مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۷، مهر ۱۳۹۷، ۶۳۸-۶۲۵

بیوسنتز و تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی و سمیت سلولی نانوذرات سلنیوم تولید شده توسط *استرپتومایسس لاواندوله* FSHJ9 علیه رده سلولی MCF-7

مجتبی شکیبایی[۱]، ماندانا جعفری[۲]، عالیه عامری[۳]، حمید رضا رحیمی[۴]، حمید فروتن فر[۵]

دریافت مقاله: ۹۶/۹/۲۵ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۷/۲/۳۰ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۳/۲۸ پذیرش مقاله: ۹۷/۴/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: خصوصیات ویژه فیزیکوشیمیایی نانوذرات سلنیوم باعث شده است که اخیراً توجه ویژه‌ای به معرفی سویه-های میکروبی مولد نانوذرات سلنیوم صورت گیرد. هدف از مطالعه حاضر معرفی سویه اکتینومیست مولد نانوذرات سلنیوم، تعیین خصوصیات نانوذرات و بررسی اثر سمیت سلولی آن بر رده سلولی سرطان سینه (MCF-7) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی ابتدا سویه مولد نانوذرات سلنیوم از نمونه‌های خاک جداسازی گردید. سویه منتخب سپس به کمک تست‌های بیوشیمیایی، مورفولوژیک و تعیین توالی ژن 16S rDNA شناسایی شد. سپس طیف UV-Visible، عکس میکروسکوپ الکترونی TEM (Transmission electron microscope)، الگوی پراکنش اندازه ذره‌ای، طیف EDX (Energy-dispersive X-ray) و FTIR (Fourier-transform infrared) نانوذرات سلنیوم تعیین گردید. جهت بررسی اثر سمیت سلولی نانوذرات سلنیوم از روش رنگ سنجی بر پایه MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) استفاده گردید که در این روش ابتدا درصد زنده‌مانی محاسبه و سپس میزان IC_{50} (Half inhibitory concentration) مربوطه محاسبه گردید.

یافته‌ها: باکتری منتخب به عنوان *استرپتومایسس لاواندوله* FSHJ9 شناسایی گردید. عکس‌های TEM نشان دادند که نانوذرات کروی اندازه ذره‌ای ۱۲۳-۲۸ نانومتر دارند. طیف FTIR آنها نشان داد که گروه عاملی خاصی بر روی سطح نانوذرات حضور ندارد. نتایج سمیت سلولی نانوذرات نشان داد که IC_{50} نانودرات سلنیوم (۴۲/۲۳±۷۷/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) در مقایسه با IC_{50} سدیم سلنیت (۴۱/۵۳±۳/۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بیشتر است.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که *استرپتومایسس لاواندوله* FSHJ9 قادر است نانوذرات سلنیوم را تولید کند. این نانوذرات احتمالاً پس از انجام مطالعات تکمیلی‌می‌توانند کاربردهایی از جمله به عنوان مکمل در رژیم غذایی انسان و دام پیدا کند.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات سلنیوم، بیوسنتز، استرپتومایسس، سمیت سلولی، رده سلولی MCF-7

۱- دانشیار گروه آموزشی بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۳- استادیار گروه آموزشی شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۴- استادیار گروه آموزشی فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۵- (نویسنده مسئول) دانشیار گروه آموزشی بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
تلفن: ۳۱۳۲۵۲۳۸-۰۳۴، دورنگار: ۳۱۳۲۵۰۰۳-۰۳۴، پست الکترونیک: h_forootanfar@kmu.ac.ir

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.7.4.5]

مقدمه

خواص فیزیکوشیمیایی منحصر به فردی که نانو مواد نسبت به مواد غیر نانو از خود بروز می‌دهند در دهه‌های اخیر باعث انجام مطالعات فراوانی در این حوزه شده است [۵-۱]. نانوذرات فلزی مانند طلا و نقره در زمینه‌های مختلف علوم شیمی، فیزیک و پزشکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۵-۲]. بعضی از خواص عنصر سلنیوم مانند هدایت گرمایی و نوری بالا و آنیزوتروپی باعث استفاده بسیار این شبه فلز در سلول‌های خورشیدی شده است [۷-۴ ،۶-۳]. علاوه بر این وجود سلنیوم در ساختار سلنوآنزیم‌ها و گلوتاتیون پراکسیداز که لیپیدها، لیپوپروتئین‌ها و DNA (Deoxyribonucleic acid) را در سلول‌های حیوانی از آسیب حفظ می‌کنند، باعث معرفی سلنیوم به عنوان یک عنصر ضروری تغذیه‌ای شده است [۹-۸]. به هر حال نوع ساختار ترکیبات حاوی سلنیوم نقش بسیار مهمی در فراهمی زیستی و فعالیت زیستی این عناصر ایفاء می‌کنند [۴-۳]. مطالعات درون تنی و برون تنی نشان دادند که نانوذرات سلنیوم (Se^0) نه تنها سمیت کمتری دارند، بلکه فعالیت بیولوژیکی بهتری را نسبت به یون‌های Se^{4+} و Se^{6+} که فراوان‌ترین اشکال سلنیوم موجود هستند از خود نشان می‌دهند [۱۱-۱۰].

روش‌های فیزیکوشیمیایی که برای سنتز نانوذرات استفاده می‌شوند اغلب پرهزینه و وقت‌گیر بوده و دوست‌دار محیط زیست نیستند، بنابراین محققین به سنتز نانوساختارها با استفاده از روش‌های بیولوژیک روی آورده‌اند [۱۳-۱۲]. میکروارگانیسم‌ها، آنزیم‌ها، سلول‌ها و عصاره‌های گیاهی از جمله منابع بیولوژیکی هستند که برای ساخت نانوذرات سلنیوم مورد استفاده قرار گرفته اند [۱۴-۱۲]. برای مثال Shakibaie و همکاران سویه باکتریایی *Bacillus* sp. Msh1 را از نمونه‌های آب دریای خزر جداسازی نمودند که این سویه قادر به سنتز نانوذرات سلنیوم کروی بود [۳]. در مطالعه دیگری مشخص گردید سویه باکتریایی هالوفیل *باسیلوس مگاتریوم* قادر بود بعد از ۴۰ ساعت انکوباسیون در غلظت‌های بالاتر از ۰/۲۵ میلی‌مولار سدیم سلنیت را به نانوذرات سلنیوم تبدیل نماید [۱۲]. Zare و همکاران گزارش نمودند که مایع رویی محیط کشت *آسپرژیلوس ترئوس* قادر است که نانوذرات سلنیوم با متوسط اندازه ذره‌ای ۴۷ نانومتر را سنتز نماید [۱۳]. علاوه بر این، مشخص شده است که اکتینومایست‌ها و به ویژه جنس استرپتومایسس توانایی ویژه‌ای در تولید متابولیت‌های ثانویه (مثل آنتی بیوتیک‌ها، ضد ویروس‌ها و آنزیم‌های مختلف) دارند [۱۵]. توانایی اکتینومایست‌ها برای بیوسنتز نانوذرات فلزی نقره و طلا پیش از این گزارش شده است [۱۷-۱۶].

مطالعه حاضر سعی بر این دارد که یک سویه اکتینومیست مولد نانوذرات سلنیوم را از نمونه‌های خاک جداسازی و شناسایی نماید تا بعد از خالص‌سازی و تعیین خصوصیات نانوذرات سلنیوم بیوژنیک به مطالعه سمیت سلولی آن‌ها بپردازد. لازم به‌ذکر است که مطالعات اندکی در این خصوص صورت گرفته [۳] و همان‌طور که ذکر شد استفاده از میکروارگانیسم‌ها به منظور بیوسنتز نانوذرات یک رویکرد جدید است که در سال‌های اخیر توجه زیادی به آن شده است [۱].

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.7.4.5]

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی که در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دارویی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان و در فاصله زمانی مهر ۱۳۹۴ تا شهریور ۱۳۹۵ صورت گرفت. علاوه بر این، این مطالعه دارای کد اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی کرمان به شماره ۹۳۰۱۶۰ می باشد. به منظور جداسازی سویه اکتینومیست احیاء کننده یون‌های Se^{4+}، تعداد ۳۰ نمونه خاک کشاورزی از نقاط مختلف شهرستان کرمان (باغ‌های منطقه سرآسیاب، زنگی آباد، کاظم آباد، چترود و لاله زار) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. یک گرم از نمونه‌های خاک با ۲۰ میلی‌لیتر محلول سدیم کلراید ۰/۹ درصد حاوی توئین ۸۰ (۰/۵ درصد) مخلوط شد و توسط کاغذ صافی (شماره ۱ واتمن) صاف گردید. ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره خاکی به دست آمده به روش رقیق سازی سریالی رقیق گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به محیط کشت CGA (Casein glycerol agar) شامل (گرم بر لیتر): کازئین (۰/۳)، گلیسرول (۱۰)، سدیم کلراید (۲)، پتاسیم نیترات (۲)، دی پتاسیم هیدروژن فسفات (۲)، منیزیم سولفات هفت آبه (۰/۰۵)، کلسیم کربنات (۰/۰۲)، فروس سولفات ۷ آبه (۰/۰۱) و آگار (۱۵) حاوی سدیم سلنیت (۱/۲۶ میلی‌مولار) منتقل و پخش گردید. پلیت‌ها تا زمانی که اکتینومیست‌ها رشد کنند، در دمای ۳۰ درجه گرم خانه‌گذاری شدند (ژال تجهیز، مدل JTSL20، ایران). کلونی‌های قرمز رنگ واجد قدرت احیاء کنندگی یون‌های Se^{+4} جداسازی شده و تا رسیدن به کلونی خالص روی محیط‌های CGA دارای سدیم سلنیت واکشت داده شدند. هم‌چنین برای اطمینان از عدم تولید رنگ‌دانه قرمز هر کدام از کلونی‌های جداسازی شده روی محیط‌های CGA فاقد سدیم سلنیت نیز واکشت داده شدند. به منظور انتخاب سویه اکتینومایست واجد بیشترین مقاومت به سدیم سلنیت، حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum inhibitory concentration; MIC) سدیم سلنیت برای سویه‌های جداشده مرحله قبل به روش رقیق سازی در آگار تعیین گردید [۳]. سویه اکتینومیست انتخابی سپس در دمای ۸۰- درجه (New Brunswick، مدل U535، آمریکا) و در محیط نوترینت براث حاوی گلیسرول (۱۵ درصد) ذخیره گردید.

در مرحله بعد شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی سویه اکتینومایست انتخابی بر اساس رفرنس Bergey's Manual of Determinative Bacteriology انجام گرفت [۱۸]. هم‌چنین شناسایی مولکولی بر مبنای تعیین توالی ژن 16S rDNA به شرح زیر انجام شد. ابتدا برای به‌دست آوردن DNA ژنومی، سویه انتخابی در محیط کشت مایع Luria-Bertani (گرم بر لیتر: تریپتون ۱۰، عصاره مخمر ۵، سدیم کلراید ۱۰) به مدت شش روز (۳۰ درجه، ۱۵۰rpm) کشت داده شد و سپس توده زیستی تولیدی با سانتریفیوژ (Eppendorf، مدل 5810R، آلمان) جدا گردید(۱۰۰۰۰ rpm، ۵ دقیقه). سپس DNA ژنومی با استفاده از روش فنول-کلروفرم استخراج گردید [۱۹]. برای تکثیر قطعه ۱۴۲۲ bp از ژن 16S rDNA از زوج پرایمر 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و rp2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') با

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.7.4.5]

برنامه PCR (Polymerase chain reaction) سه دقیقه واسرشته شدن ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه شامل واسرشته شدن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و نهایتاً گسترش پایانی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه انجام گرفت (دستگاه ترمال سایکلر PeqLab، مدل PeqStar 96، آلمان). بعد از تعیین توالی قطعه تکثیر شده (شرکت Bionir، *کره* جنوبی)، توالی ژن 16S rDNA سویه جدا شده با سایر توالی‌های موجود در بانک ژنی با استفاده از نرم‌افزار BLAST (Basic local alignment search tools) نسخه 2.8.0- alpha مورد مقایسه قرار گرفت [۲۰].

به منظور تولید نانوذرات سلنیوم سویه اکتینومیست انتخابی در محیط کشت مایع CG حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از یون‌های Se^{+4} به مدت ۵ روز کشت داده شد (۱۵۰ rpm، ۳۰ درجه سانتی‌گراد). بعد از جداسازی سلول‌ها با استفاده از سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ rpm، ۵ دقیقه)، توده سلولی تولیدی با افزودن نیتروژن مایع فریز گردید و بعد از ساییدن به کمک هاون چینی لیز شد. بعد از این که مخلوط حاصله تحت اولتراسونیک (۱۰۰ وات، ۵ دقیقه) (پروب سونیکاتور ProScientific، مدل VCX 750، آمریکا) قرار گرفت و سه بار با استفاده از بافر تریس هیدروکلراید (۱/۵ میلی‌مولار، pH=۸/۳) حاوی سدیم دودسیل سولفات (درصد۱) و آب دیونیزه شسته شد. پلت حاصله در آب دیونیزه پخش گردید. دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصله به ۴ میلی‌لیتر از n-اکتانول اضافه و به شدت تکان داده شد. سپس مخلوط حاصله سانتریفیوژ شد (۵۰۰۰ rpm، دقیقه) و در یخچال به مدت ۲۴ ساعت نگه‌داری شد. بعد از مرحله فوق نانوذرات سلنیوم تولیدی در فاز آبی و در انتهای لوله‌ها جمع شده و باقی‌مانده‌های سلولی نیز در بین دو فاز آبی-آلی تجمع پیدا می‌کنند. نانوذرات تولیدی به ترتیب با استفاده از کلروفرم، اتیل الکل و آب مقطر شستشو داده شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه‌داری شدند [۳].

در مرحله بعد خصوصیات مختلف نانوذرات تولید شده و خالص شده با استفاده از روش‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. طیف UV-Visible نانوذرات سلنیوم خالص شده با استفاده از اسپکتروفتومتر (شیمادزو، مدل UV-1800، آمریکا) رسم گردید. تصاویر نانوذرات با قرار دادن آن‌ها بر روی گرید مسی و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (Zeiss، مدل Supra 55 VP، آلمان) در ولتاژ ۱۰۰ کیلو ولت تهیه شدند و طیف EDX- (Energy-dispersive X-ray) نانوذرات نیز با همین دستگاه رسم گردید. نمودار توزیع اندازه ذره‌ای نانوذرات با استفاده از نانوسایزر (کمپانی تجهیزات مالورن، مدل MS2000، انگلستان) اندازه گیری شد و طیف FTIR- (Fourier-transform infrared) با تشکیل قرص پتاسیم بروماید حاوی نانوذرات خشک شده با درجه تفکیک $4\ cm^{-1}$ تهیه گردید (Bruker، مدل آلفا، آمریکا). الگوی XRD (X-ray diffraction) کریستالی پودر خشک نانوذرات سلنیوم با استفاده از دستگاه پراش اشعه ایکس (Bruker، مدل D8 Advance، آمریکا) مشخصه یابی شد [۳].

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.7.4.5]

اثرات سمیت سلولی نانوذرات سلنیوم بیوژنیک در مرحله بعد مورد بررسی قرار گرفتند. رده سلولی سرطان پستان (MCF-7)، مورد استفاده در این مطالعه از بانک سلولی جهاد دانشگاهی (Iranian biological resource center; IBRC) تهیه شد. برای کشت سلول‌ها از محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) حاوی FBS (Fetal bovine serum) (۱۰ درصد) که دارای آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بود در انکوباتور CO_2 (دی‌اکسیدکربن ۵ درصد با رطوبت نسبی ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد (New Brunswick، مدل Galaxy170 S، آمریکا). تعداد بیست هزار سلول در چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ خانه کشت سلولی وارد شد و به مدت ۲۴ ساعت جهت اتصال سلول‌ها به کف میکروپلیت گرم خانه‌گذاری شدند. سلول‌ها سپس جداگانه با غلظت‌های مختلف نانوذرات سلنیوم و سدیم سلنیت (۰ تا ۱۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تیمار شدند. بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت سلول‌ها با ۲۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM حاوی MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) جایگزین شدند و بعد از ۴ ساعت انکوباسیون ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO (Dimethyl sulfoxide) به چاهک‌ها اضافه شد و میزان جذب در ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. کلیه مراحل فوق سه بار و در سه روز مختلف انجام گرفت و میانگین جذب‌ها برای محاسبه میزان درصد زنده‌مانی (Viability%) و هم‌چنین IC_{50} (Half inhibitory concentration) به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۵ و ابزار آنالیز Probit استفاده شدند [۲۱].

نتایج

از میان ۳۶ کلونی اکتینومیست جداشده از خاک فقط پنج کلونی دارای توانایی احیاء یون‌های Se^{+4} به Se^{0} قرمز رنگ بودند. محاسبه میزان MIC سدیم سلنیت برای سویه‌های منتخب نشان داد که ایزوله J9 بیشترین قدرت تحمل یون‌های سلنیوم (۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) با تبدیل آن‌ها به Se^{0} را دارا بود. با کشت ایزوله منتخب روی پلیت‌های حاوی محیط CGA (شکل ۱-الف) و محیط مایع CG (شکل ۱-د) حاوی یون‌های Se^{+4} پیدایش رنگ قرمز ناشی از نانوذرات Se^{0} قابل مشاهده است و فقدان رنگ قرمز در کلونی‌های رشد کرده روی محیط‌های فاقد سلنیوم (شکل ۱-ب و ۱-ج) عدم ارتباط رنگ مشاهده شده با تولید رنگدانه توسط این ایزوله را نشان می‌دهد.

مشاهدات مورفولوژیک ایزوله J9 را یک باکتری رشته‌ای و گرم مثبت نشان داد و نتایج تست‌های بیوشیمیایی در جدول ۱ آورده شده است. هر دو این نتایج نشان داد که ایزوله J9 متعلق به خانواده استرپتومایست‌ها است. نتایج BLAST توالی 16S rDNA ایزوله J9 نشان داد که این توالی ۹۹ درصد با توالی ژن 16S rDNA *استرپتومایسس لاوندوله* مشابهت دارد و بنابراین توالی ۱۴۳۴ نوکلئوتیدی به‌دست آمده در بانک ژنی با شماره پذیرش KC626003 ثبت گردید.

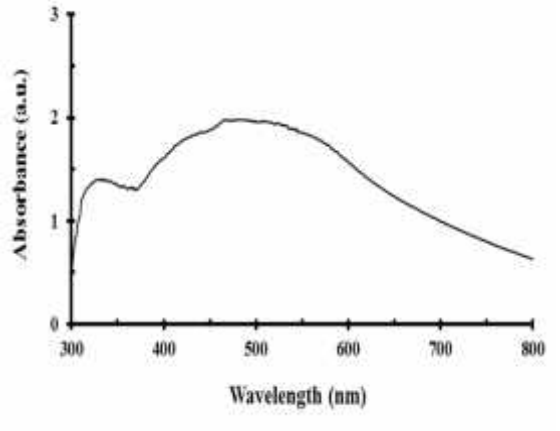
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.7.4.5]



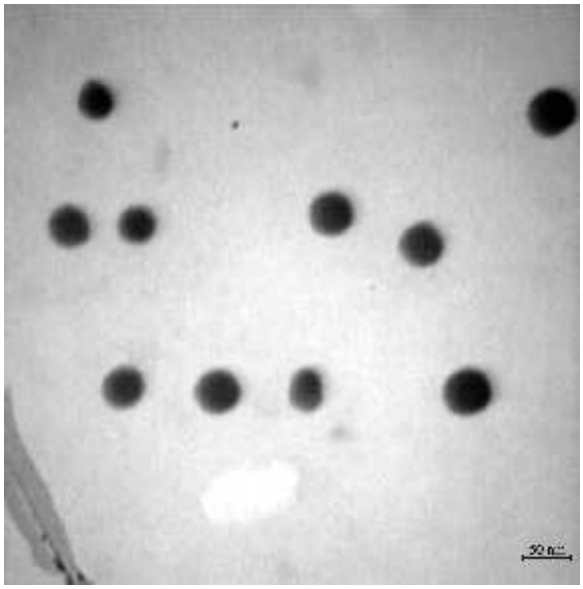
شکل ۱- کشت ایزوله باکتریایی استرپتومایسس لاواندوله FSHJ9 روی محیط کشت کازیین-گلیسرول آگار
الف) حاوی سدیم سلنیت و ب) فاقد سدیم سلنیت. فلاسک کشت مایع استرپتومایسس لاواندوله FSHJ9 در عدم حضور و حضور سدیم سلنیت بعد از ۵ روز کشت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد.

در مرحله بعد و پس از رشد سویه *استرپتومایسس لاواندوله* در محیط کشت حاوی یون سلنیوم، نانوذرات سلنیوم تولید شدند که در ادامه و به کمک سیستم حلال آب-اکتانول این نانوذرات خالص شدند و برای مراحل بعدی یعنی تعیین خصوصیات و بررسی سمیت سلولی مورد استفاده قرار گرفتند. طیف UV-vis نانوذرات سلنیوم خالص شده در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود یک ناحیه جذبی در محدوده طول موج ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر دیده می‌شود. گسترده بودن محدوده اندازه ذره‌ای نانوذرات سلنیوم می‌تواند به علت ایجاد اتصالات بین نانوذرات باشد که پیش از این به عنوان دلیل پهن شدن طیف UV-vis مورد بحث قرار گرفته است [۳]. همان‌طور که در تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (شکل ۳) مشخص است نانوذرات سلنیوم تولید شده در این تحقیق کروی شکل هستند.



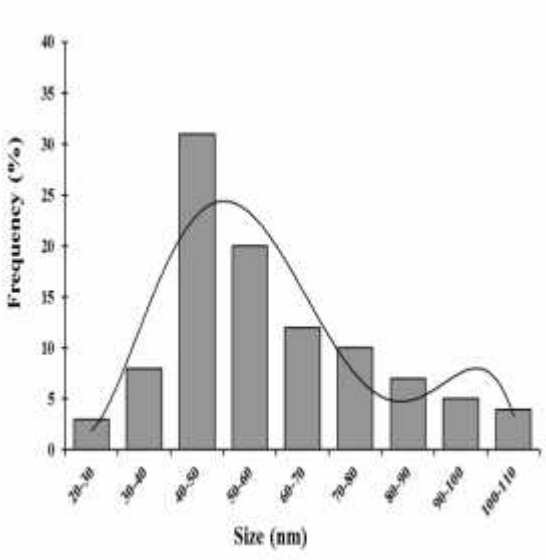
شکل ۲- طیف UV-visible نانوذرات سلنیوم بیوژنیک

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.7.4.5]



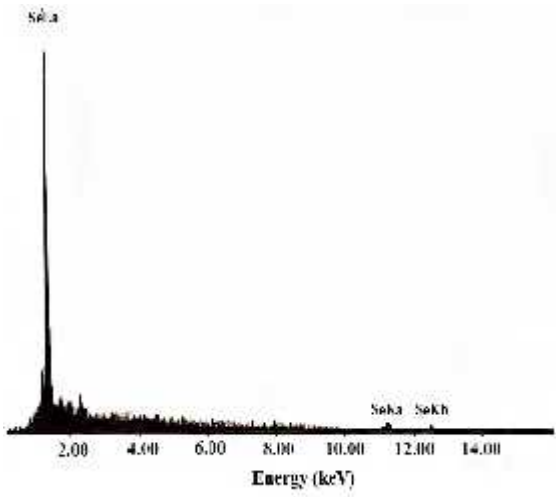
شکل ۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM نانوذرات سلنیوم بیوژنیک

نتایج به‌دست آمده از روش تفرق اشعه لیزر برای محاسبه اندازه ذره‌ای نانوذرات در شکل ۴ آورده شده است. سایز نانوذرات تولیدی در محدوده اندازه ذره‌ای ۲۸ تا ۱۲۳ نانومتر قرار داشت و نانوذرات با اندازه ذره‌ای ۴۸ نانومتر بیشترین فراوانی را داشتند.



شکل ۴- الگوی توزیع اندازه ذره‌ای نانوذرات سلنیوم بیوژنیک

به طور کلی نانوذرات سلنیوم که با روش‌های شیمیایی تولید می‌شوند نسبت به نانوذرات بیوژنیک اندازه ذره‌ای کمتری از خود نشان می‌دهند [۵ ،۳]. طیف EDX (Energy-dispersive X-ray) نانوذرات سلنیوم خالص شده پیک‌های جذبی SeLα، SeKα و SeKβ را به ترتیب در ۱/۳۷، ۱۱/۲۲ و ۱۲/۴۹ کیلوالکترون ولت نمایش می‌دهد (شکل ۵).

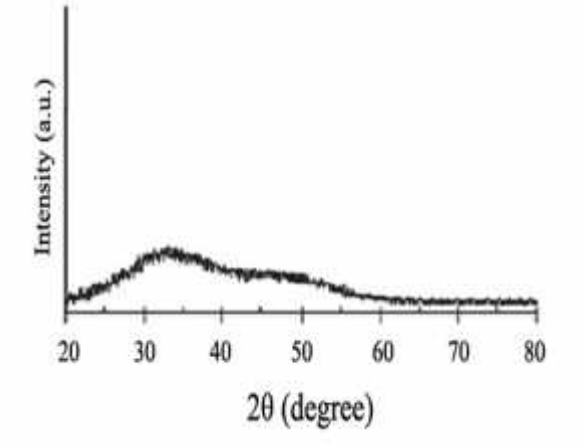


شکل۵- طیف EDX نانوذرات سلنیوم بیوژنیک

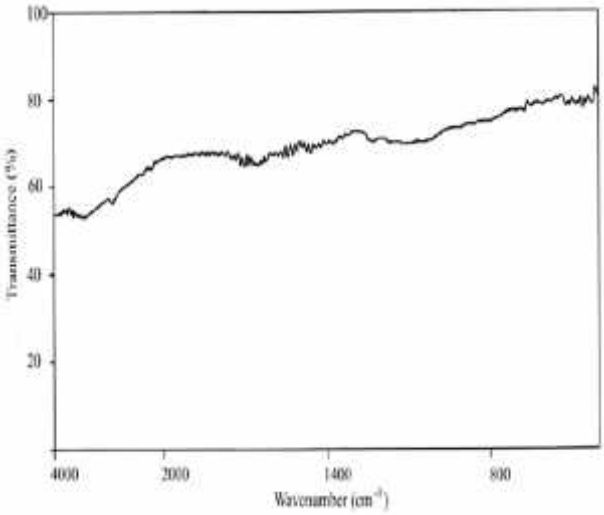
علاوه بر این آنالیز عنصری سیگنال‌های قوی برابر با ۱۰۰ درصد بدون حضور سایر عناصر را نشان داد (شکل ۵) که می‌توان نتیجه گرفت سیستم دوفازی آب/اکتانول به خوبی توانسته ناخالصی‌های سلولی را از نانوذرات سلنیوم جداسازی نماید. بر اساس نمودار به‌دست آمده از مطالعه طیف XRD نانوذرات سلنیوم بیوژنیک (شکل ۶) این نانوذرات شکل کریستالی خاصی ندارند و به شکل آمورف دیده می‌شوند. طیف FTIR (Fourier-transform infrared) نانوذرات سلنیوم (شکل ۷) هیچ باند جذبی مشخصی را نشان نداد که این امر به معنای عدم حضور

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.7.4.5]

گروه عاملی خاص بر سطح نانوذرات بیوژنیک تولید شده می‌باشد.

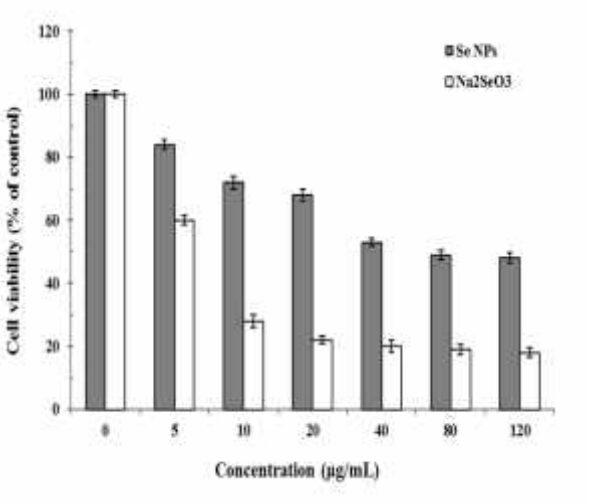


شکل ۶- آنالیز XRD نانوذرات سلنیوم بیوژنیک



شکل ۷- طیف FTIR نانوذرات سلنیوم بیوژنیک

آنالیز سمیت سلولی نانوذرات سلنیوم بیوژنیک علیه رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) یک رابطه مستقیم دوز-پاسخ را نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات میزان سلول‌های زنده MCF-7 کاهش پیدا می‌کند (شکل ۸). نتایج مطالعه حاصل هم‌چنین نشان داد که نانوذرات سلنیوم بیوژنیک (IC_{50} برابر با ۱/۲۳±۷۷/۴۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) سمیت کمتری را در مقایسه با سدیم سلنیت (IC_{50} برابر با ۰/۵۳±۳/۴۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) روی رده سلولی MCF-7 از خود نشان داد.



شکل ۸- مقایسه سمیت سلولی نانوذرات سلنیوم بیوژنیک با سدیم سلنیت روی رده سلولی MCF-7

بحث

نانوذرات سلنیوم به دلیل خصوصیات منحصر به فرد فیزیکوشیمیایی و الکتریکی خود در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است [۴-۳] این نانوذره شبه فلزی هم‌چنین به واسطه خواص بیولوژیک مختلف خود همچون خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضد بیوفیلمی و تقویت کنندگی سیستم ایمنی امروزه به‌عنوان یکی از نانوذرات مهم در علوم پزشکی مورد توجه محققان این رشته نیز قرار گرفته است [۶-۴]. این نکته نیز قابل توجه است که در مطالعاتی که در سال‌های اخیر صورت گرفته اثربخشی بالاتر و سمیت کمتری از نانوذرات سلنیوم در مقایسه با اشکال دیگر سلنیوم از جمله سلنیت، سلنومتیونین و سلنوسیستئین

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.7.4.5]

گزارش شده است [۱۰]. روش‌های مختلفی برای سنتز نانوذرات فلزی و شبه فلزی وجود دارد که در این بین بیوسنتز نانوذرات فلزی با استفاده از باکتری‌ها به عنوان یک روش جایگزین برای روش‌های فیزیکوشیمیایی مورد توجه قرار گرفته است [۶-۳]. برای مثال Zhang و همکاران نشان دادند که باکتری *سودوموناس آلکالیفیلا* قادر است که نانوذرات سلنیوم کروی شکلی را با قطر ۵۰ تا ۵۰۰ نانومتر تولید نماید [۶]. باکتری هالوفیل *باسیلوس مگاتریوم* قادر بود غلظت‌های بالاتر از ۰/۲۵ میلی‌مولار سدیم سلنیت را بعد از ۴۰ ساعت انکوباسیون به نانوذرات سلنیوم تبدیل نماید [۱۲]. با استفاده از سوپرناتانت محیط کشت *آسپرژیلوس ترئوس* نانوذرات سلنیوم با متوسط اندازه ذره ای ۴۷ نانومتر تهیه شدند [۱۳]. هم‌چنین Yazdi و همکاران نشان دادند که سویه پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* قادر بود نانوذرات سلنیوم با اندازه ذره‌ای کمتر از ۲۵۰ نانومتر را بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون تولید نماید [۲۲].

سیستم دوفازی آلی-مائی استفاده شده در این مطالعه به خوبی قادر بود نانوذرات سلنیوم تولیدی را از توده زیستی اکتینومیست جداسازی نماید. در مطالعه مشابهی که توسط Forootanfar و همکاران صورت گرفت نیز از این سیستم حلال به صورت موفقیت آمیز برای جداسازی نانوذرات سلنیوم تولیدی توسط سویه باسیلوس بود استفاده گردید. هم‌چنین نانوذرات تلوریوم بیوژنیک (تولید شده توسط سویه باکتریایی *سودوموناس سودو الکالی ژنز*) نیز به کمک همین سیستم حلال جداسازی و تعیین خصوصیات گردید [۲۳]. طیف UV-vis نانوذرات سلنیوم خالص شده در این مطالعه در شکل ۲ آورده شده است. پیش از این طیف مشابهی توسط Zhang برای نانوذرات سلنیوم تولید شده توسط *سودوموناس آلکالیفیلا* نیز گزارش شده بود [۶]. Oremland و همکاران [۲۴] نیز برای نانوذرات سلنیوم تولید شده توسط باکتری‌های تنفس کننده سلنیوم طیف UV-vis با پهن شدگی در طول موج‌های بزرگ‌تر از ۵۰۰ نانومتر گزارش کرده‌اند که با نانوذرات سلنیوم سنتز شده با روش‌های شیمیایی تفاوت دارد. Yang و همکاران گزارش کردند که پهن شدگی طیف UV-vis می‌تواند به علت ایجاد اتصالات بین نانوذرات سلنیوم باشند [۲۵]. بررسی طیف XRD نانوذرات سلنیوم بیوژنیک سنتز شده در این تحقیق (شکل ۶) نشان داد که این نانوذرات شکل کریستالی خاصی ندارند و آمورف می‌باشند. نتایج مشابه این مطالعه قبلاً توسط Shakibaie و همکاران [۳] گزارش شده بود که در آن مقاله سویه باکتریایی *Bacillus* sp. Msh1 قادر بود نانوذرات سلنیوم تولید نماید که از لحاظ شکل کریستالی بدون شکل و آمورف تشخیص داده شدند. معمولاً هنگام تولید نانوذرات توسط میکروارگانیسم‌ها قرارگیری ترکیبات مختلف روی سطح نانوذرات باعث ایجاد گروه‌های عاملی بر روی سطح نانوذره می‌شود که در طیف FTIR قابل نمایش هستند [۳-۲]. پیش از این وجود گروه‌های هیدروکسیل و کربونیل بر روی سطح نانوذرات سلنیوم بیوسنتز شده توسط باکتری *Bacillus* sp. MSh-1 نشان داده شده بود [۳]. با این‌حال در مطالعه حاضر بر روی سطح نانوذرات سلنیوم تولیدی توسط *استرپتومایسس لاواندوله* FSHJ9 گروه عاملی خاصی روی سطح نانوذرات مشاهده نشد که

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.7.4.5]

دلیل آن مشخص نیست و مستلزم انجام مطالعات بیشتری است. بررسی خاصیت سمیت سلولی نانوذرات سلنیوم بیوژنیک در این مطالعه علیه رده سلولی MCF-7 نشان داد که نانوذرات سلنیوم سمیت کمتری در مقایسه با سدیم سلنیت روی این رده سلولی از خود نشان می‌دهند. چنین الگویی پیش از این در مورد رده سلولی HT-1080 که در مجاورت نانوذرات سلنیوم قرار گرفته بودند نیز مشاهده شده بود [۴] که کاملاً متفاوت از نتایج به‌دست آمده توسط Chen و همکارانش [۲۶] است که نشان دادند سمیت سلولی نانوذرات سلنیوم تولید شده توسط محلول حاوی پلی ساکاریدهای گیاه *Undaria pinnatifida* بر روی رده‌های سلولی MCF-7 و HepG2 در مقایسه با یون‌های Se^{+4} بیشتر است و بر روی سلول‌های طبیعی Hs68 نانوذرات سلنیوم سمیت کمتری دارند. البته پیش از این نیز سمیت سلولی کمتر نانوذرات سلنیوم در مقایسه با سدیم سلنیت نیز گزارش شده بود [۲۵]. به نظر می‌رسد روش ساخت نانوذرات سلنیوم و اندازه ذره‌ای آن‌ها تأثیر به‌سزایی بر میزان سمیت سلولی آن‌ها دارد. مقایسه میزان IC_{50} سدیم سلنیت با نانوذرات سلنیوم نشان می‌دهد که باکتری خاکزی *استرپتومایسس لاواندوله* FSHJ9 توانسته است ترکیب محلول سدیم سلنیت را به نانوذرات نامحلول سلنیوم تبدیل نماید که تقریباً ۲۲ برابر سمیت کمتری روی رده سلولی MCF-7 از خود نشان داد.

ازجمله محدودیت‌های موجود در این طرح می‌توان به محدودیت‌های منابع مالی و عدم تأمین به‌موقع آن‌ها اشاره‌کرد. هم‌چنین در دسترس نبودن برخی دستگاه‌ها جهت آنالیز بیشتر خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات سلنیوم بیوژنیک نیز یکی دیگر از این محدودیت‌ها بود. در نهایت پیشنهاد می‌شود که در ادامه این مطالعه روند و مکانیسم(های) مولکولی درگیر در مسیر سنتز بیولوژیک نانوذرات سلنیوم توسط سویه اکتینومیست معرفی‌شده در این طرح تحقیقاتی بررسی گردد تا بتوان با شناسایی این مسیرهای بیولوژیک و احتمالاً با دستکاری آن‌ها به مقدار تولید بیشتر نانوذرات سلنیوم واجد ویژگی‌های متفاوت پرداخت. هم‌چنین پیشنهاد می‌گردد مطالعات حیوانی برای تعیین سمیت این نانوذرات و میزان کارآیی و خواص بیولوژیک این نانوذرات ارزشمند صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

در مجموع به نظر می‌رسد که اکتینومیست جداسازی شده در این تحقیق توانایی مناسبی جهت تولید نانوذرات سلنیوم کروی شکل را دارد. بررسی‌ها نشان داد که این ذرات اثر سمیت سلولی مناسبی از خود نشان دادند. در ادامه باید مطالعات بیشتری در خصوص مکانیسم و نحوه اثر این نانوذرات بر رده سلولی مورد نظر و سایر رده‌های سلول سرطانی انجام شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق به واسطه گرنت پژوهشی ارائه شده از طرف معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان صورت گرفته است و نویسندگان لازم می‌دانند که از این معاونت کمال قدردانی و تشکر را به عمل بیاورند. هم‌چنین از حمایت ستاد نانو فناوری ایران به دلیل تأمین هزینه برخی آنالیزهای دستگاهی نانوذرات سلنیوم نیز تشکر می‌گردد.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.7.4.5]

References

[1] Faramarzi MA, Sadighi A. Insights into biogenic and chemical production of inorganic nanomaterials and nanostructures. *Adv Colloid Interface Sci* 2013; 189–90 (2): 1–20.

[2] Soflaei S, Dalimi A, Abdoli A, Kamali M, Nasiri V, Shakibaie M, et al. Anti-leishmanial activities of selenium nanoparticles and selenium dioxide on Leishmania infantum. *Comp Clin Pathol* 2014; 23(1): 15–20.

[3] Shakibaie M, Mohazab NS, Mousavi SAA. Antifungal activity of selenium nanoparticles synthesized by *Bacillus* species MSH-1 against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8(9) e26381.

[4] Soflaei S, Dalimi A, Ghaffarifar F, Shakibaie M, Shahverdi AR, Shafiepour M. In vitro antiparasitic and apoptotic effects of antimony sulfide nanoparticles on *Leishmania infantum*. *J Parasitol Res* 2012; 2012: 7 Pages.

[5] Faramarzi MA, Forootanfar H. Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles produced by laccase from *Paraconiothyrium variabile*. *Colloid Surface B* 2011; 87(1): 23–7.

[6] Zhang W, Zhijuan Chen Z, Liu H, Zhang L, Gao P, Li D. Biosynthesis and structural characteristics of selenium nanoparticles by *Pseudomonas alcaliphila*. *Colloid Surface B* 2011; 88(1): 196–201.

[7] Huang Z, Guo BJ, Wong RNS, Jiang Y. Characterization and antioxidant activity of selenium-containing phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. *Food Chem* 2007; 100(3): 1137–43.

[8] Messarah M, Klibet F, Boumendjel A, Abdennour C, Bouzerna N, Boulakoud MS, et al. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic induced liver injury in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2012; 64(3): 167–74.

[9] Shi L, Xun W, Yue W, Zhang C, Ren Y, Shi L, et al. Effect of sodium selenite, Se yeast and nano-elemental selenium on growth performance, Se concentration and antioxidant status in growing male goats. *Small Rumin Res* 2011; 96(1): 49–52.

[10] Kojouri GA, Jahanabadi S, Shakibaie M, Ahadi AM, Shahverdi AR. Effect of selenium supplementation with sodium selenite and

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.7.4.5]

selenium nanoparticles on iron homeostasis and transferrin gene expression in sheep: A preliminary study. *Res Vet Sci* 2012; 93(1): 275–8.

[11] Shakibaie M, Shahverdi AR, Faramarzi MA, Hassanzadeh GR, Rahimi HR, Sabzevari O. Acute and subacute toxicity of novel biogenic selenium nanoparticles in mice. *Pharm Biol* 2013; 51(1): 58–63.

[12] Rashmi Ranjan Mishra RR, Prajapati S, Das J, Dangar TK, Das N, Thatoi H. Reduction of selenite to red elemental selenium by moderately halotolerant *Bacillus megaterium* strains isolated from Bhitarkanika mangrove soil and characterization of reduced product. *Chemosphere* 2011; 84(9): 1231–7.

[13] Zare B, Babaie S, Setayesh N, Shahverdi AR. Isolation and characterization of a fungus for extracellular synthesis of small selenium nanoparticles. *Nanomed J* 2013; 1(1): 13–9.

[14] Ramamurthy CH, Sampath KS, Arunkumar P, Kumar MS, Sujatha V, Premkumar K, et al. Green synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its augmented cytotoxicity with doxorubicin on cancer cells. *Bioprocess Biosyst Eng* 2013; 36(8): 1131–9.

[15] Atta HM, El-Sayed AS, El-Desoukey MA, Hassan M, El-Gazar M. Biochemical studies on the Natamycin antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: Fermentation, extraction and biological activities. *J Saudi Chem Soc* 2015; 19(4): 360–71.

[16] Sastry M, Ahmad A, Islam Khan M, Kumar R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr Sci* 2003; 85(2): 162–70.

[17] Balagurunathan R, Radhakrishnan M, Rajendran RB, Velmurugan D. Biosynthesis of gold nanoparticles by actinomycete *Streptomyces viridogens* strain HM10. *Ind J Biochem Biophys* 2011; 48(5): 331–5.

[18] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed., Baltimore: Williams and Wilkins; 1994. pp. 1805–936.

[19] Sambrook J , Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. New York. pp. 4.67–4.69.

[20] Moshafi MH, Forootanfar H, Ameri A, Shakibaie M, Dehghan-Noudeh G, Razavi M. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. strain

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.7.4.5]

FAS1 isolated from soil. *Pak J Pharm Sci* 2011; 24(3): 269–75.

[21] Freshney RI. Culture of animal cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, 6th Ed. John Wiley & Sons Inc. 2010. Hoboken, NewJersey. pp. 365–81.

[22] Yazdi MH, Mahdavi M, Varastehmoradi B, Faramarzi MA, Shahverdi AR. The immunostimulatory effect of biogenic selenium nanoparticles on the 4T1 breast cancer model: an in vivo study. *Biol Trace Elem Res* 2012; 149(1): 22–8.

[23] Forootanfar H, Amirpour-Rostami S, Jafari M, Forootanfar A, Yousefizadeh Z, Shakibaie M. Microbial-assisted synthesis and evaluation the cytotoxic effect of tellurium nanorods. *Mater Sci Eng C* 2015; 49(1): 183–9.

[24] Oremland RS, Herbel MJ, Blum JS, Langley S, Beveridge TJ, Ajayan PM, et al. Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by se-respiring bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(1): 52–60.

[25] Yang LB, Shen YH, Xie AJ, Liang JJ, Zhang BC. Synthesis of Se nanoparticles by using TSA ion and its photocatalytic application for decolorization of Congo red under UV irradiation. *Mat Res Bull* 2008; 43(3): 572–82.

[26] Chen T, Wong YS, Zheng W, Bai Y, Huang L. Selenium nanoparticles fabricated in *Undaria pinnatifida* polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells. *Colloids Surf B* 2008; 67(1): 26–31.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.7.4.5]

Biosynthesis and Physicochemical Characterization, and Cytotoxic Evaluation of Selenium Nanoparticles Produced by *Streptomyces Lavendulae* FSHJ9 Against MCF-7 Cell Line

M. Shakibaie[1], M. Jafari[2], A. Ameri[3], H.R. Rahimi[4], H. Forootanfar[5]

Received: 16/12/2017 Sent for Revision: 20/05/2018 Received Revised Manuscript: 18/06/2018 Accepted: 03/07/2018

Background and Objectives: Due to the unique physicochemical properties of selenium nanoparticles (Se NPs), identification of microbial strains capable to biosynthesize Se NPs has recently attracted attention. The current study aimed at introducing Se NPs producing actinomycete strain, characterizing Se NPs as well as evaluating its cytotoxic effect against breast cancer cell line (MCF-7).

Materials and Methods: In the present laboratory investigation, first, the Se NPs producing strain was isolated from soil samples. The selected isolate was then identified using morphological and biochemical examinations as well as 16S rDNA sequencing protocol. The UV-visible spectrum, particle-size distribution (PSD) pattern, Fourier-transform infrared (FTIR), and energy-dispersive X-ray (EDX) profiles of the nanostructures as well as transmission electron microscope (TEM) image of Se NPs were determined. In order to evaluate the cytotoxicity of the Se NPs, the MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) based colorimetric protocol was applied where the viability percent was firstly determined and then the related IC_{50} (Half inhibitory concentration) was calculated.

Results: The selected bacterial isolate was identified as *Streptomyces lavendulae* FSHJ9. TEM micrographs of the biogenic Se NPs exhibited spherical nanostructures with the size range of 28–123 nm. The FTIR pattern showed no functional group present on the surface of Se NPs. The obtained results of cytotoxicity revealed that IC_{50} of Se NPs (77.1±42.23 µg/mL) was more than IC_{50} of sodium selenite (3.0±41.53 µg/mL).

Conclusion: The results of the present study showed that *Streptomyces lavendulae* FSHJ9 was able to produce Se NPs. The produced biogenic Se NPs, after performing complementary studies, might be applied as supplement in human food and animal feeding.

Key words: Selenium nanoparticles, Biosynthesis, *Streptomyces*, Cytotoxicity, MCF-7 cell line

Funding: This study was funded by Kerman University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Kerman University of Medical Sciences approved the study (930160).

How to cite this article: Shakibaie M, Jafari M, Ameri A, Rahimi H.R, Forootanfar H. Biosynthesis and Physicochemical Characterization, and Cytotoxic Evaluation of Selenium Nanoparticles Produced by *Streptomyces Lavendulae* FSHJ9 Against MCF-7 Cell Line. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2018; 17 (7): 625-38. [Farsi]

1- Associate Prof., Dept. of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran, ORCID: 0000-0001-8544-6551
2- MSc in Microbiology, Pharmaceutics Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran, ORCID: 0000-0003-4907-269X
3- Assistant Prof., Dept. of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran, ORCID: 0000-0002-0910-1516
4- Assistant Prof., Dept. of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran, ORCID: 0000-0002-9014-802X
5- Associate Prof., Dept. of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran, ORCID: 0000-0003-2072-421X
(Corresponding Author) Tel: (034) 31325238, Fax: (034) 31325003, E-mail: **h_forootanfar@kmu.ac.ir**

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1397.17.7.4.5]