج FTIR نانوذرات نقره سنتز شده توسط سلول در حال استراحت سویه قارچی *A. niger* ZRS14 تحت شرایط بهینه به‌دست‌آمده از روش طراحی تاگوچی.

Figure 7- Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FTIR) of silver nanoparticles synthesized by resting cells of *A. niger* ZRS14 under optimal conditions obtained in Taguchi design.

۴- نتیجه‌گیری

قارچ رشته‌ای *A. niger* قادر به بیوسنتز انواع مختلف نانوذرات از جمله نانوذرات نقره، طلا و اکسید روی است. مطالعه حاضر، توانایی ذاتی قارچ بومی *A. niger* ZRS14 در راستای سنتز برون سلولی نانوذرات نقره و بهینه‌سازی فاکتورهای موثر بر فرآیند سنتز نانوذرات نقره با ترکیب روش‌های تک عاملی و طراحی آماری تاگوجی با هدف دستیابی به نانوذراتی با توزیع یکنواخت اندازه ذرات و بهینه‌سازی افزایش راندمان تولید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این میکروارگانیسم می‌تواند به‌عنوان کاتالیزور زیستی ارزان و دوستدار محیط زیست، جایگزین مناسبی برای روش‌های فیزیکوشیمیایی، جهت سنتز نانوذرات نقره شود. نتایج حاصل از نرم‌افزار تاگوجی نشان داد که میزان سنتز در شرایط بهینه نسبت به مقدار پیش بینی شده مطابقت داشت. آنالیزهای طیف سنجی نشان داد که نانوذرات نقره‌ی تولید شده به‌صورت کریستال‌های نقره و کروی شکل بوده و در ابعاد کمتر از ۳۸ نانومتر هستند که توسط پروتئین‌های ترشح شده به وسیله‌ی قارچ پایدار شده‌اند. از سویی نانوذرات نقره‌ی تولید شده به صورت خارج سلولی به وسیله‌ی پروتئین‌ها و عوامل ترشح شده توسط قارچ پایدار می‌گردند. از آنجایی که هیچ ماده‌ی شیمیایی پایدار کننده به این واکنش افزوده نشد، نانوذرات تولید شده توسط این قارچ‌ها احتمالاً قابلیت استفاده در زمینه‌های مختلف از جمله پزشکی را دارا می‌باشند.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه کردستان به خاطر حمایت مالی این مطالعه تشکر و قدردانی می‌نمایند. پژوهش حاضر بخشی از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی است.

اعلام تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که در رابطه با انتشار این مقاله به طور کامل از اصول اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده‌اند و منافع تجاری در این راستا وجود ندارد و نویسندگان در قبال ارایه اثر خود وجهی دریافت ننموده‌اند.

منابع

- [1] Yang, L., Wei, J., Ma, Z., Song, P., Ma, J., Zhao, Y., ... & Wang, X. (2019). The fabrication of micro/nano structures by laser machining. *Nanomaterials*, 9(12), 1789. <https://doi.org/10.3390/nano9121789>
- [2] De Almeida, J. M. M. M., Vasconcelos, H., Jorge, P. A. S., & Coelho, L. (2018). Plasmonic optical fiber sensor based on double step growth of gold nano-islands. *Sensors*, 18(4), 1267. <https://doi.org/10.3390/s18041267>
- [3] Bhalla, N., Jain, A., Lee, Y., Shen, A. Q., & Lee, D. (2019). Dewetting metal nanofilms—Effect of substrate on refractive index sensitivity of nanoplasmonic gold. *Nanomaterials*, 9(11), 1530. <https://doi.org/10.3390/nano9111530>
- [4] Tugulea, A. M., Bérubé, D., Giddings, M., Lemieux, F., Hnatiw, J., Priem, J., & Avramescu, M. L. (2014). Nano-silver in drinking water and drinking water sources: stability and influences on disinfection by-product formation. *Environmental science and pollution research*, 21, 11823–11831.
- [5] Dhanjal, D. S., Mehra, P., Bhardwaj, S., Singh, R., Sharma, P., Nepovimova, E., ... & Kuca, K. (2022). Mycology-nanotechnology interface: applications in medicine and cosmetology. *International journal of nanomedicine*, 17, 2505–2533.
- [6] Mohamed, D. S., Abd El-Baky, R. M., Sandle, T., Mandour, S. A., & Ahmed, E. F. (2020). Antimicrobial activity of silver-treated bacteria against other multi-drug resistant pathogens in their environment. *Antibiotics*, 9(4), 181. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040181>
- [7] Chung, I.-M., Park, I., Seung-Hyun, K., Thiruvengadam, M., & Rajakumar, G. (2016). Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles: their characteristic properties and therapeutic applications. *Nanoscale research letters*, 11, 1–14.
- [8] Alves, M. F., Paschoal, A. C. C., Klimeck, T. D. F., Kuligovski, C., Marcon, B. H., de Aguiar, A. M., & Murray, P. G. (2022). Biological synthesis of low cytotoxicity silver nanoparticles (AgNPs) by the fungus chaetomium thermophilum—sustainable nanotechnology. *Journal of fungi*, 8(6), 605. <https://doi.org/10.3390/jof8060605>
- [9] Bharti, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2020). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by Thiosphaera pantotropa and evaluation of their antibacterial and cytotoxic effects. *3 biotech*, 10, 1–12.
- [10] Guilger-Casagrande, M., & Lima, R. de. (2019). Synthesis of silver nanoparticles mediated by fungi: a review. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 287. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00287/full>
- [11] Ashengroph, M. (2013). Isolation and characterization of a native strain of *Aspergillus niger* ZRS14 with capability of high resistance to zinc and its supernatant application towards extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticles. *Journal of microbial biology*, 2(7), 29-44. (In Persian). https://bjm.ui.ac.ir/article_19499.html?lang=en

- [12] Hosseinzadeh, F., Rastegar, S. O., & Ashengroph, M. (2021). Bioleaching of rare earth elements from spent automobile catalyst as pretreatment method to improve Pt and Pd recovery: Process optimization and kinetic study. *Process biochemistry*, 105, 1–7.
- [13] Bolbanabad, E. M., Ashengroph, M., & Darvishi, F. (2020). Development and evaluation of different strategies for the clean synthesis of silver nanoparticles using *Yarrowia lipolytica* and their antibacterial activity. *Process biochemistry*, 94, 319–328.
- [14] Raudabaugh, D. B., Tzolov, M. B., Calabrese, J. P., & Overton, B. E. (2013). Synthesis of silver nanoparticles by a Bryophilous rhizoctonia species. *Nanomaterials and nanotechnology*, 3. <https://doi.org/10.5772/56207%0A>
- [15] Patil, M. P., & Kim, G. D. (2018). Marine microorganisms for synthesis of metallic nanoparticles and their biomedical applications. *Colloids and surfaces b: biointerfaces*, 172, 487–495.
- [16] Vigneshwaran, N., Ashtaputre, N. M., Varadarajan, P. V., Nachane, R. P., Paralikar, K. M., & Balasubramanya, R. H. (2007). Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Materials letters*, 61(6), 1413–1418.
- [17] Gade, A., Ingle, A., Whiteley, C., & Rai, M. (2010). Mycogenic metal nanoparticles: progress and applications. *Biotechnology letters*, 32, 593–600.
- [18] Sagar, G., & Ashok, B. (2012). Green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus niger* and its efficacy against human pathogens. *European journal of experimental biology*, 2(5), 1654–1658.
- [19] Gaikwad, S. C., Birla, S. S., Ingle, A. P., Gade, A. K., Marcato, P. D., Rai, M., & Duran, N. (2013). Screening of different *Fusarium* species to select potential species for the synthesis of silver nanoparticles. *Journal of the Brazilian chemical society*, 24, 1974–1982.
- [20] Farrag, H. M. M., Mostafa, F. A. A. M., Mohamed, M. E., & Husein, E. A. M. (2020). Green biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus niger* and its antiamebic effect against *Allovalhampfia sp.* trophozoite and cyst. *Experimental parasitology*, 219, 108031. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.108031>
- [21] Shahzad, A., Saeed, H., Iqtedar, M., Hussain, S. Z., Kaleem, A., & Abdullah, R. (2019). Size-controlled production of silver nanoparticles by *Aspergillus fumigatus* BTCB10: likely antibacterial and cytotoxic effects. *Journal of nanomaterials*, 2019, 5168698. <https://doi.org/10.1155/2019/5168698>
- [22] Balakumaran, M. D., Ramachandran, R., & Kalaichelvan, P. T. (2015). Exploitation of endophytic fungus, *Guignardia mangiferae* for extracellular synthesis of silver nanoparticles and their in vitro biological activities. *Microbiological research*, 178, 9–17.
- [23] Ashengroph, M., & Arjmand, R. (2020). Designing matrix 118 trials via taguchi model to improve performance of *trichosporon sp. Cas se5* in the selenite removal. *Journal of advanced biomedical sciences*, 10(1), 2020-2028. (In Persian). <https://jabs.fums.ac.ir/article-1-1823-en.html>
- [24] Dasu, V. V., Panda, T., & Chidambaram, M. (2003). Determination of significant parameters for improved griseofulvin production in a batch bioreactor by Taguchi's method. *Process biochemistry*, 38(6), 877–880.
- [25] Magudapathy, P., Gangopadhyay, P., Panigrahi, B. K., Nair, K. G. M., & Dhara, S. (2001). Electrical transport studies of Ag nanoclusters embedded in glass matrix. *Physica B: condensed matter*, 299(1–2), 142–146.
- [26] Awwad, A. M., Salem, N. M., Aqarbeh, M. M., & Abdulaziz, F. M. (2020). Green synthesis, characterization of silver sulfide nanoparticles and antibacterial activity evaluation. *Chemistry International*, 6(1), 42–48.