



Biological Journal of Microorganisms
Year 12, No.45, Spring 2023
Received: 2022-02-07
Accepted: 2022-03-13

(Review)

Evaluating the Potential of the Native Yeast *Yarrowia Lipolytica* as a Biological Safe Source for the Synthesis of Selenium Nanoparticle

Morahem Ashengroph*

Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, m.ashengroph@uok.ac.ir

Zeinab Khosravi Shademan

Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, mrhashengroph@gmail.com

Abstract

Introduction: Among metal nanoparticles, elemental selenium nanoparticles (SeNPs) are considered for their low toxicity and vitality in the human body. *Yarrowia lipolytica* yeast, due to its reductase enzymes, has the ability to accumulate and detoxify heavy metals and reduce metal salts to nanoparticles with a narrow size and less dispersion. The aim of the present study was to use *Y. lipolytica* strain MP10 as a biological safe source for the biological synthesis of SeNP.

Materials and Methods: Agar dilution method was used for determining the resistance pattern of *Y. lipolytica* strain MP10 to selenite oxyanion. Synthesis of SeNPs was investigated under resting cell strategy. The effects of selenite oxyanion concentrations and also time incubation on the production rate, size, and dispersity of SeNPs were investigated in the bioconversion reaction. SeNPs produced with *Y. lipolytica* strain MP10 were defined by images obtained from Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis, energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX), X-ray diffraction (XRD), and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR).

Results: The obtained results demonstrated that *Y. lipolytica* strain MP10 showed tolerance to selenite oxyanion up to 10 mM. The yeast strain, at the optimal condition of 4 mM sodium selenite, and after 24 hours of incubation, was able to produce spherical SeNPs with an average

* Corresponding author

2322-5181/ © The Authors.

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[10.22108/BJM.2022.132627.1450](https://doi.org/10.22108/BJM.2022.132627.1450)

size of 70 nm. As the incubation time increased, the dispersion of spherical SeNPs reduced and the average size of the nanoparticles increased to 117 nm after 72 h incubation.

Discussion and Conclusion: The present study is a report on the capability of native yeast *Yarrowia lipolytica* for the successful synthesis of SeNP under resting cell strategy and the improvement in the dispersion and particle size of the nanoparticles in the optimal incubation time.

Key words: Resting Cell, Spectroscopy, Electron Microscope, Selenium Nanoparticle, *Yarrowia Lipolytica* Strain MP10.



زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال دوازدهم، شماره ۴۵، بهار ۱۴۰۲، صفحه ۹۰ - ۷۷
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۲

مقاله مروری

ارزیابی توان مخمر بومی یاروویا لیپولیتیکا به‌عنوان منبع زیستی ایمن در سنتز نانوذره سلنیوم

مراجع آشنگرف*: دانشیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، m.ashengroph@uok.ac.ir
زینب خسروی شادمان: کارشناس ارشد گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، mrhashengroph@gmail.com

چکیده

مقدمه: بین نانوذرات فلزی، نانوذره سلنیوم عنصری سمیت کمی دارد و همچنین، عنصری حیاتی برای بدن انسان است و به همین دلیل اهمیت ویژه‌ای دارد. مخمر یاروویا لیپولیتیکا به دلیل داشتن آنزیم‌های ردوکتازی، توانایی تجمع و سمیت‌زدایی فلزات سنگین و قابلیت کاهش نمک‌های فلزی به نانوذراتی با اندازه باریک و پراکندگی کمتر را دارد. هدف از این پژوهش، استفاده از مخمر بومی یاروویا لیپولیتیکا سویه MP10 به‌عنوان منبع زیستی ایمن برای سنتز نانوذره سلنیوم است.

مواد و روش‌ها: از روش رقت در آگار برای تعیین الگوی مقاومت مخمر یاروویا لیپولیتیکا سویه MP10 نسبت به اکسی‌آنیون سلنیت استفاده شد. بررسی سنتز نانوذرات سلنیوم تحت استراتژی سلول در حال استراحت انجام شد. اثر غلظت‌های اکسی‌آنیون سلنیت بر میزان سنتز نانوذرات سلنیوم و همچنین اثر دوره گرماگذاری بر اندازه و پراکندگی نانوذرات سلنیوم در مخلوط واکنش زیست‌تبدیلی بررسی شدند. خصوصیات نانوذرات سلنیوم سنتز شده، با تصاویر به‌دست آمده از آنالیز میکروسکوپ الکترونی رویی (SEM)، طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس (EDX)، پراش اشعه ایکس (XRD) و طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) تعیین شدند.

نتایج: براساس نتایج به‌دست آمده، مخمر یاروویا لیپولیتیکا سویه MP10 قابلیت تحمل‌پذیری ۱۰ میلی‌مولار اکسی‌آنیون سلنیت را دارد. سویه مخمری مذکور در شرایط بهینه ۴ میلی‌مولار غلظت اکسی‌آنیون سلنیت و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری قابلیت سنتز نانوذرات سلنیوم کروی با میانگین اندازه ۷۰ نانومتر را دارد. با افزایش زمان

* نویسنده مسئول مکاتبات



2322-5181/ © The Authors.

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[10.22108/BJM.2022.132627.1450](https://doi.org/10.22108/BJM.2022.132627.1450)

گرماگذاری، نانوذرات کروی شکل سلنیوم به یکدیگر نزدیک‌تر شده‌اند و از پراکندگی آنها کاسته شده است و میانگین اندازه نانوذرات به ۱۱۷ نانومتر بعد از ۷۲ ساعت افزایش یافت.

بحث و نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر گزارشی از عملکرد مخمر بومی *یاروویا لیپولیتیکا* در سنتز موفقیت‌آمیز نانوذره سلنیوم عنصری تحت استراتژی سلول درحال استراحت و بهبود پراکندگی و اندازه نانوذرات در شرایط بهینه زمان گرماگذاری است.

واژه‌های کلیدی: سلول درحال استراحت، طیف‌سنجی، میکروسکوپ الکترونی، نانوذره سلنیوم، *یاروویا لیپولیتیکا*
سویه MP10

مقدمه

نانوذرات خوشه‌های اتمی‌اند که با توجه به خواص فیزیکوشیمیایی و ترمودینامیکی منحصر به فرد مانند نقطه ذوب، ترشوندگی، هدایت الکتریکی و حرارتی، فعالیت کاتالستی، جذب نور و پراکندگی و در نتیجه، افزایش عملکرد نسبت به نمونه‌های اصلی خود، نقش مهم و برجسته‌ای در پیشرفت علم دارند (۱). معمولاً دامنه اندازه نانوذرات ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است. نانوذرات در مقایسه با ذرات بزرگ‌تر دارای سطح وسیع‌تر، جذب سلولی قوی‌تر، تحرک بیشتر و سمیت کمتر هستند (۲). سلنیوم به‌عنوان سلنوسیستین در محل فعال طیف وسیعی از پروتئین‌ها گنجانیده شده است. در شرایط فیزیولوژیک، سلنیوم در سلنوسیستین تقریباً یونیزه می‌شود و در نتیجه، یک کاتالست زیستی بسیار کارآمد در استرس اکسیداتیو است که آسیب سلولی ناشی از رادیکال‌های آزاد را کاهش و بدن را در برابر بیماری‌های قلبی و برخی سرطان‌ها محافظت می‌کند (۳). نانوذره سلنیوم با توجه به قابلیت زیست‌پذیری خوب، اثر تحویل بالاتر و سمیت کمتر نسبت به سلنیوم آزاد توانایی حمل دارو را به خوبی دارد (۴). همچنین نانوذرات سلنیوم فعالیت ضدسرطانی و ضد میکروبی چشمگیری دارند و پتانسیل بالایی در درمان عفونت‌های

میکروبی و شیمی‌درمانی سرطان نشان می‌دهند (۵). طیف گسترده‌ای از روش‌های فیزیکی و شیمیایی از جمله روش سل-ژل (۶)، روش هیدروترمال (۷)، رسوب بخار شیمیایی (۸)، فرایند سایش لیزری (۹) و روش‌های الکتروشیمیایی (۱۰) برای سنتز نانوذرات از جمله سلنیوم عنصری وجود دارد؛ اما این روش‌ها معایبی از جمله صرف انرژی بالا و همچنین استفاده از مواد شیمیایی خطرناک با قابلیت سرطان‌زایی، سمیت ژنی و سمیت سلولی دارند که همین موارد استفاده از نانوذرات مذکور را برای کاربردهای زیست‌پزشکی به دلیل سمیت، بی‌ثباتی و ناسازگاری با محیط زیست محدود کرده است (۱۱). سنتز زیستی نانوذرات مزایای بی‌شماری از جمله تولید بی‌خطر و سازگار با محیط زیست، مقرون به صرفه بودن و سازگاری زیستی دارد که یک ویژگی مطلوب برای کاربردهای زیست‌پزشکی است. مزیت دیگر روش سنتز زیستی این است که برخلاف روش‌های فیزیکی و شیمیایی به مرحله پوشش‌گذاری یا اتصال ترکیبات زیستی فعال به سطح نانوذره نیاز ندارد (۱۲). به‌تازگی مطالعات انجام شده منابع مختلف زیستی را برای سنتز سبز نانوذرات سلنیوم پیشنهاد داده‌اند؛ از جمله این منابع گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌ها و مخمرها هستند که قادرند فرم‌های سمی را

به فرم‌های کمتر سمی و نانوذرات تبدیل کنند (۱۳). مخمرها توانایی تجمع و سم‌زدایی فلزات سنگین را به دلیل وجود آنزیم‌های مختلف ردوکتاز دارند که نمک‌های فلزی را به نانوذرات فلزی با توزیع اندازه باریک و در نتیجه، پراکندگی کمتر کاهش می‌دهد. همچنین رشد سریع سویه‌های مخمر و استفاده از مواد مغذی ساده، مخمرها را به عنوان ابزاری ایمن و کارآمد برای سنتز زیستی نانوذرات مناسب کرده‌اند (۱۱). گزارشاتی مبنی بر سنتز درون و برون سلولی نانوذرات فلزی توسط مخمرها وجود دارد که می‌توان به سنتز نانوذرات طلا توسط مخمر *یاروویا لیپولیتیکا*^۱ سویه NCIM3589 (۱۴)، سنتز نانوذرات نقره در مخمر *ساکارومایسس سروویزیه*^۲ و مخمر *رودوتورولا گلوئینیس*^۳ (۱۵)، سنتز نانوذرات تیتانیوم توسط مخمر *ساکارومایسس سروویزیه* (۱۶)، سنتز نانوذرات نقره توسط مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* سویه DSM 3286 (۱۷)، سنتز نانوذرات سلنیوم عنصری توسط مخمر *ساکارومایسس سروویزیه* (۱۸) و همچنین سنتز نانوذرات سلنید کادمیوم توسط مخمر *رودوتورولا موسیلاژینوزا*^۴ سویه PA-1 (۱۹) اشاره کرد. محققان در سال‌های اخیر به مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* به عنوان یک مخمر هوازی غیرسمی و غیرمهاجم توجه کرده‌اند. این مخمر به دلیل توانمندی‌های ذاتی بالقوه، کاربردهای فراوانی در فناوری‌های نوین برای تولید متابولیت‌های غذایی و دارویی دارد. این مخمر همچنین ویژگی لازم برای تعامل با فلزات را دارد و به نظر می‌رسد یک کاندید امیدوارکننده در سنتز نانوذرات باشد (۲۰). در این مطالعه قابلیت کاتالیستی سویه بومی مخمری *یاروویا لیپولیتیکا* در احیای زیستی اکسی‌آنیون سلنیت سدیم به نانوذرات سلنیوم عنصری بررسی شد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم، شرایط رشد و نگهداری: عامل زیستی استفاده شده در این پژوهش، مخمر بومی *یاروویا لیپولیتیکا* سویه MP10 جداسازی شده از پساب کارخانه روغن نباتی ناز اصفهان (شماره دسترسی در بانک اطلاعات ژنی JQ327042) بود که از کلکسیون میکروبی گروه علوم زیستی دانشکده علوم پایه دانشگاه کردستان تهیه شد. برای رشد و نگهداری کوتاه مدت مخمر مذکور از محیط کشت YPD آگار (۲۰ گرم در لیتر گلوکز، ۲۰ گرم در لیتر پیتون و ۱۰ گرم در لیتر عصاره مخمر) استفاده شد. برای نگهداری طولانی مدت سویه مخمری مذکور، ابتدا کلنی خالصی از مخمر مذکور در محیط کشت YPD مایع، تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس به میزان ۷۰۰ میکرولیتر از این محیط به میکروتیوب‌های استریل انتقال داده شد و به مقدار ۳۰۰ میکرولیتر گلیسرول استریل به آن اضافه و در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تعیین الگوی مقاومت مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* نسبت

به اکسی‌آنیون سلنیت: از روش رقت در آگار برای تعیین الگوی مقاومت مخمر تست شده نسبت به اکسی‌آنیون سلنیت استفاده شد (۲۱). برای این منظور، به ارلن‌های ۱۲۵ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت YPD آگار ذوب شده، غلظت‌های مشخصی از اکسی‌آنیون سلنیت (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵، ۸، ۸/۵، ۹، ۹/۵، ۱۰، ۱۰/۵ و ۱۱ میلی‌مولار) اضافه و سپس داخل پلیت‌های شیشه‌ای به قطر ۸ سانتی‌متر ریخته شدند. پس از خشک شدن سطح پلیت‌ها، یک کلنی از کشت تازه

و دور شیکر ۲۰۰rpm گرماگذاری شد. وجود نانوذرات سلنیت تشکیل شده در مخلوط واکنش، از طریق مشاهدات چشمی و اسپکتروفتومتری مرئی ماورای بنفش^۵ در طول موج‌های ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر بررسی شد (۱۳).

اثر غلظت‌های مختلف اکسی‌آنیون سلنیت بر سنتز نانوذرات سلنیوم: برای تعیین غلظت مطلوب اکسی‌آنیون سلنیت در سنتز نانوذرات سلنیوم تحت استراتژی سلول درحال استراحت، اثر غلظت‌های مختلف اکسی‌آنیون سلنیت شامل ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌مولار بر نانوذرات سنتزی در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH برابر ۶ و پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری بررسی شد؛ درنهایت، جذب نمونه‌ها در محدودهٔ مربوط به پیک جذب نانوذرات سلنیوم عنصری با روش اسپکتروفتومتری بررسی شد.

اثر دورهٔ گرماگذاری بر اندازه و مورفولوژی نانوذرات سلنیوم: در این آزمایش با در نظر گرفتن غلظت بهینه سلنیت به‌دست‌آمده از مراحل قبل، اثرات دورهٔ گرماگذاری شامل ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر سایز و مورفولوژی نانوذرات سنتزی در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۶ بررسی شدند؛ درنهایت، سایز و مورفولوژی نانوذرات سنتزی از طریق میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شدند.

تعیین ویژگی طیف‌سنجی و میکروسکوپی نانوذرات سلنیوم عنصری: سنتز زیستی نانوذرات سلنیوم تحت استراتژی سلول درحال استراحت مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* سویهٔ MP10، از طریق مشاهدات چشمی (تغییر رنگ محلول واکنش پس از تیمار با سلول درحال استراحت) و طیف‌های جذبی اسپکتروفتومتری مرئی ماورای بنفش^۶

مخمر برداشته و به‌صورت خطی روی محیط‌های کشت ذکر شده، استریک شد و بعد از انکوبه‌شدن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ تا ۹۶ ساعت، پلیت‌های مذکور بررسی شدند.

رسم منحنی رشد مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* سویهٔ

MP10: با هدف رسم منحنی رشد سویهٔ مخمری مذکور، ابتدا کشت تازه از کلنی مخمر روی محیط کشت YPD آگار تهیه شد. سپس یک کلنی تازه مخمری به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌متر محیط کشت YPD مایع، تلقیح و در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. در فواصل زمانی هر ۴ ساعت یک بار از ارلن‌های مذکور نمونه‌گیری و جذب نمونه‌ها از طریق دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد؛ درنهایت، نمودار رشد مخمر توسط دستگاه ایکسل ترسیم شد.

سنتز نانوذرات سلنیوم تحت استراتژی سلول

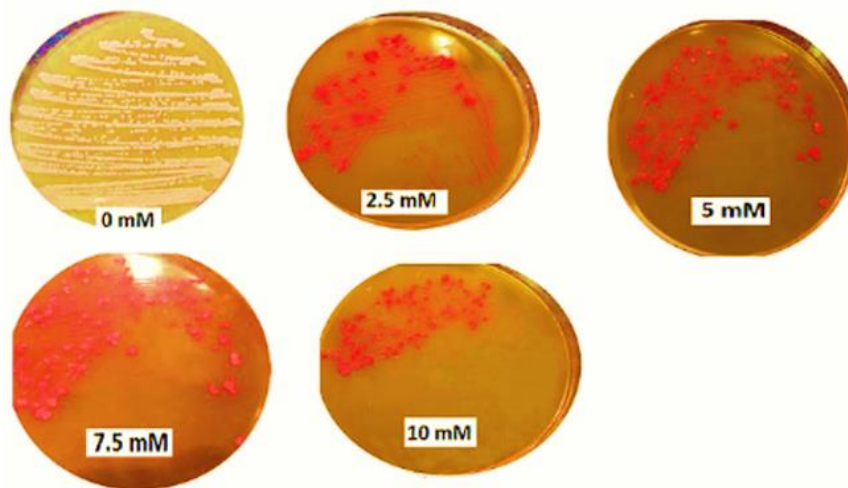
درحال استراحت: یک لوپ کامل از کلنی خالص مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت YPD برات در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد روی شیکر انکوباتوردار (۲۰۰ rpm) به مدت ۴۴ ساعت (رسیدن به انتهای فاز رشد لگاریتمی) گرماگذاری شد. سپس تودهٔ زیستی مخمر به کمک سانتریفیوژ یخچالی (۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) جداسازی شد. پس از سه بار شستشو با آب دیونیزه استریل، ۱۰ گرم در لیتر از تودهٔ زیستی به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه استریل غنی‌شده با ۴ میلی‌مولار اکسی‌آنیون سلنیت استریل اضافه شد. سپس مخلوط واکنش در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد

نتایج

الگوی مقاومت مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* سویه MP10

نسبت به اکسی آنیون سلنیت: با توجه به سمیت بالای اکسی آنیون سلنیت بر سلول‌های مخمری، مقاومت ذاتی این سویه مخمری نسبت اکسی آنیون سلنیت در محیط‌های کشت سنتتیک YPD آگار از طریق روش رقت در آگار تعیین شد که نتایج در شکل ۱ نشان داده شده‌اند. براساس نتایج به دست آمده سویه مخمری مذکور قابلیت تحمل پذیری ۱۰ میلی مولار اکسی آنیون سلنیت را داشت. مطابق شکل، مقاومت به صورت احیای اکسی آنیون سلنیت به سلنیوم عنصری همراه بود که با تشکیل کلنی‌های قرمز رنگ در محیط کشت تشخیص داده شد (۱۲ و ۱۳).

بررسی شد. آنالیزهای میکروسکوپ الکترونی روبشی^۷ مجهز به پرتوایکس پاشنده انرژی^۸ با هدف بررسی سایز، مورفولوژی و آنالیز عنصری انجام شدند. به منظور تعیین گروه‌های عاملی دخیل در احیای زیستی اکسی آنیون سلنیت سدیم و پایداری نانوذرات سنتز شده، از طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز^۹ استفاده شد. آنالیز پراش اشعه ایکس^{۱۰} برای بررسی وجود ساختار کریستالی نانوذرات سنتزی استفاده شد. به منظور جداسازی، خالص سازی و رسوب نانوذرات سلنیوم عنصری، از سانتریفیوژ با دور بالا (سرعت ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۵۰ دقیقه) استفاده شد. نانوذرات رسوبی حاصل پس از چند بار شستشو با آب دیونیزه استریل، در دستگاه فریز درایر به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند (۱۳ و ۱۷).



شکل ۱- الگوی مقاومت مخمر بومی *یاروویا لیپولیتیکا* سویه MP10 نسبت به اکسی آنیون سمی سلنیت از طریق روش رقت در آگار در محیط YPD برات غنی شده با غلظت‌های مختلف اکسی آنیون در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و پس از ۹۶ ساعت گرماگذاری

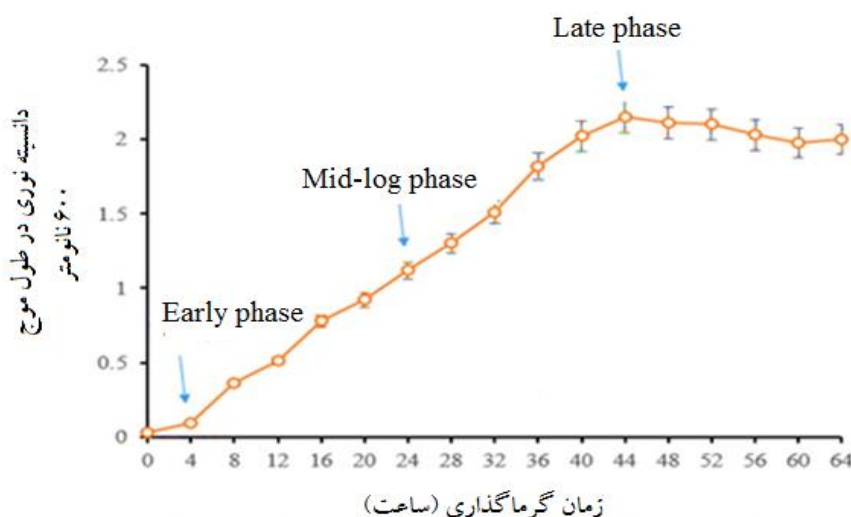
زیستی نانوذرات سلنیوم عنصری، دستیابی به اطلاعاتی درباره فازهای رشد سویه مخمر مدنظر بود تا بتوان زمان ورود سویه مخمری به هر یک از فازهای رشدی از جمله

منحنی رشد مخمر بومی *یاروویا لیپولیتیکا* سویه MP10

به دنبال تعیین الگوی تحمل پذیری مخمر مذکور نسبت به اکسی آنیون سلنیت، نخستین گام در سنتز

شکل ۲ آمده است، مخمر مذکور پس از سپری کردن ۴ ساعت وارد فاز رشدی می‌شود و در ساعت ۴۴ در انتهای فاز رشد لگاریتمی (بیشینه رشد) قرار می‌گیرد.

انتهای فاز رشد لگاریتمی را تشخیص داد؛ زیرا این موضوع در تهیه سلول‌های درحال استراحت و استفاده از آنها به‌عنوان زیست کاتالیست در آزمایشات سنتز نانوذرات بسیار حائز اهمیت است. همان‌گونه که در



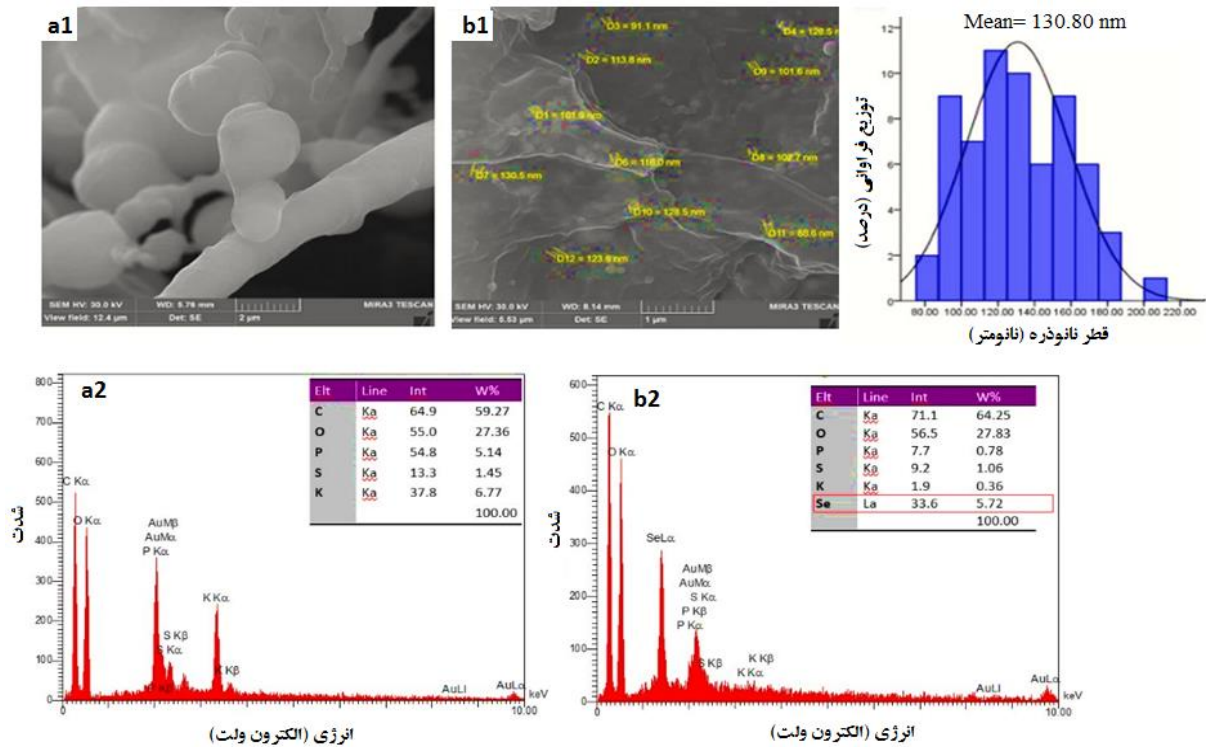
شکل ۲- منحنی رشد مخمر بومی یاروویا لیپولیتیکا سویه MP10 در محیط کشت YPD برات در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و روی شیکر دورانی با دور ۲۰۰ rpm

مرتبط با آنالیزهای مربوط به تأیید نانوذرات سلنیوم عنصری تشکیل شده بر سطح بیومس سلول درحال استراحت مخمر آزمایش شده در شکل ۳ نشان داده شده‌اند. تصاویر FESEM و آنالیز EDX سطح بیومس مخمر در حالت کنترل (سلول درحال استراحت بدون حضور اکسی‌آنیون سلنیت) و نمونه سلول درحال استراحت تیمار شده با اکسی‌آنیون سلنیت در شکل ۳ مشاهده می‌شود. براساس آنالیزهای به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی در نمونه کنترل، اثری از حضور نانوذرات سلنیوم عنصری بر سطح بیومس مخمر دیده نمی‌شود (شکل ۳ قسمت a1)؛ درحالی که در میکروگراف‌های حاصل از بیومس باکتری تیمار شده با اکسی‌آنیون سلنیت، حضور نانوذرات عنصری سلنیوم

نتایج بررسی سنتز نانوذرات سلنیوم عنصری توسط سلول درحال استراحت مخمر یاروویا لیپولیتیکا سویه MP10: براساس مشاهدات چشمی سلول درحال استراحت تیمار نشده با اکسی‌آنیون سلنیت دارای رنگ زرد روشن است؛ درحالی که در نمونه سلول درحال استراحت تیمار شده با اکسی‌آنیون سلنیت سدیم در غلظت ۴ میلی‌مولار بعد از ۷۲ ساعت واکنش زیست تبدیلی به دلیل تشکیل نانوذرات سلنیوم عنصری به قرمز تغییر رنگ داده است. با وجود این، بعد از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها (۵۰۰۰ دور، ۱۰ دقیقه)، رنگ قرمز تشکیل شده فقط بر سطح بیومس بود و در سوپرناتانت مشاهده نشد که نشان‌دهنده تشکیل نانوذرات سلنیوم عنصری بر سطح بیومس مخمری است. نتایج

نانوذرات سلنیوم عنصری بر سطح زیست توده مخمری مشاهده شد (شکل ۳ قسمت b2). در نمونه کنترل اثری از حضور سلنیوم عنصری بر سطح بیومس مشاهده نشد (شکل ۳ قسمت a2).

عنصری در سطح بیومس مخمر کاملاً مشهود است و نانوذرات با میانگین اندازه ۱۳۰/۸ نانومتر سنتز شده‌اند (شکل ۳ قسمت a2). با هدف مشخص کردن ترکیب عنصری نانوذرات سنتزی، آنالیز EDX انجام شد. براساس نتایج به دست آمده در نمونه تیمار شده، حضور



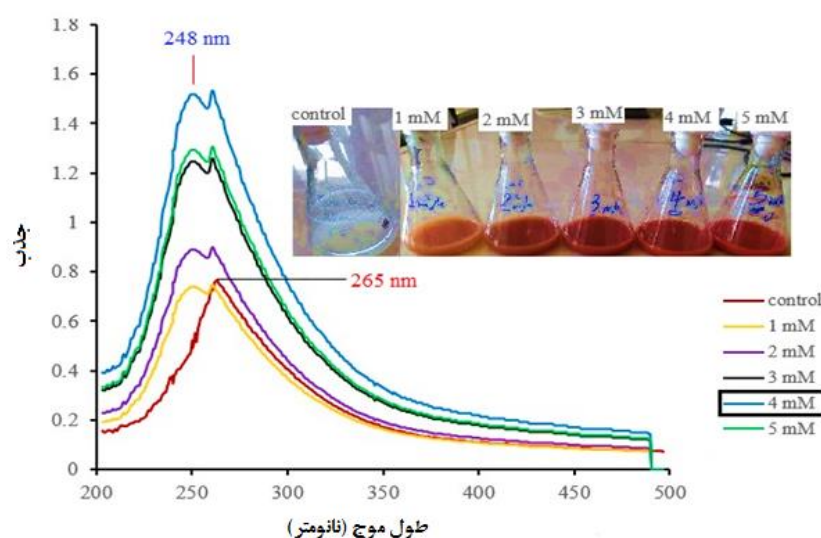
شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (a1 و b1) مجهز به پرتو ایکس پاشنده انرژی (a2 و b2) که نشان دهنده سنتز نانوذرات سلنیوم عنصری بر سطح بیومس سلول درحال استراحت مخمر مورد آزمایش است.

سنتز نانوذرات سلنیوم عنصری جدا شده از سطح زیست توده مخمر توسط آنالیزهای چشمی و طیف سنجی اسپکتروفوتومتری بررسی شد. همان گونه که در شکل ۴ مشاهده می شود، مخلوط واکنش حاوی مخمر تیمار شده با سلنیت سدیم در طول گرما گذاری ۷۲ ساعت و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد یک تغییر رنگ وابسته به فاکتور غلظت داشت. در این مدت سوسپانسیون سلولی قادر به احیای اکسی آنیون سلنیت

نتایج اثر غلظت اولیه اکسی آنیون سلنیت بر نرخ سنتز نانوذرات سلنیوم عنصری جدا شده از سطح بیومس مخمر یاروویا لیپولیتیکا سویه MP10: به منظور مطالعه بهتر نانوذرات سلنیوم سنتزی بر سطح بیومس مخمر، با استفاده از چندین بار شستشو با آب دومین استریل و سانتریفیوژ کردن (۶۰۰۰ دور، ۱۰ دقیقه)، نانوذرات مذکور از سطح توده مخمری قابل تفکیک خواهند بود؛ بنابراین، اثر غلظت های مختلف سلنیت سدیم بر راندمان

شدت پیک کاسته شد. در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌مولار شدت رنگ و پیک نسب به غلظت ۴ میلی‌مولار بسیار پایین‌تر بود که شاید به دلیل غلظت کمتر عوامل زیستی دخیل در احیای اکسی‌آیون سلنیت به نانوذرات سلنیوم عنصری باشد (۱۲).

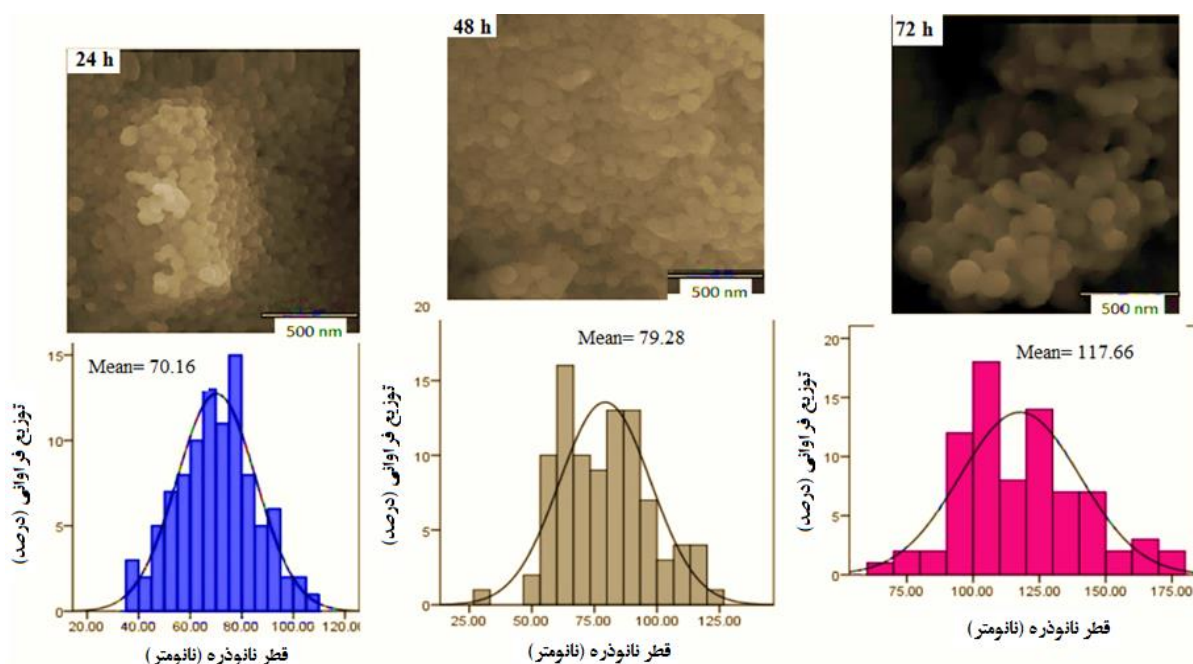
سمی به نانوذرات سلنیوم با پیک جذب ۲۴۸ نانومتر بود. در محیط کنترل تغییر رنگ و پیک جذبی مرتبط با نانوذرات سلنیوم عنصری مشاهده نشد. شدت رنگ و پیک جذبی نانوذرات سلنیوم در پاسخ به فاکتور غلظت افزایش یافت و در غلظت‌های بالاتر از ۴ میلی‌مولار از



شکل ۴- نمودار مشاهدات چشمی (تغییر رنگ) و آنالیزهای اسپکتروفوتومتری با هدف تعیین بهترین غلظت اکسی‌آیون سلنیت سدیم برای بیوسنتز نانوذرات سلنیوم عنصری تحت استراتژی سلول در حال استراحت مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* سویه MP10

رویشی نشان دادند در زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت نانوذرات کروی شکل با میانگین اندازه ۷۰ نانومتر سنتز شده‌اند. نانوذرات سلنیوم با تراکم بسیار بیشتر، کروی شکل و با میانگین اندازه ۷۹ نانومتر در زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت سنتز شدند. در زمان‌های انکوباسیون ۷۲ ساعت نانوذرات کروی شکل به یکدیگر نزدیک‌تر شده‌اند و از پراکندگی آنها کاسته شده است و میانگین اندازه ۱۱۷ نانومتر حاصل شد (شکل ۵).

نتایج اثر زمان انکوباسیون بر اندازه، مورفولوژی و پراکندگی نانوذرات سلنیوم عنصری جداشده از سطح بیوسنتز مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* سویه MP10: به منظور بررسی تأثیر دوره گرماگذاری بر اندازه، مورفولوژی و پراکندگی نانوذرات سلنیوم عنصری، با در نظر گرفتن غلظت بهینه یون سدیم سلنیت (۴ میلی‌مولار)، دمای بهینه رشد ۳۰ درجه سانتی‌گراد و pH بهینه رشد برابر ۶/۵، اثر زمان گرماگذاری شامل ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت آزمایش شد. تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی

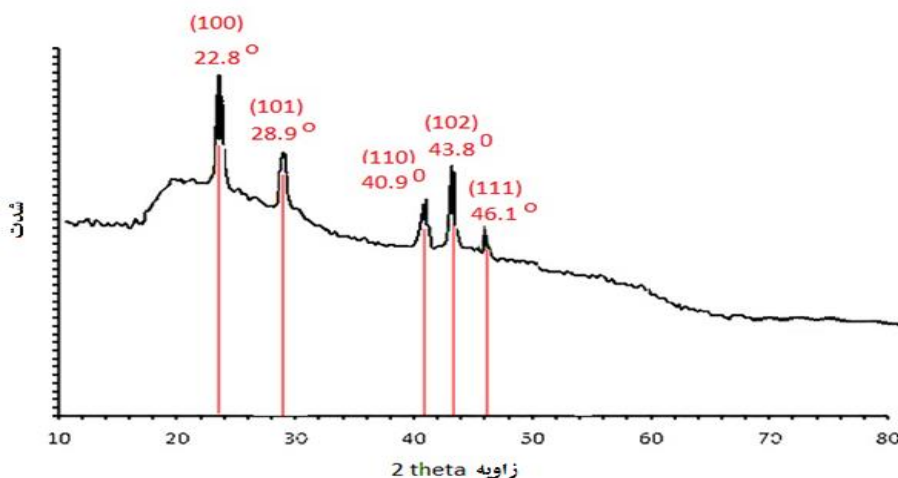


شکل ۵- اثر زمان گرماگذاری بر اندازه، مورفولوژی و پراکندگی نانوذرات سلنیوم عنصری جداشده از سطح بیومس مخمر یاروویا لیپولیتیکا سوئیه MP10 در محیط زیست تبدیلی حاوی ۴ میلی مولار اکسی آنیون سلنیت در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۲۰۰ rpm

بلوری ۱۰۰، ۱۰۱، ۱۱۰، ۱۰۲ و ۱۱۱ هستند که منطبق بر صفحات و زوایای پرش آنها با نمونه استاندارد نانوذرات سلنیوم عنصری اند (JCPDS card No. 06-0362)؛ این موضوع، کریستالی بودن نانوذرات سلنیوم عنصری سنتز شده توسط مخمر بومی مذکور را تأیید کرد (۲۲).

آنالیز XRD نانوذرات سلنیوم سنتز شده: نتایج آنالیز

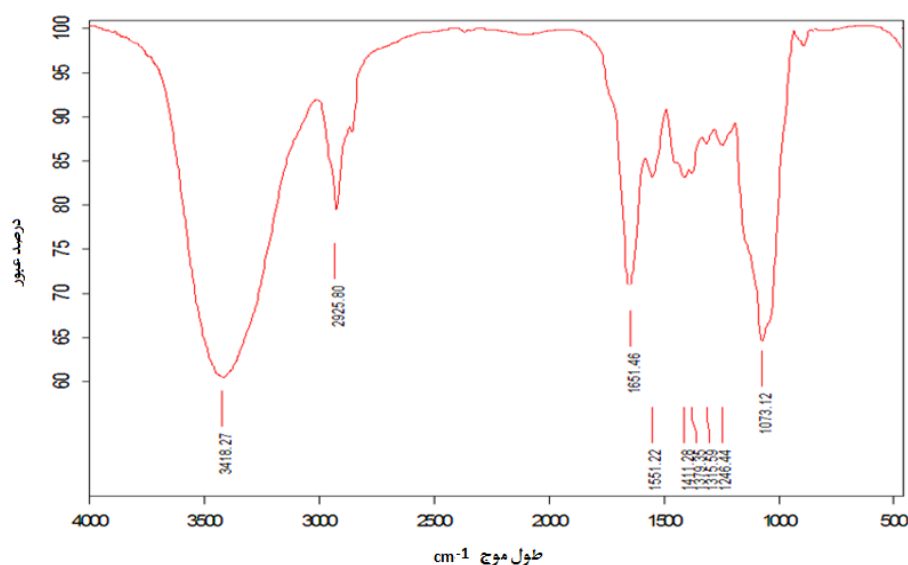
پراش اشعه ایکس نانوذرات سلنیوم عنصری سنتزی توسط سلول در حال استراحت مخمر یاروویا لیپولیتیکا سوئیه MP10 در شکل ۶ نشان داده شده اند. نتایج آزمون XRD نشان دهنده پیک‌های قابل رؤیت در صفحات



شکل ۶- الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) نانوذرات سلنیوم عنصری سنتز شده تحت استراتژی سلول در حال استراحت مخمر یاروویا لیپولیتیکا سوئیه MP10

است (۲۳). پیک ظاهر شده در محدوده ۲۹۲۵ مربوط به گروه C-H کششی موجود در ترکیبات آلی است. پیک ظاهر شده در محدوده ۱۶۵۱ نشان‌دهنده ارتعاش کششی پیوند کربونیل استر (C=O) رایج در لیپیدها است که در سنتز نانوذرات سلنیوم نقش داشته‌اند. گفتنی است به‌تازگی لیپیدها بخش مهمی از عوامل پوشاننده زیستی نانوذرات سلنیوم سنتز شده به روش میکروبی محسوب می‌شوند (۲۴). به‌طور کلی براساس نتایج به‌دست آمده پروتئین‌ها و لیپیدها عوامل پوشاننده و پایدارکننده این نانوذرات محسوب می‌شوند.

آنالیز طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR) نانوذرات سلنیوم سنتز شده توسط مخمر یاروویا لیپولیتیکا سویه MP10: طیف FTIR نانوذرات سلنیوم عنصری سنتز شده بر سطح بیومس مخمری پس از جداسازی و تخلیص در شکل ۷ نشان داده شده است. طیف FTIR بیان‌کننده وجود گروه‌های عملکردی پوشاننده و احیاکننده روی سطح نانوذرات است. پیک پهن کشیده شده در محدوده ۳۴۱۸ معرف حضور ارتعاش کششی گروه هیدروکسیل و گروه N-H (آمید A در پروتئین‌ها) است که نشان‌دهنده برقراری ارتباطی ضعیف بین مولکول‌های زیستی مخمر و سدیم سلنیت به‌منظور تشکیل نانوذرات



شکل ۷- آنالیز FTIR نانوذرات سلنیوم عنصری سنتز شده تحت استراژی سلول درحال استراحت مخمر یاروویا لیپولیتیکا سویه MP10.

است (۲۵). نوع میکروارگانیسم و آنزیم‌های دخیل در فرایند احیا تعیین‌کننده تولید داخل سلولی یا خارج سلولی نانوذرات است. در سنتز درون سلولی نانوذرات، دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها نقش مهمی بر عهده دارد. در روش سنتز درون سلولی تعادل الکترواستاتیکی بین بارهای مثبت یون فلزی و بار منفی

بحث و نتیجه‌گیری

میکروارگانیسم‌ها پتانسیل بالایی برای تولید نانوذرات دارند و باعث احیای زیستی پیش‌سازهای فلزی به نانوذرات سازگار با محیط زیست می‌شوند. همچنین نانوذره تولید شده پایدار، ارزان‌قیمت و عاری از هرگونه آلودگی شیمیایی و مناسب برای تولید انبوه

به طور مستقیم بر خواص آنها تأثیر می گذارد؛ این خواص شامل ویژگی های شیمیایی، نوری و الکترونیکی منحصر به فردی است. در سنتز نانومواد به روش زیستی میزان اندازه و پراکندگی نانوذرات تولید شده چالش برانگیز است که این موضوع را با توجه به نوع میکروارگانیسم و محیط رشد و شرایط سنتز تا حدودی می توان کنترل کرد؛ بین میکروارگانیسم ها مخمر توانایی خوبی در تولید نانوذره با اندازه مناسب دارد. به همین دلیل، سنتز زیستی نانوذرات سلنیوم تحت استراتژی سلول های در حال استراحت توسط مخمر یاروویا لیپولیتیکا سویه MP10 بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان دادند سویه مخمری استفاده شده در شرایط بهینه در غلظت ۴ میلی مولار اکسی آنیون سلنیت سدیم و پس از ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری و سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ نانوذرات کرووی بر سطح زیست توده مخمری تولید کرده است که به نظر می رسد بیومس بستری مناسب برای تجمع نانوذرات باشد. فاکتورهای مختلفی در فرایند تولید نانوذرات به روش سنتز زیستی مؤثر هستند که بر اندازه و شکل نانوذرات تولید شده تأثیر می گذارند و محققان بر این مطلب توافق نظر دارند؛ از جمله این فاکتورها می توان به غلظت اکسی آنیون سلنیت، دما، pH، دور شیکر و زمان انکوباسیون اشاره کرد. غلظت یکی از عوامل مؤثر است که در این پژوهش برای دستیابی به بهترین غلظت یون سلنیوم، با ثابت نگه داشتن عوامل دیگر، غلظت های مختلفی از اکسی آنیون سلنیت سدیم بررسی شدند که سویه مخمری بهترین نتیجه را در غلظت ۴ میلی مولار ارائه داد. همچنین گزارشی مبنی بر تأثیر گذاری زمان انکوباسیون بر میزان نانوذره تولید شده وجود دارد که بر اندازه و شکل نانوذرات تأثیر می گذارد. ناضرالدین^{۱۸} و همکاران در آزمایشات

دیواره سلولی برقرار می شود و آنزیم های موجود در دیواره سلولی باعث احیای یون فلزی به نانوذره فلزی می شوند (۲۶). احیای سلنیت به فرم سلنیوم عنصری به صورت برون و درون سلولی در طیف وسیعی از باکتری ها و برخی سویه های مخمری گزارش شده است. نانوذرات سلنیوم کرووی با میانگین اندازه ۹۰-۷۰ نانومتر با عصاره عاری از سلول مخمر مگنوزیومایسس/اینگنز^{۱۱} سویه LH-F1 سنتز شدند (۲۷). در مطالعه زاو^{۱۲} و همکاران، باکتری میله ای گرم منفی با نام راهنیلا اکوالیتیس^{۱۳} سویه HX2 با توانایی تحمل پذیری نسبت به غلظت های بالای فرم های ارگانیک و معدنی سلنیوم، قادر به سنتز نانوذرات سلنیوم کرووی با اندازه ۳۵۰-۶۰ نانومتر بود (۲۸).

مشرقی^{۱۴} و شعبی^{۱۵} نانوذره سلنیوم کرووی با اندازه متوسط ۹۹ نانومتر را به روش سنتز برون سلولی و با استفاده از زیست توده باکتری اتروکوکوس فکالیس^{۱۶} تولید کردند (۲۹). زارع و همکاران توانستند نانوذره سلنیوم را با استفاده از قارچ آسپرژیلوس ترئوس^{۱۷} به روش سنتز خارج سلولی تولید کنند. نانوذرات سلنیوم تولید شده، نانوذرات کرووی قرمز رنگ با اندازه قطر ۴۷ نانومتر بودند که روش مناسبی برای تولید نانوذرات سلنیوم با اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر است (۳۰). در پژوهش حاضر توانایی مخمر یاروویا لیپولیتیکا MP10 برای احیای زیستی سلنیت سدیم به نانوذرات سلنیوم بررسی شد. مخمرها پتانسیل بالایی در جذب و تجمع یون های فلزی سمی دارند. مزایایی که کار با مخمرها را جذاب کرده است شامل سادگی کار آزمایشگاهی، سهولت در دسترسی به مقادیر بالایی از بیومس، سطح بالای آنزیم های اکسیدوردوکتازی و استفاده مخمرها از مواد مغذی ساده است (۱۱ و ۲۰). اندازه نانوذرات

References

- (1) Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9(1), 1050–1074.
- (2) Amen, R., Mukhtar, A., Saqib, S., Ullah, S., Al-Sehemi, A. G., Mehdi, S. H. E., ... & Bustam, M. A. (2021). History and development of nanomaterials. In: *Nanomaterials: Synthesis, Characterization, Hazards and Safety*, 1–14.
- (3) Zoidis, E., Seremelis, I., Kontopoulos, N., & Danezis, G. P. (2018). Selenium-dependent antioxidant enzymes: Actions and properties of selenoproteins. *Antioxidants (Basel)*, 7(5), 66.
- (4) Maiyo, F., & Singh, M. (2017). Selenium nanoparticles: potential in cancer gene and drug delivery. *Nanomedicine*, 12(9), 1075–1089.
- (5) Kumar, A., & Prasad, K. S. (2021). Role of nano-selenium in health and environment. *Journal of Biotechnology*, 325, 152–163.
- (6) Riccò, R., Nizzero, S., Penna, E., Meneghello, A., Cretaiò, E., & Enrichi, F. (2018). Ultra-small dye-doped silica nanoparticles via modified sol-gel technique. *Journal of Nanoparticle Research*, 20(5), 1-9.
- (7) Li, M., Gu, L., Li, T., Hao, S., Tan, F., Chen, D., ... & Yang, Z. (2020). TiO₂-seeded hydrothermal growth of spherical batio₃ nanocrystals for capacitor energy-storage application. *Crystals*, 10(3), 202.
- (8) Janjua, M. R. S. A. (2019). Synthesis of Co₃O₄ nano aggregates by co-precipitation method and its catalytic and fuel additive applications. *Journal of Open Chemistry*, 17(1), 865–873.
- (9) Nee, C. H., Yap, S. L., Tou, T. Y., Chang, H. C., & Yap, S. S. (2016). Direct synthesis of nanodiamonds by femtosecond laser irradiation of ethanol. *Journal of Scientific Reports*, 6(1), 1-18.

خود تفاوت اندازه نانوذرات نقره سنتز شده را توسط عصاره دانه گشنیز^{۱۹} در ۱ تا ۲ ساعت نسبت به ۲ تا ۴ روز بررسی کردند (۳۱). دوویدی^{۲۰} و گوپال^{۲۱} گزارش دادند در سنتز زیستی نانوذرات نقره و طلا با استفاده از گیاه سلمک^{۲۲} با گذشت ۱۵ دقیقه از شروع واکنش تولید می‌شوند که با گذشت زمان بیشتر اندازه و شکل نانوذرات تولید شده تغییر می‌کنند (۳۲). سوپه مخمری مذکور پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری قابلیت سنتز نانوذرات سلنیوم کروی با میانگین اندازه ۷۰ نانومتر را داشت. با افزایش زمان گرماگذاری، نانوذرات کروی شکل سلنیوم به یکدیگر نزدیک‌تر شدند و از پراکندگی آنها کاسته شد و میانگین اندازه نانوذرات به ۱۱۷ نانومتر بعد از ۷۲ ساعت افزایش یافت.

نانوذرات سلنیوم به دلیل سمیت کمتر در مقایسه با فرم‌های معدنی و ارگانیک سلنیوم و همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدتوموری و کاربرد آنها به‌عنوان عامل ضد میکروبی در صنایع پزشکی و غذایی درخور توجه‌اند. سنتز سبز نانوذرات سلنیوم با استفاده از مخمرها به‌عنوان جایگزینی برای سنتز فیزیکی‌شیمیایی، در مسیری سازگار با محیط زیست، از نقطه نظر کاربردهای پزشکی و غذایی مفید است. موضوع چالش برانگیز در این روش پراکندگی و اندازه نانوذرات است که با بهینه‌سازی شرایط می‌توان این چالش را تا حدودی برطرف کرد و نانوذراتی در مقیاس گسترده تولید کرد. پژوهش حاضر گزارشی از عملکرد مخمر بومی یاروویا لیپولیتیکا در سنتز موفقیت آمیز نانوذرة سلنیوم عنصری تحت استراتژی سلول در حال استراحت و بهبود پراکندگی و اندازه نانوذرات در شرایط بهینه زمان گرماگذاری بود.

- (10) Khaydarov, R. A., Khaydarov, R. R., Gapurova, O., Estrin, Y., & Scheper, T. (2009). Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(5), 1193–1200.
- (11) Zambonino, M. C., Quizhpe, E. M., Jaramillo, F. E., Rahman, A., Santiago Vispo, N., Jeffryes C., & Dahoumane, S. A. (2021). Green synthesis of selenium and tellurium nanoparticles: Current trends, biological properties and biomedical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 989.
- (12) Wadhvani, S. A., Gorain, M., Banerjee, P., Shedbalkar, U. U., Singh, R., Kundu, G. C., & Chopade, B. A. (2017). Green synthesis of selenium nanoparticles using *Acinetobacter* sp. SW30. optimization, characterization and its anticancer activity in breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 6841–6855.
- (13) Ashengroph, M., & Hosseini, S. R. (2021). A newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SRB04 for the synthesis of selenium nanoparticles with potential antibacterial properties. *International Journal of Microbiology*, 24(1), 103–114.
- (14) Mourato, A., Gadanho, M., Lino, A. R., & Tenreiro, R. (2011). Biosynthesis of crystalline silver and gold nanoparticles by extremophilic yeasts. *Journal of Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2011, 546074.
- (15) Zahran, M. K., Mohamed, A. A., Mohamed, F. M., & El-Rafie, M. H. (2013). Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles by some yeast fungi. *Egyptian Journal of Chemistry*, 56(1), 91–110.
- (16) Peiris, M., Gunasekara, T., Jayaweera, P. M., & Fernando S. (2018). TiO₂ nanoparticles from baker's yeast: A potent antimicrobial. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(10), 1664–1670.
- (17) 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. *Journal of Process Biochemistry*, 94, 319–328.
- (18) Faramarzi, S., Anzabi, Y., & Jafarizadeh-Malmiri, H. (2020). Nanobiotechnology approach in intracellular selenium nanoparticle synthesis using *Saccharomyces cerevisiae* fabrication and characterization. *Journal of Archives of Microbiology*, 202(5), 1203–1209.
- (19) Cao, K., Chen, M. M., Chang, F. Y., Cheng, Y. Y., Tian, L. J., Li, F., ... & Wu, C. (2020). The biosynthesis of cadmium selenide quantum dots by *Rhodotorula mucilaginosa* PA-1 for photocatalysis. *Biochemical Engineering Journal*, 156, 107497.
- (20) Darvishi, F., Ariana, M., Marella, E. R., & Borodina, I. (2018). Advances in synthetic biology of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for producing non-native chemicals. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(14), 5925–5938.
- (21) 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 and WJTruant, J. (Eds.) *Manual of clinical microbiology*. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 453–458.
- (22) Senthil kumaran, C. K., Agilan, S., Velauthapillai, D., Muthukumarasamy, N., Thambidurai, M., Senthil, T. S., & Balasundaraprabhu, R. (2011). Synthesis and characterization of selenium nanowires. *Journal of International Scholarly Research Notices*, 2011, 4.
- (23) Tugarova, A. V., Mamchenkova, P. V., Dyatlova, Y. A., & Kamnev, A. A. (2018). FTIR and Raman spectroscopic studies of selenium nanoparticles synthesised by the bacterium *Azospirillum thiophilum*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 192, 458–463.

- (24) Gonzalez-Gil, G., Lens, P. N., & Saikaly, P. E. (2016). Selenite reduction by anaerobic microbial aggregates: Microbial community structure, and proteins associated to the produced selenium spheres. *Journal of Frontiers in Microbiology*, 7, 571.
- (25) Devatha, C. P., & Thalla, A. K. (2018). Green synthesis of nanomaterials. In *Synthesis of Inorganic Nanomaterials*, 169-184.
- (26) Niknejad, F., Nabili, M., Ghazvini, R. D., & Moazeni, M. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles: Advantages of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Journal of Current Medical Mycology*, 1(3), 17-24.
- (27) Lian, S., Diko, C. S., Yan, Y., Li, Z., Zhang, H., Ma, Q., & Qu, Y. (2019). Characterization of biogenic selenium nanoparticles derived from cell-free extracts of a novel yeast *Magnusiomyces ingens*. *3 Biotech*, 9(6), 1-8.
- (28) Zhu, Y., Ren, B., Li, H., Lin, Z., Bañuelos, G., Li, L., Zhao, G., & Guo, Y. (2018). Biosynthesis of selenium nanoparticles and effects of selenite, selenate, and selenomethionine on cell growth and morphology in *Rahnella aquatilis* HX2. *Journal of Applied and Microbiology and Biotechnology*, 102(14), 6191-6205.
- (29) Shoeibi, S., & Mashreghi, M. (2017). Biosynthesis of selenium nanoparticles using *Enterococcus faecalis* and evaluation of their antibacterial activities. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 39, 135-139.
- (30) Zare, B., Babaie, Sh., Setayesh, N., & Shahverdi, A. R. (2013). Isolation and characterization of a fungus for extracellular synthesis of small selenium nanoparticles. *Nanomedicine Journal*, 1(1), 13-19.
- (31) Nazeruddin, G. M., Prasad, N. R., Prasad, S. R., Shaikh, Y. I., Waghmare, S. R., & Adhyapak, P. (2014). *Coriandrum sativum* seed extract assisted in situ green synthesis of silver nanoparticle and its anti-microbial activity. *Journal of Industrial Crops and Products*, 60, 212-216.
- (32) Dwivedi, A. D., & Gopal, K. (2010). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 369(1-3), 27-33.

¹- *Yarrowia lipolyaztica*

²- *Saccharomyces cerevisiae*

³- *Rhodotorula glutinis*

⁴- *Rhodotorula mucilaginosa*

⁵- UV-Visible spectrophotometer

⁶- UV-Vis spectrophotometer (Specord 210, Germany)

⁷- *Field emission* scanning electron microscopy (FESEM; TESCAN Mira 3-LMu, Czech Republic)

⁸- *Energy-dispersive X-ray* spectroscopy (EDX)

⁹- *Fourier transform infrared* spectroscopy (FTIR, Bruker Vector 22)

¹⁰- X-ray diffraction (XRD, Philips X'Pert-MPD)

¹¹- *Magnusiomyces ingens*

¹²- Zhu

¹³- *Rahnella aquatilis*

¹⁴- Mashreghi

¹⁵- Shoeibi

¹⁶- *Enterococcus faecalis*

¹⁷- *Aspergillus terreus*

¹⁸- Nazeruddin

¹⁹- *Coriandrum sativum*

²⁰- Amarendra Dhar Dwivedi

²¹- Krishna Gopal

²²- *Chenopodium*