Research Article

Nova Biologica Reperta 8(3): 195-205 (2021)

Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115

https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.8.3.195

مقاله پژوهشی

یافته‌های نوین در علوم زیستی

جلد ۸، شماره ۳، صفحات ۱۹۵ الی ۲۰۵ (۱۴۰۰)

انتشارات دانشگاه خوارزمی

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.6.9]

[DOI: 10.52547/nbr.8.3.195]

سنتز سبز و برون سلولی نانوذرات اکسیدروی توسط عصاره عاری از سلول *Rdodotroula pacifica* NS02 و بررسی خواص ضدمیکروبی آن

نشاط سوسنی[۱]، مراحم آشنگرف[۲] و خسرو چهری[۱]

[۱]دانشگاه رازی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، کرمانشاه، ایران؛ [۲]دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی، سنندج، ایران

مسئول مکاتبات: مراحم آشنگرف و خسرو چهری، m.ashengroph@uok.ac.ir، kh.chehri@razi.ac.ir

چکیده. سنتز زیستی نانوذرات به‌عنوان روشی جایگزین، پاک، سریع، مطمئن و به‌صرفه به جای روش‌های فیزیکی و شیمیایی رایج پیشنهاد شده است. در این پژوهش، جداسازی و شناسایی سویه‌های مخمری آب‌زی با قابلیت سنتز نانوذرات اکسیدروی مورد مطالعه قرار گرفت. براساس روش کشت غنی سازی سویه مخمر NS02 که بالاترین مقاومت نسبت به یون روی را دارا بود (۵/۲۵ میلی مولار) به‌عنوان سویه برتر جهت آزمایشات سنتز زیستی نانواکسیدروی با راهکار عصاره عاری از سلول برگزیده شد. ارزیابی اولیه سنتز نانوذرات اکسیدروی با مشاهدات چشمی و مطالعه طیف جذبی مرئی-فرابنفش انجام شد. شکل، اندازه و ترکیب عنصری نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی مجهز به پرتوایکس پاشندهٔ انرژی تعیینگردید. آنالیز پراش اشعه ایکس با هدف مطالعه ساختار بلوری نانوذرات اکسید روی استفاده شد. فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی در برابر باکتری‌های بیماری زای جدا شده از نمونه‌های بالینی به روش انتشار از چاهک بر سطح آگار انجامگرفت . شناسایی سویه مخمر براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و تعیین توالی نوکلئوتیدی ITS1-5.8S-ITS2 انجام شد. در این پژوهش برای نخستین بار قابلیت مخمر بومی آب‌زی *Rhodotorula pacifica* NS02 در سنتز برون سلولی نانوذرات اکسیدروی با میانگین اندازه ۴۲/۶ نانومتر با راهکار عصاره عاری از سلول گزارش گردید. با توجه به کوچک بودن اندازه نانوذرات و توزیع مناسب تاثیر مهاری مطلوب علیه جدایه‌های باکتریایی بالینی تست شده مشاهده شد این مطالعه، سعی در ارائه ذخایر ژنتیکی جدید از منابع عظیم میکروبی مخمر های آب‌زی، به‌عنوان کارخانه زیستی در سنتز نانوذرات اکسیدروی با خواص ضدمیکروبی با راهکار عصاره عاری از سلول دارد.

واژه‌های کلیدی. اثر ضدباکتری، تولید زیستی، طیف‌سنجی، مخمر آب‌زی، نانواکسیدروی

Extracellular green synthesis of zinc oxide nanoparticle by using the cell-free extract *Rhodotorula pacifica* NS02 and investigation of their antimicrobial activities

Neshat Soosani[1], Morahem Ashengroph[2] & Khosrow Chehri[1]

[1]Razi University, Faculty of Science, Department of Biology, Kermanshah, Iran; [2]University of Kurdistan, Faculty of Science, Department of Biological Science, Sanandaj, Iran

Correspondent author: Morahem Ashengroph & Khosrow Chehri, m.ashengroph@uok.ac.ir, kh.chehri@razi.ac.ir

Abstract. The biosynthesis of nanoparticles (NPs) has been proposed due to its fast, clean, safe, and cost-effective production and being efficient alternative to conventional physicochemical methods. This study aimed to isolate and identify aquatic yeast strains for their potential to form Zinc oxide nanoparticles (ZnONPs). A yeast strain, NS02, with high tolerance against zinc ion (5.25 mM) was isolated using the enrichment technique and was selected as efficient candidate for the biosynthesis of ZnONPs under cell-free extract (CFE) strategy. The preliminary evaluation on the formation of ZnONPs was performed by visual observation and UV-visible absorption spectra of the biosynthesized ZnONPs. The morphology, size and elemental distribution of the nanoparticles were determined by Field emission scanning electron microscopy (FESEM) equipped with energy-dispersive X-ray (EDX). X-ray diffractometer (XRD) was used to identify the crystalline phase of the ZnONPs. Antibacterial activity of ZnONPs against pathogenic bacteria isolated from the clinical specimens was investigated using agar well diffusion method. The isolate NS02 was characterized based on their morphological properties and amplification the ITS-5.8S-ITS2 rDNA regions. The present

Received 29.03.2021/ Revised 14.06.2021/ Accepted 05.07.2021/ Published 22.10.2021

دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۹/ اصلاح: ۱۴۰۰/۰۳/۲۴/ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۱۴/ انتشار: ۱۴۰۰/۰۷/۳۰

study pioneered the capabilities of the native aquatic strain *Rhodotorula pacifica* for the extracellular synthesis of ZnONPs with CFE strategy. The biosynthesized ZnONPs had a growth inhibitory effect all tested clinical isolates due to their nanometric size and well-defined dispersity. This investigation is attempted to indicate the novel microbial sources of aquatic yeasts as biological plant in the synthesis of ZnONPs with antimicrobial activity under cell-free extract strategy.

Key words. antibacterial effect, aquatic yeast, biosynthesis, nano-zinc oxide, spectroscopy

مقدمه

فناوری نانو از علوم نوظهور و مهم در قرن ۲۱ است؛ تحقیق و توسعه در این حوزه منجر به ادغام علوم فیزیک، شیمی، زیست شناسی، پزشکی و مهندسی شده تا تکنیک‌های ابتکاری در دستکاری ماده در سطح اتمی ایجاد شود (Bayda et al., 2019). فناوری نانو برای دستکاری، مشاهده، اندازه‌گیری و سنتز مقیاس ۱ تا ۱۰۰ نانومتری است که در سال‌های اخیر به دلیل نسبت سطح به حجم زیاد مورد توجه قرار گرفته‌اند و منجر به واکنش بیشتر آنها نسبت به برخی دیگر از مولکول‌ها می‌شوند (DurÁn et al., 2010). خصوصیات مواد وقتی که به صورت نانوذرات تولید شوند تغییر می‌کنند و نانوذرات خواص جدید فیزیکی، شیمیایی، مغناطیسی و نوری از خود نشان می‌دهند که به اندازه، شکل و مورفولوژی آنها بستگی دارد و آنها را قادر به تعامل با گیاهان، جانوران و میکروب‌ها می‌کند (Rajeshkumar & Sivapriya, 2020). نانوذرات اکسیدروی توجه عمیقی را به دلیل ویژگی‌های منحصر به فردی مثل نسبت سطح به حجم بالا، واکنش‌پذیری زیاد، انرژی پیوند اکسایتونی بالا، توانایی جذب نوری بالا و فیلترینگ نوری به خود جلب نموده است (Lim et al., 2010). این نانوذرات دارای کاربردهای زیست پزشکی و دارویی مختلفی مانند انتقال دارو، استفاده در حسگرهای زیستی، خواص ضد سرطان، تعدیل واکنش‌های آلرژیک از طریق مهار دگرانولاسیون ماستوسیت‌ها، خواص ضد دیابت، خواص ضد باکتریایی و ضد ویروسی، تصویربرداری از سلول‌ها و استفاده در مواد آرایشی و بهداشتی بویژه درکرم‌های سوختگی و ضد آفتاب به دلیل جذب امواج نوری را دارند (Jiang et al., 2018; Jangi et al., 2020). تکنیک‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی شامل خلا بالا، تبخیر حرارتی، هیدروترمال، رسوب شیمیایی پالسی، احیای شیمیایی، میکروامولیسیون و رسوب گذاری پالس هیدرولیزری برای سنتز نانوذرات اکسید روی استفاده شده است (Kołodziejczak-Radzimska & Jesionowski, 2014). تکنیک‌های ذکر شده با وجود سرعت بالا دارای معایبی از جمله گران بودن، مصرف انرژی زیاد، عدم توجه به مسائل بهداشت و محیط زیست، ایجاد نقایص در سطح و تجمّع نانوذرات، تعداد کم نانوذرات سنتز شده، استفاده از حلال‌ها و گونه‌های سمی، تولید فراورده‌های جانبی خطرناک و تولید ذرات با توزیع نامناسب و پایداری پایین هستند که این امر کاربرد آنها را در حوزه علوم زیست پزشکی و دارویی با خطرات جدی روبرو می‌کند (Lim et al., 2010; Mohd Yusof, 2019). استفاده از روش‌های زیستی در ساخت نانوذرات اکسید روی به عنوان یک فنّاوری سبز برای ساخت نانوذرات با عملکرد متنوع که دارای پیامدهای درمانی فوق العاده‌ای است، ظهور کرده است. رویکرد سنتز سبز یک رویکرد دوستدار محیط زیست، مقرون به صرفه، زیست سازگار، ایمن و سبز است و امکان تولید مقادیر گسترده نانوذرات اکسید روی خالص و بدون هیچ گونه ناخالصی را فراهم می نماید (Bolbanabad et al., 2020). در بین روش‌های زیستی، استفاده از سویه‌های مخمری به‌عنوان نانوکارخانه‌های سبز جایگزین مناسبی برای ساخت نانوذرات هستند که مقرون به صرفه و دوستدار محیط زیست هستند. مخمرها به دلیل ترشحات آنزیمی فراوان، تنوع متابولیکی، قدرت سازگاری بالا، رشد سریع با استفاده از مواد مغذی ساده و سادگی پردازش پایین دستی می توانند گزینه مناسبی برای سنتز نانوذرات اکسید روی باشند (Ashengroph, 2014). تا به امروز مطالعات وسیعی در زمینه سنتز زیستی نانوذرات فلزی از جمله نقره، طلا، پالادیوم و سولفید روی توسط سویه‌های مختلف میکروبی صورت گرفته است که می‌توان به سنتز نانوذرات نقره توسط گونه‌های مخمری مختلف شامل *Yarrowia lipolytica*، *Candida utilis*، *Cryptococcus laurentii*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Pichia pastoris*، *Candida albicans*، *Rhodotorula glutinis* و *Candida glabrata*، سنتز نانوذرات طلا توسط مخمر *Magnusiomyces ingens*، سنتز نانوذرات پالادیوم توسط مخمر *Saccharomyces cerevisiae* و همچنین سنتز نانوسولفید سرب توسط مخمر *Rhodospridium diobovatum* اشاره نمود (Gahlawat & Choudhury, 2019). با این حال سنتز نانوذرات اکسید روی تنها در سویه‌های مخمری *Candida* sp. MY2 (Ashengroph, 2014)، *Pichia kudriavazevii* (Moghaddam et al., 2017)، *Candida albicans* (Shamsuzzaman et al., 2017) گزارش شده است. در این

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.6.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.3.195]

پژوهش، جداسازی و شناسایی سویه‌های مخمری آب‌زی با قابلیت سنتز نانوذرات اکسید روی با خواص ضد میکروبی مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

غنی‌سازی مخمرهای آب‌زی و بررسی الگوی مقاومت نسبت به یون روی

تعداد ۱۰ نمونه آب سطحی از سواحل غربی دریای خزر شامل رامسر (36° 54′ N 50° 40′ E) و نوشهر (36° 39′ N 51° 30′ E) در فصل بهار سال ۱۳۹۹ جمع آوری شد. با هدف غنی سازی سویه‌های مخمری آب‌زی مقاوم به یون روی، یک میلی لیتر از نمونه‌های آب جمع آوری شده به محیط‌های کشت کمپلکس اختصاصی جداسازی مخمرها تحت نام دی کلران رزبنگال کلرامفنیکل آگار (خریداری شده از شرکت Quelab انگلستان) تلقیح شد. کلرامفنیکل (غلظت ۰/۱ گرم در لیتر) و رزبنگال (غلظت ۰/۰۲۵ گرم در لیتر) موجود در محیط کشت مذکور به ترتیب باعث توقف رشد باکتری‌ها و کپک های سریع الرشد می شود. به محیط مذکور استات روی (خلوص بالای ۹۸ درصد و خریداری شده از شرکت سیگما-آلدریچ) در غلظت نهایی ۰/۵ میلی مولار یون روی پس از استریل نمودن از طریق فیلترهای سرسرنگی ۰/۴۵ میکرونی افزوده شد. محیط‌های کشت مذکور در انکوباتور ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد. پس از حصول اطمینان از رشد کلنی های مخمری از طریق بررسی‌های ریخت شناسی و مشاهدات میکروسکوپ نوری، کلنی‌های جداسازی شده بر روی محیط‌های کشت سنتتیک YPD (گلوکز ۲۰ گرم در لیتر، پپتون ۲۰ گرم در لیتر، عصاره مخمر ۱۰ گرم در لیتر و آگار ۲۰ گرم در لیتر) خالص سازی گردید (Ashengroph, 2014). الگوی مقاومت سویه‌های مخمری غربال‌گری شده نسبت به یون روی از طریق روش رقت در آگار تعیین شد. برای این منظور به ارلن‌های ۱۲۵ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از YPD آگار ذوب شده، غلظت‌های خاصی از یون استات روی (۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵، ۱/۷۵، ۲، ۲/۲۵، ۲/۵، ۲/۷۵، ۳، ۳/۲۵، ۳/۵، ۳/۷۵، ۴، ۴/۲۵، ۴/۵، ۴/۷۵، ۵، ۵/۲۵ و ۵/۵ میلی مولار) اضافه و سپس داخل پلیت‌های شیشه‌ای به قطر ۸ سانتی‌متر ریخته شد. پلیت‌های آگاردار در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند تا سطح مرطوب آن‌ها خشک شود و سپس به‌وسیله سمپلر، ۱۰ میکرو لیتر از محیط مایع که میکروب مورد نظر در آن رشد کرده (رشد لگاریتمی) بود و تراکم آن ۵/. مک فارلند بود (میکروب تلقیح شده ۱/۵ ×۱۰^۸cfu/ml) بر روی محیط آگار دار قرار گرفت. پلیت‌ها پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس مورد مطالعه قرار گرفتند (Washington et al., 1980).

بررسی سنتز برون سلولی نانوذرات اکسید روی تحت عصاره عاری از سلول

برای تهیه عصاره عاری از سلول سویه مخمر NS02، دارای بالاترین مقاومت نسبت به یون روی، جهت انجام آزمایشات بیوسنتز نانوذرات اکسید روی، یک لوپ کامل از کلنی تازه مخمری به محیط کشت مایع YPD تلقیح و به مدت ۲۴ساعت در انکوباتور شیکر دار با دور ۲۰۰ rpm و دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرماگذاری گردید. یک درصد از سوسپانسیون مخمری تهیه شده، در ارلن های ۲۵۰میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع تحت شرایط مشابه انکوبه‌گذاری شد. سپس با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار (مدل Labofuge-400 ساخت کشور آلمان) توده زیستی مخمری از سوپرناتانت کشت جداسازی شد (۵۰۰۰ دور در دقیقه، دمای ۴ درجه سلسیوس). پس از سه بار شستشو با آب دیونیزه استریل، میزان ۵ گرم از توده زیستی مذکور در ارلن‌های ۲۵۰میلی لیتری که حاوی ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه استریل بود، ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتوردار (مدل KM-65 ساخت شرکت فن آزما گستر، ایران) انکوبه شد (۲۰۰ rpm و دمای ۲۵ درجه سلسیوس). پس از طی دوره گرما گذاری، توده مخمری با استفاده از سانتریفیوژ جدا و از عصاره عاری از توده زیستی مخمری جمع آوری شده به‌عنوان کاتالیست برای تبدیل زیستی نمک پیش ساز استات روی به نانوذرات اکسید روی استفاده شد. برای این منظور، به ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر از عصاره عاری از سلول مخمری برداشت شده، محلول استات روی (با غلظت نهایی ۵ میلی مولار یون روی) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس و دور شیکر ۲۰۰ rpm انکوبه‌گذاری شد. بطور همزمان از محلول استات روی (بدون تلقیح عصاره عاری از سلول) به‌عنوان محیط کنترل استفاده شد (Bolbanabad et al., 2020). بررسی اولیه سنتز نانوذرات اکسید روی از طریق مشاهده تغییر رنگ و روش طیف سنجی UV-visible انجام شد.

شناسایی فنوتیپی و ملکولی سویه مخمری کارآمد

شناسایی سویه مخمر براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی براساس کتاب طبقه بندی مخمرها انجام شد (Kurtzman & Fell, 2000). به منظور شناسائی مولکولی سویه منتخب استخراج DNA ژنومی با استفاده از تخریب با کمک دانه‌های شیشه‌ای(glass bead disruption) روی سوسپانسیون حاصل از کشت ۲۴ ساعته مخمر در محیط کشت YPD مایع انجام شد

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.6.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.3.195]

(Yamada et al., 2002). برای انجام واکنش PCR از دو آغازگر عمومی ITS1 (5´ -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) و ITS4 (5´ -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´) استفاده شد (White et al., 1990). مواد و مقادیر مورد نیاز برای انجام واکنش PCR و همچنین شرایط دمایی انجام واکنش طبق روش Ashengroph و همکاران انجام شد (Ashengroph et al., 2011). توالی حاصل بلاست و با توالی‌های دیگر گونه‌های مرتبط نزدیک در بانک ژنی NCBI مقایسه شد. درخت فیلوژنیک با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 و بر اساس روش neighbor-joining و با بوت استرپ ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد (Kumar et al., 2016).

مشاهدات ظاهری و دستگاهی جهت تأیید سنتز سبز و برون نانوذرات اکسید روی

نانوذرات اکسید روی سنتز شده در مخلوط واکنش با راهکار عصاره عاری از سلول سویه مخمری کارآمد با استفاده از مشاهدات ظاهری (تغییر رنگ محلول واکنش)، UV-visible اسپکتروفتومتری (Specord 210)، تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی مجهز به به پرتوایکس پاشندهٔ انرژی (FESEM-EDX) و پراش پرتو ایکس (XRD) مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله اول، تشکیل نانوذرات با مشاهده تغییر رنگ محلول واکنش مشخص شد. به منظور تعیین طیف جذبی اسپکتروفتومتری، نمونه‌ها با دور ۵۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شده و از محلول رویی در محدوده ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر طیف جذبی گرفته شد. با هدف بررسی شکل، میانگین اندازه نانوذرات تشکیل شده و ترکیب عنصری آن از آنالیز FESEM-EDX (Mira 3-LMu, TESCAN) استفاده شد. آنالیز XRD (X'Pert-MPD, philips) با هدف مطالعه ساختار بلوری نانوذرات اکسید روی استفاده شد. با هدف جداسازی و تخلیص نانوذرات اکسید روی، ابتدا عصاره عاری از سلول حاوی نانوذرات اکسید روی تشکیل شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی از فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد. سپس از سانتریفیوژ با دور بالا (۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۵ دقیقه) استفاده گردید. در ادامه و با هدف خالص سازی نانوذرات جمع آوری شده شستشو رسوب حاصل با آب دیونیزه استریل و سانتریفیوژ آن سه بار انجام پذیرفت. در نهایت نمونه‌ها در دستگاه فریزدرایر (Alpha 1-2Dplus, Christ, Germany) به مدت ۲۴ساعت خشک شد (Ashengroph & Khaledi, 2020; Bolbanabad et al., 2020).

بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش سبز

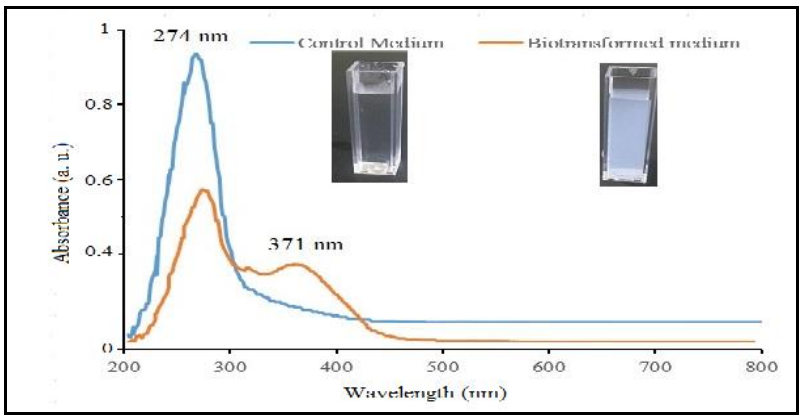
فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی در برابر بیماریزاهای باکتریایی *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Streptococcus pyogenes* جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های استان کردستان که از دانشگاه علوم پزشکی کردستان تهیه شده بودند، از طریق اندازه گیری هاله عدم رشد و به روش انتشار از چاهک بر سطح آگار بررسی شد (Abdolmaleki et al., 2018). در این روش، پس از آماده سازی سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل نیم مک فارلند، کشت چمنی با استفاده از میله شیشه ای سرکج استریل بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار انجام گرفت. پس از خشک شدن سطح پلیت‌های محیط کشت، چاهک‌هایی به قطر تقریبی ۵ میلی‌متر به کمک پی‌پت پاستور استریل ایجاد شد. سپس به میزان ۵۰ میکرولیتر از نانوذرات اکسید روی سنتز شده در عصاره عاری از سلول، پس از خشک نمودن از طریق دستگاه فریزدرایر و تهیه غلظت (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) و دیسپرس نمودن در آب دمین استریل از طریق حمام اولتراسونیک (Vtsonic, China)، ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. از آب دمین استریل به‌عنوان کنترل منفی و از آنتی بیوتیک وسیع الطیف کلرامفنیکل به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در نهایت میزان حساسیت باکتری‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج

جداسازی سویه های مخمری مقاوم به روی و بررسی سنتز برون سلولی نانوذرات اکسید روی در سویه مخمری برتر

براساس تکنیک کشت غنی سازی، ۱۶ سویه ی مخمری آب‌زی مقاوم به یون روی جداسازی شد. الگوی مقاومت سویه‌های جدا شده نسبت به یون روی در محیط کشت مایع YPD غنی شده با غلظت-های مختلف استات روی از طریق روش رقت در آگار تعیین شد. براساس نتایج بدست آمده میزان مقاومت سویه‌های مخمری غربال-گری شده بین ۰/۷۵ تا ۵/۲۵ میلی مولار تعیینگردید. در این بین، سویه مخمری NS02 که بالاترین مقاومت نسبت به یون روی را دارا بود (۵/۲۵ میلی مولار) به‌عنوان سویه برتر جهت آزمایشات تبدیل زیستی استات روی به نانواکسید روی با راهکار عصاره عاری از سلول برگزیده شد. سنتز نانوذرات اکسید روی با تبدیل زیستی نمک استات روی (غلظت ۵ میلی مولار) به نانواکسید روی با مشاهدات چشمی و مطالعه طیف جذبی مرئی-فرابنفش (UV-visible) قابل تشخیص است. در اثر تبدیلات زیستی توسط عصاره عاری از سلول رنگ محلول واکنش از شفاف بی رنگ به سفید متمایل به شیری رنگ تبدیل شده که براساس منابع موجود نمایانگر تشکیل سوسپانسیون کلوئیدی نانوذرات اکسید روی است (Ashengroph, 2013). جهت اثبات وجود نانوذرات اکسید روی

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.6.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.3.195]



شکل ۱- مشاهدات چشمی و طیف های جذبی اسپکتروفتومتری محلول استات روی در غلظت ۵ میلی مولار و پس از ۲۴ ساعت واکنش زیست تبدیلی در ۲۵ درجه سلسیوس روی شیکر مدور (۲۰۰ دور در دقیقه) در محیط کنترل (عصاره عاری از سلول فاقد استات روی) و محیط زیست تبدیلی (عصاره عاری از سلول تیمار شده با نمک استات روی).

Figure 1. Visual observation and UV-vis spectra of the reaction mixtures in the control sample *of* cell-free extract **(**without Zinc acetate*)* and cell-free extract treated with Zinc acetate after 24 h incubation at 25 ℃ on a shaker at 200 rpm.

طیف جذبی نمونه‌های کنترل و تیمار شده در محدوده ی ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. ماکزیمم جذب پیک حاصل در طول موج ۳۷۱ نانومتر نشان دهنده باند جذب تشدید پلاسمون سطحی برای نانوذرات اکسید روی است که براساس منابع معتبر ماکزیمم پیک جذبی نانوذرات اکسید روی در طول موج های ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر است (Mahamuni et al., 2019; Ding et al., 2020). در محلول کنترل (عصاره عاری از سلول بدون افزودن نمک استات روی)، در طول موج های بین ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر هیچ پیک جذبی مشاهده نشد (شکل ۱).

در ادامه و با هدف بهبود راندمان تبدیل زیستی نمک استات روی به نانوذرات اکسید روی، اثرات دوره ی انکوباسیون (۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲ و ۸۴ ساعت) با راهکار عصاره ی عاری از سلول بررسی شد (شکل ۲). همانگونه که در شکل مشاهده می شود سنتز نانوذرات اکسید روی پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون شروع شد. یک افزایش منظم در پیک جذبی مرتبط به نانوذرات اکسید روی از ساعت ۱۲ ام تا ۶۰ ام مشاهده شده است. بین ساعات بین ۷۲ تا ۸۴ ساعت یک کاهش نسبی در جذب مشاهدهگردید. با این حال در مقایسه با ساعات ابتدایی ماکزیمم پیک جذبی نانوذرات اکسید روی بالاتر است که حکایت از پایداری نسبی نانوذرات تشکیل شده است.

تعیین ویژگی نانوذرات اکسید روی از طریق مطالعات میکروسکوپ الکترونی روبشی و طیف سنجی

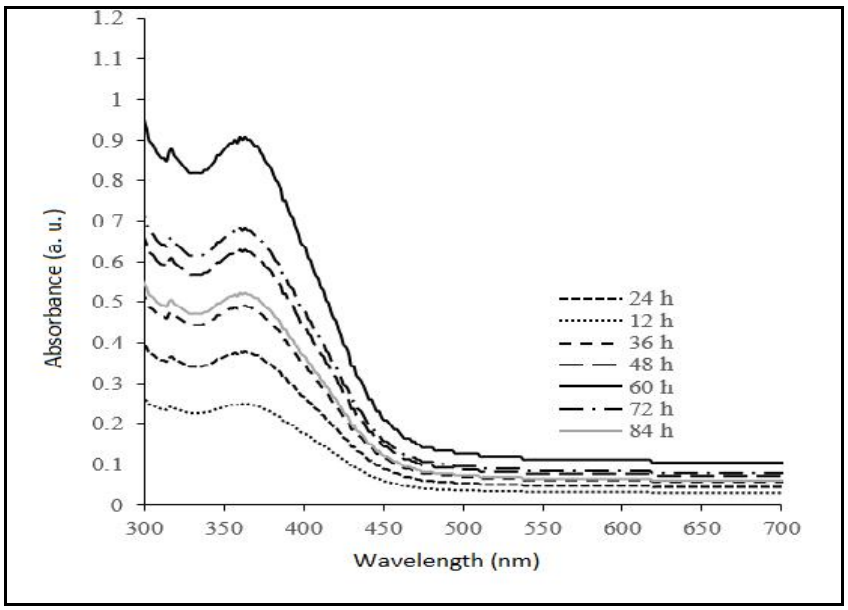
اندازه و شکل نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط عصاره ی عاری از سلول سویه مخمری NS02 توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی تعیین شد (شکل ۳) .شکل۳ Aتصاویر SEM و شکل ۳ B هیستوگرام توزیع اندازه ذرات را نشان می‌دهد. با توجه به شکل، نانوذرات اکسید روی کروی با میانگین اندازه ی ۴۲/۶۹ نانومتر سنتز شد. شکل ۳ Cپیک‌های مربوط به روی و اکسیژن را در نانوذرات سنتزی از طریق آنالیز EDX را نشان داد.

نتایج آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD) نانوذرات اکسید روی سنتز شده در شکل ۴ آورده شده است. نتایج آزمون XRD نشان دهنده پیک‌های قابل رویت در صفحات بلوری (۱۰۰)، (۰۰۲)، (۱۰۱)، (۱۰۲)، (۱۱۰)، (۱۰۳)، (۱۱۲) و (۲۰۱) است که منبطق بر صفحات و زوایای پرش آنها با نمونه استاندارد نانوذرات اکسید روی است (Mahamuni et al., 2019; Ding et al., 2020) که همین موضوع کریستالی بودن نانوذرات اکسید روی را تایید کرد.

نتایج تعیین هویت سویه مخمر NS02

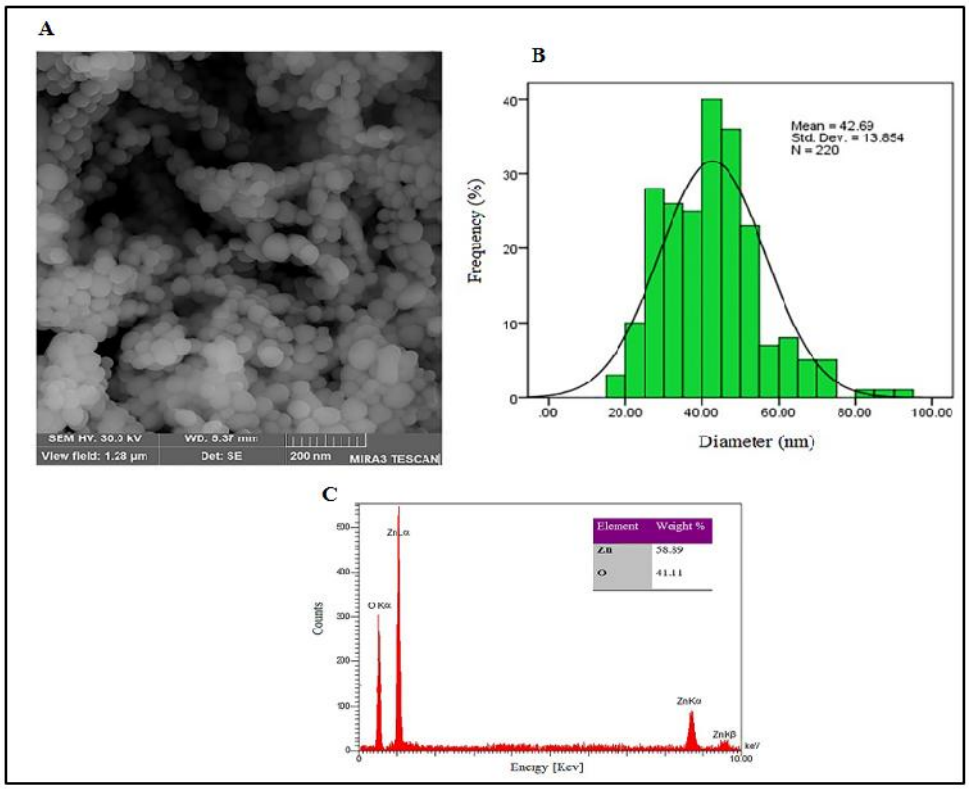
سویه مخمر NS02 که براساس آنالیزهای طیف سنجی و میکروسکوپی به‌عنوان سویه منتخب برگزیده شد، جهت تعیین دقیق هویت مورد آزمایشات ریخت‌شناسی، آزمون‌های بیوشیمیایی و تست‌های فیلوژنتیک قرار گرفت. سویه مخمری مذکور از نظر مورفولوژیک به شکل بیضی همراه با جوانه‌های قطبی همراه با هیف کاذب مشاهده شد (شکل A۵). کلنی مخمر بر روی محیط کشت YPD آگار به‌صورت صاف، موکوئیدی و به رنگ قرمز-نارنجی مشاهده شد (شکل B۵). براساس نتایج تست‌های بیوشیمیایی مخمر مذکور از نظر تست مصرف برخی منابع کربوهیدراتی شامل گلوکز، گالاکتوز و فرکتوز مثبت و از نظر مصرف لاکتوز و رامنوز منفی بود. تست هیدرولیز اوره بر روی محیط کشت اوره آگار مثبت و هیدرولیز نشاسته در محیط کشت نشاسته آگار منفی بود.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.6.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.3.195]



شکل ۲- اثر دوره ی انکوباسیون بر روی سنتز نانوذرات اکسید روی در محلول واکنش حاوی ۵ میلی مولار استات روی و عصاره ی عاری از سلول در ۲۵ درجه سلسیوس روی شیکر مدور (۲۰۰ دور در دقیقه).

Figure 2. Effect of incubation periods on zinc oxide nanoparticles production in the reaction mixture containing cell-free extract mixed with 5 mM zinc acetate at 25 °C with shaking at 200 rpm.



شکل ۳- (A) تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی SEM و (B) هیستوگرام توزیع اندازه ذرات و (C) طیف EDX نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط عصاره عاری از سلول سویه مخمر آب زی NS02.

Figure 3. (A) Scanning electron microscopy (SEM) images, (B) Histogram of particle size distribution and (C) Energy-dispersive X-ray spectroscopy *(*EDX*)* of zinc oxide nanoparticles synthesized by cell-free extract of the aquatic yeast strain NS02.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.6.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.3.195]

در ادامه و با هدف تعیین هویت دقیق سویه NS02، ابتدا DNA ژنومی استخراج و سپس ژن کد کننده نواحی ITS1-5.8S-ITS2 از طریق پرایمرهای یونیورسال ITS1 و ITS4 مورد واکنش PCR قرار گرفت (شکل ۶).

پس از مشخص شدن نتایج تعیین توالی، آنرا در برنامه کامپیوتری BLAST قرار داده شد. براساس نتایج حاصل از بلاست این سویه دارای شباهت ۹۸/۷ درصدی با سویه‌های مخمری متعلق به *Rhodotorula pacifica* بود. در ادامه با ترسیم درختچه فیلوژنی مشخص شد که این سویه در میان گونه‌های ثبت شده نزدیکترین قرابت ژنتیکی را با *Rhodotorula pacifica* دارد (شکل ۷).

نتایج اثرات ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط عصاره عاری از سلول Rhodotorula pacifica NS02

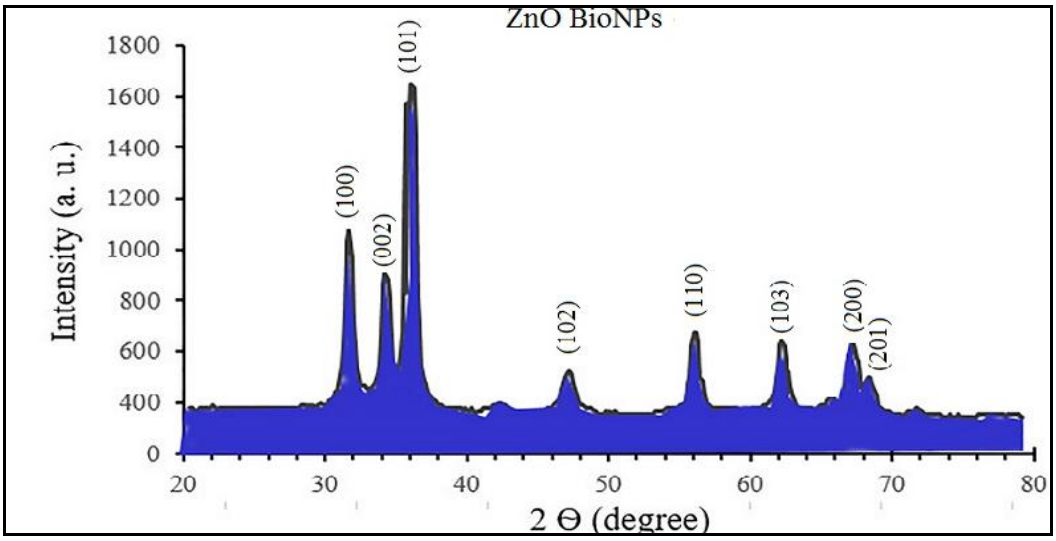
نتایج به‌دست آمده از بررسی فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش سنتز زیستی با استفاده از عصاره عاری از سلول مخمر تست شده حکایت از اثر مهاری بر روی تمامی جدایه-های بالینی دارد. براساس نتایج به‌دست آمده، بیشترین اثر بازدارندگی نانوذرات مذکور بر علیه *K. pneumoniae* با میانگین مهارکنندگی ۶/۲ میلی متر و کمترین میزان مهارکنندگی مربوط به *S. pyogenes* با میانگین مهارکنندگی ۴/۸ میلی متر است. در مجموع براساس نتایج به‌دست آمده، اثرات مهارکنندگی نانوذرات اکسید روی سنتز شده در این مطالعه بالاتر از آنتی بیوتیک وسیع الطیف کلرامفنیکل بود (شکل ۸).

بحث

نانوذرات اکسید روی با توجه به کاربردهای متعدد زیست پزشکی و صنعتی دارای اهمیت فراوانی هستند و همین امر یافتن تکنیک های جدید و کارآمد را برای سنتز نانوذرات اکسید روی را توجیه می‌کند. از آنجا که تکنیک‌های رایج فیریکوشیمیایی دارای اثرات زیست محیطی بسیار مخربی هستند به همین خاطر شیوه‌های زیستی سنتز نانوذرات فلزی دارای اهمیت فراوانی هستند. در سال-های اخیر سنتز زیستی نانوذرات اکسید روی بصورت داخل و خارج سلولی توسط سویه‌های مختلف باکتری، سویه‌های مختلف قارچی و تعداد محدودی از سویه‌های مخمری مورد توجه قرار گرفته است. در ارتباط با سنتز زیستی نانوذرات اکسید روی توسط سویه های باکتری می‌توان سنتز نانوذرات اکسید روی میله ای و مکعبی شکل با میانگین اندازه ۴۵ تا ۹۵ نانومتر در باکتری *Bacillus megaterium* (Saravanan et al., 2018)، سنتز نانوذرات اکسید روی کروی شکل با پراکنش اندازه ذرات ۷ تا ۱۹ نانومتر ی در *L. plantarum* (Selvarajan & Mohanasrinivasan, 2013)، سنتز نانوذرات اکسید روی کروی شکل با پراکنش ذرات ۳۵ تا ۸۰ نانومتری در *Pseudomonas aeruginosa* (Singh et al., 2014)، سنتز نانوذرات اکسید روی زاویه‌ای شکل و با ابعاد حدود ۴۰ نانومتری در *Sphingobacterium thalpophilum* (Rajabairavi et al., 2017) و همچنین سنتز نانوذرات اکسید روی با پراکنش ۱۰ تا ۵۰ نامتری در *Staphylococcus aureus* اشاره نمود (Rauf et al., 2017). در ارتباط با سنتز نانوذرات اکسید روی توسط کپک‌های رشته‌ای می توان به سنتز زیستی نانوذرات اکسید روی شش وجهی و کروی شکل با ابعاد ۴۵ تا ۱۵۰ نانومتری توسط *Alternaria alternate* (Sarkar et al., 2014)، سنتز نانوذرات اکسید روی کروی شکل با ابعاد ۶۰ تا ۸۰ نانومتری توسط *A. fumigatus* (Rajan et al., 2016)، سنتز زیستی نانوذرات اکسید روی کروی شکل با توزیع اندازه ذرات ۲۸ تا ۶۳ نانومتری توسط کپک رشته ای *A. terreus* (Baskar et al., 2013) و همچنین سنتز نانوذرات اکسید روی مثلثی شکل با ابعاد بزرگتر از ۱۰۰ نانومتری توسط *Fusarium* sp. اشاره نمود (Velmurugan et al., 2010). در ارتباط با سویه‌های مخمری مطالعات محدودی صورت گرفته که از آن جمله می‌توان به سنتز نانوذرات اکسید روی شش وجهی با پراکنش ۱۰ تا ۶۱ نامتر در مخمر *P. kudriavazevii* (Moghaddam et al., 2017) و همچنین سنتز نانوذرات اکسید روی شبه کروی با میانگینن اندازه ذرات ۲۵ ناومتری توسط مخمر *C. albicans* (Shamsuzzaman et al., 2017) اشاره نمود. علیرغم تحقیقات نسبتا وسیع در ارتباط با بیوسنتز نانوذرات اکسید روی توسط میکروارگانیسم‌های مختلف، مطالعات محدودی در ارتباط با سنتز زیستی این نانوذرات توسط سویه‌های مخمری وجود دارد. مخمرها با توجه به ترشحات آنزیمی بالا، سهولت دسترسی به توده زیستی بالا و از همه مهمتر سهولت پردازش پایین دستی می‌توانند کاندیدای مناسبی برای بیوسنتز نانوذرات اکسید روی باشند. بنابراین، در این پژوهش برای نخستین بار پتانسیل مخمر بومی آب‌زی*Rhodotorula pacifica* NS02 (شماره دسترسی در بانک اطلاعات ژنی MW362559) در تبدیل زیستی نمک استات روی به‌عنوان سوبسترای پیش ساز به نانوذرات اکسید روی به صورت خارج سلولی و با راهکار عصاره عاری از سلول مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده، نانوذرات اکسید روی کروی شکل با میانگین اندازه ی ۴۲/۶ نانومتر و بصورت برون سلولی سنتز شد. سنتز سبز و برون سلولی نانوذرات فلزی مختلف تحت راهکارهای متفاوت از جمله سلول های رویشی، سلول در حال استراحت، سوپرناتانت کشت و عصاره عاری از سلول در میکروارگانیسم‌های مختلف گزارش شده است (Ashengroph et al., 2020; Ashengroph & Hosseini, 2021).

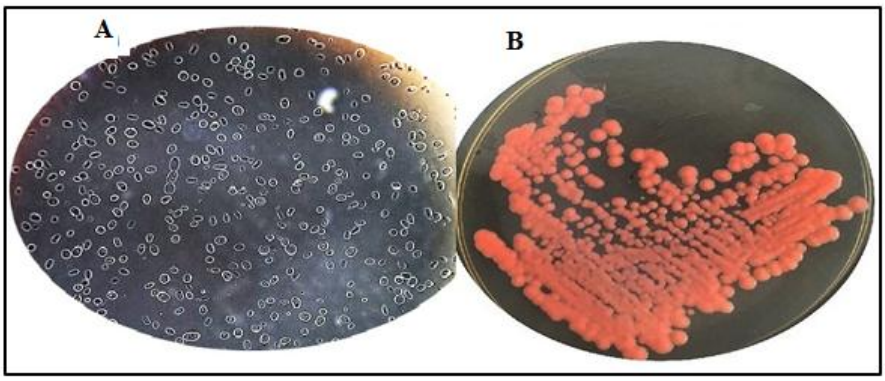
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.6.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.3.195]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.6.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.3.195]



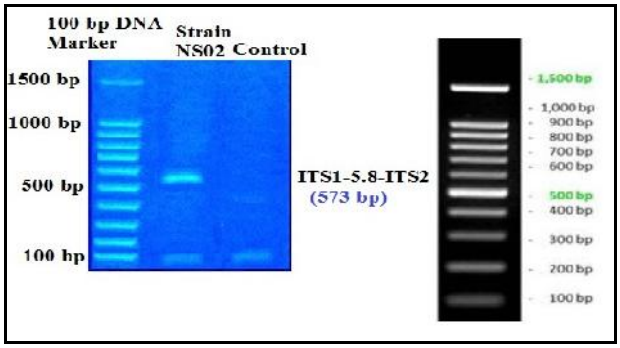
شکل ۴- الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط عصاره ی عاری از سلول سویه مخمری NS02.

Figure 4. XRD pattern associated with zinc oxide nanoparticles produced cell-free extract of the yeast strain NS02.



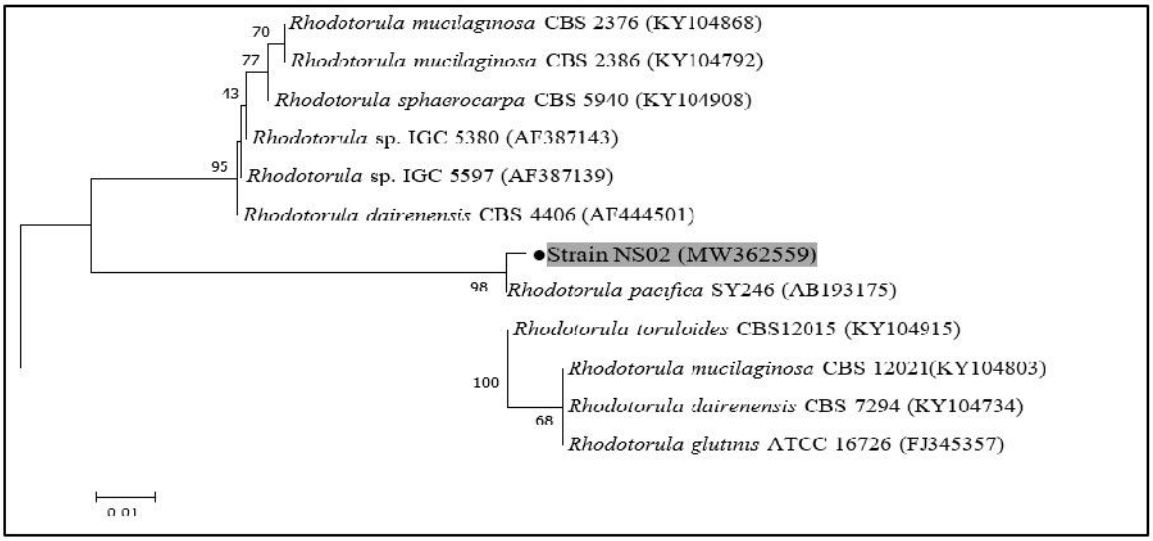
شکل ۵- A. بررسی ریخت شناسی سویه مخمری NS02 در زیر میکروسکوپ فازکنتراست با قدرت بزرگنمایی ۴۰۰. **B**. کلنی سویه مخمری NS02 در محیط کشت YPD آگار.

Figure 5. **A.** Morphology of the yeast strain NS02 by phase-contrast microscopy (×*400*). **B.** Colony of the yeast strain NS02 in YPD agar medium.



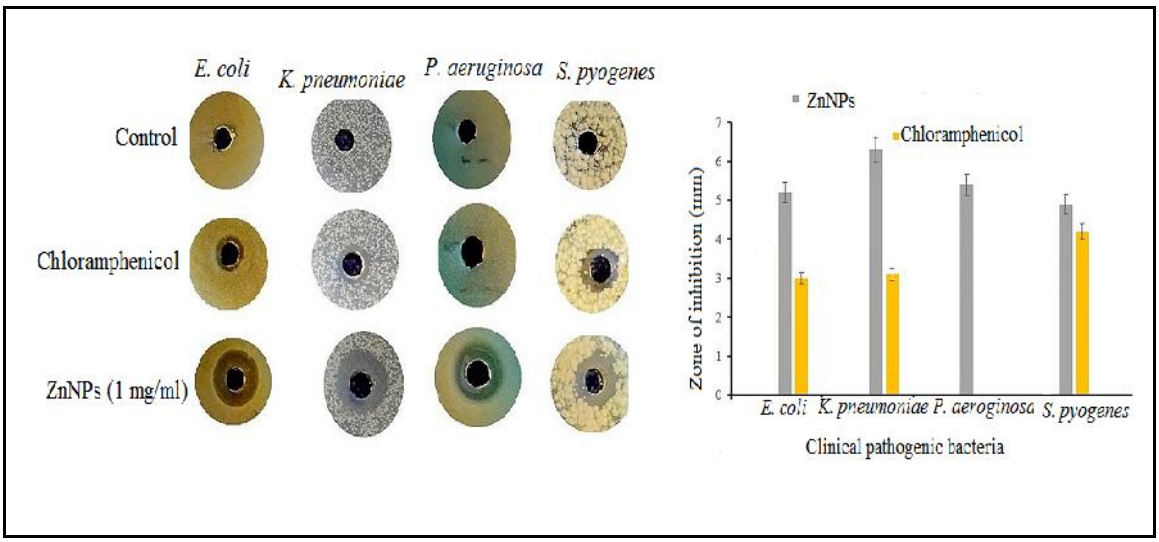
شکل ۶- تکثیر توالی نوکلئوتیدی ITS1-5.8S-ITS2 سویه ی مخمری NS02 با روش PCR و تشکیل محصول ۵۷۳ جفت بازی.

Figure 6. PCR amplification of ITS1-5.85-ITS2 regions of rDNA of the yeast strain NS02, which *was* yielded a PCR product of 573 bp.



شکل ۷- درخت فیلوژنتیکی با استفاده از الگوریتم Neighbor-Joining که نشان دهنده موقعیت سویه NS02 در بین اعضای جنس *Rhodotorula* است. از روش بوت استرپ با 1000 تکرار برای ارزیابی درخت ترسیم شده استفاده شد. شماره دسترسی سویه‌های ثبت شده در بانک ژنی در پرانتز آورده شده است.

Figure 7. Phylogenetic tree based on Neighbor-Joining Algorithm showing the position of the yeast strain NS02 within the genus *Rhodotorula.* The numbers shown at the branch points indicate percentage bootstrap values from 1000 datasets. GeneBank accession numbers are indicated in parentheses.



شکل ۸- اثرات ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط عصاره عاری از سلول *Rhodotorula pacifica* NS02 بر روی جدایه‌های بالینی.

Figure 8. Antimicrobial effects of Zinc oxide nanoparticles produced by cell-free extract *Rhodotorula pacifica* strain NS02 against clinical isolates.

.

مزیت سنتز برون سلولی در مقایسه با سنتز در خارج سلول و یا بر سطح سلول این است که نیاز به تیمارهای خاص جهت استخراج نانوذرات وجود ندارد و بنابراین از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه است. همچنین در پژوهش اخیر از راهکار عصاره عاری از سلول استفاده شد. در این روش از ماکروملکول‌های زیستی تولید شده تحت شرایط استرسی به‌عنوان عامل موثر در ساخت نانوذرات استفاده می شود بنابراین در مقایسه با سایر راهکارها فرایند سنتز سریع تر آغاز می شود و نانوذرات حاصل از توزیع مناسبی برخوردار خواهند بود (Bolbanabad et al., 2020). افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها یک چالش بزرگ در زمینه‌ای دارویی و پزشکی است. استفاده گسترده از داروهای ضد میکروبی باعث ایجاد فشار انتخابی برای تشدید مقاومت در برابر

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.6.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.3.195]

داروهای ضد میکروبی شده است. مقاوت میکروارگانیسم‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌ها به طور پیوسته در حال افزایش است، در این راستا سنتز یا استخراج ترکیباتی مانند نانوذرات با خواص ضد میکروبی ضروری است و کاربردهای بالقوه و امیدوارکننده در مبارزه با این میکروارگانیسم‌ها از این طریق قابل تصور است (Usman et al., 2013). نانوذرات اکسید روی با توجه به نسبت بالای سطح به حجم، عدم سمیت و همچنین عدم مقاومت میکروبی در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری های گرم مثبت و گرم منفی و قارچ ها دارای اثرات ضد میکروبی قوی هستند (Rajan et al., 2016; Moghaddam et al., 2017; Rauf et al., 2017). در این پژوهش کارایی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی سنتزی علیه برخی جدایه‌های بالینی بررسی شد. با توجه به کوچک بودن سایز نانوذرات و توزیع یکنواخت مناسب تاثیر مهاری مطلوب علیه همه جدایه‌های باکتری تست شده مشاهده گردید. معرفی جدایه‌های مخمر آب‌زی به‌عنوان منابع زیستی در سنتز برون سلولی نانوذرات اکسید روی با فعالیت ضد میکروبی مناسب از دستاوردهای این پژوهش است. امید است با بهینه سازی پارامترهای موثر در زیست تبدیلی پیش سازهای مناسب به نانوذرات اکسید روی و همچنین بررسی مسیرهای بیوشیمیایی دخیل در فرایند بیوسنتز امکان دست یابی به نانوذرات با توزیع مناسب و پایداری بالا در مقیاس‌های بالاتر فراهم شود.

سپاسگزاری

این مقاله پژوهشی مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم نشاط سوسنی دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه رازی تحت راهنمایی مشترک دکتر مراحم آشنگرف و دکتر خسرو چهری و با حمایت مالی و معنوی دانشگاه کردستان و دانشگاه رازی اجراشده است که بدینوسیله، نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

REFERENCES

Abdolmaleki, S., Ghadermazi, M., Ashengroph, M., Saffari, A. & Moradi Sabzkohi, S. 2018. Cobalt (II), Zirconium (IV), Calcium (II) complexes with dipicolinic acid and imidazole derivatives: X-ray studies, thermal analyses, evaluation as in vitro antibacterial and cytotoxic agents. Inorganica Chimica Acta 480: 70-82.

Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H. & Momenbeik, F. 2011. *Candida galli* strain PGO6: A novel isolated yeast strain capable of transformation of isoeugenol into vanillin and vanillic acid. Current Microbiology 62: 990-998.

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. Biological Journal of Microorganisms 2: 29-44. (In Persian).

Ashengroph, M. 2014. Fast and extracellular synthesis of zinc oxide nanocrystals using the novel isolated yeast strain *Candida* sp. MY2. Cellular and Molecular Researches 27: 155-166. (In Persian).

Ashengroph, M., Khaledi, A. & Bolbanabad, E.M. 2020. Extracellular biosynthesis of cadmium sulphide quantum dot using cell-free extract of *Pseudomonas chlororaphis* CHR05 and its antibacterial activity. Process Biochemistry 89: 63-70.

Ashengroph, M. & Hosseini, SR. 2021. A newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SRB04 for the synthesis of selenium nanoparticles with potential antibacterial properties. International Microbiology 24**:** 103-114.

Baskar, G., Chandhuru, J., Fahad, K.S. & Praveen, A.S. 2013. Mycological synthesis, characterization and antifungal activity of zinc oxide nanoparticles. Asian Journal *of* Pharmaceutical Technology 3: 142-146.

Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M. & Rizzolio, F. 2019. The History of nanoscience and nanotechnology: from chemical-physical applications to nanomedicine. Molecules 25: 1-15.

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.

Ding, X., Lin, K., Li, Y., Dang, M. & Jiang, L. 2020. Synthesis of biocompatible zinc oxide (ZnO) nanoparticles and their neuroprotective effect of 6-OHDA induced neural damage in SH-SY 5Y cells. Journal of Cluster Science 31: 1315-1328.

DurÁn, N., Marcato, P.D., Ingle, A., Gade, A. & Rai, M. 2010. Fungi-mediated synthesis of silver nanoparticles: characterization processes and applications. In: Rai, M., Kövics, G. (eds.) Progress in Mycology. Springer, Dordrecht.

Gahlawat, G. & Choudhury, A.R. 2019. A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes. RSC Advances 23: 12944-12967.

Jangi, M., Mohammadgholi, A. & Divsalar, A. 2020. The investigation of the effects of synthesized Zinc oxide nanoparticles on the DNA using green chemistry. Nova Biologica Reperta 7: 145-152. (In Persian).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.6.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.3.195]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.6.9]

[DOI: 10.52547/nbr.8.3.195]

Jiang, J., Pi, J. & Cai, J. 2018. The advancing of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications. Bioinorganic Chemistry and Applications 2018: 1-18.

Kołodziejczak-Radzimska, A. & Jesionowski. T. 2014. Zinc oxide-from synthesis to application: a review. Materials (Basel) 7: 2833-2881.

Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33: 1870-1874.

Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. 2000. The yeasts: a taxonomic study. Elsevier, Amsterdam, pp 1-525.

Lim, Z.H., Chia, Z.X., Kevin, M., Wong, A.S. & Ho, G.W. 2010**.** A facile approach towards ZnO nanorods conductive textile for room temperature multifunctional sensors. Sensors and Actuators B: Chemical 151: 121-126.

Mahamuni, P.P., Patil, P.M., Dhanavade, M.J., Badiger, M.V., Shadija, P.G., Lokhande, A.C. & Bohara, R.A. 2019. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles by using polyol chemistry for their antimicrobial and antibiofilm activity. Biochemistry and Biophysics Reports 17: 71-80.

Moghaddam, A.B., Moniri, M., Azizi, S., Rahim, R.A., Ariff, A.B., Saad, W.Z., Namvar, F. & Navaderi, M. 2017. Biosynthesis of ZnO nanoparticles by a new *Pichia kudriavzevii* yeast strain and evaluation of their antimicrobial and antioxidant activities. Molecules 22: 872-890.

Mohd Yusof, H., Mohamad, R., Zaidan, U.H. & Rahman, N.A.A. 2019. Microbial synthesis of zinc oxide nanoparticles and their potential application as an antimicrobial agent and a feed supplement in animal industry: a review. Journal of Animal Science and Biotechnology 10: 1-22.

Rajabairavi, N., Raju, C.S., Karthikeyan, C., Varutharaju, K., Nethaji, S., Hameed, A.S.H. & Shajahan, A. 2017. Biosynthesis of novel zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) using endophytic bacteria *Sphingobacterium thalpophilum*. Springer Proceedings in Physics 189: 245-254.

Rajan, A., Cherian, E. & Baskar, G. 2016. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Aspergillus fumigatus* JCF and its antibacterial activity. International Journal of Modern Science and Technology 1: 52-57.

Rajeshkumar, S. & Sivapriya, D. 2020. Fungus-mediated nanoparticles: characterization and biomedical advances. In: Shukla, A. (ed.) Nanoparticles in medicine. Springer, Singapore.

Rauf, M.A., Owais, M., Rajpoot, R., Ahmad, F., Khan, N. & Zubair, S. 2017. Biomimetically synthesized ZnO nanoparticles attain potent antibacterial activity against less susceptible: *S. aureus* skin infection in experimental animals. RSC Advances 7: 36361-36373.

Saravanan, M., Gopinath, V., Chaurasia, M.K., Syed, A., Ameen, F., Purushothaman, N. 2018. Green synthesis of anisotropic zinc oxide nanoparticles with antibacterial and cytofriendly properties. Microbial Pathogenesis 115: 57-63.

Sarkar, J., Ghosh, M., Mukherjee, A., Chattopadhyay, D. & Acharya, K. 2014. Biosynthesis and safety evaluation of ZnO nanoparticles. Bioprocess and Biosystems Engineering 37: 165-171.

Selvarajan, E. & Mohanasrinivasan, V. 2013. Biosynthesis and characterization of ZnO nanoparticles using *Lactobacillus plantarum* VITES07. Materials Letters 112: 180-182.

Shamsuzzaman, M.A., Khanam, H. & Aljawfi, R.N. 2017. Biological synthesis of ZnO nanoparticles using *C. albicans* and studying their catalytic performance in the synthesis of steroidal pyrazolines. Arabian Journal of Chemistry 10: 1530-1536.

Singh, B.N., Rawat, A.K.S., Khan, W., Naqvi, A.H. & Singh, B.R. 2014. Biosynthesis of stable antioxidant ZnO nanoparticles by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids. PLoS One 9: 1-12.

Usman, M.S., El Zowalaty, M.E., Shameli, K., Zainuddin, N., Salama, M. & Ibrahim, N.A. 2013. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. International Journal of Nanomedicine 8: 4467-4479.

Velmurugan, P., Shim, J., You, Y., Choi, S., Kamala-Kannan, S., Lee, K.J., Kim, H.J. & Oh, B.T. 2010. Removal of zinc by live, dead, and dried biomass of *Fusarium* spp. Isolated from the abandoned-metal mine in South Korea and its perspective of producing nanocrystals. Journal of Hazardous Materials 182: 317-324.

Washington, J.A. & Sutter, V.L. 1980. Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution procedures. In: Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, J.R. & WJTruant, J. (eds.). Manual of clinical microbiology, 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp 453-458.

White, T.J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, 315-322.

Yamada, Y., Makimura, K., Mirhendi, H., Ueda, K., Nishiyama, Y., Yamaguchi, H. and Osumi, M. 2002. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. Japanese Journal *of* Infectious Diseases 55: 122-125.

*****

How to cite this article:

Soosani, N., Ashengroph, M. & Chehri, Kh. 2021. Extracellular green synthesis of zinc oxide nanoparticle by using the cell-free extract *Rhodotorula pacifica* NS02 and investigation of their antimicrobial activities. Nova Biologica Reperta 8: 195-205. (In Persian).

سوسنی، ن.، آشنگرف، م. و چهری، خ. ۱۴۰۰. سنتز سبز و برون سلولی نانوذرات اکسید روی توسط عصاره عاری از سلول *Rdodotroula pacifica* NS02 و بررسی خواص ضد میکروبی آن. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۸: ۲۰۵-۱۹۵.