

سنتز نانوذرات نقره با روش احیاء شیمیایی و روش بیوسنتز و بررسی اثرات ضد باکتری آن‌ها

مهناز محتشمی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران. mahnazmohtashami@gmail.com

*دکتر سعید سپهری سرشت: متخصص بیوتکنولوژی دامپزشکی، بخش دام، طیور و آبزیان، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران (مؤلف مسئول). s.sephriseresht@gmail.com

دکتر اسماعیل اصلی: استادیار و متخصص فارماکولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران. easli62@yahoo.com

دکتر محمد علی برومند: دانشیار و متخصص پاتولوژی، بخش مولکولار پاتولوژی، بیمارستان مرکز قلب تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. maboroumand@yahoo.com

احمد قاسمی: کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. ghasemi.a51@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: نانوذرات نقره به دلیل خاصیت ضد عفونی‌کنندگی کاربردهای وسیعی در زمینه‌ی پزشکی و درمان عفونت‌های باکتریایی دارند. سنتز شیمیایی، بیوسنتز و خواص آنتی‌باکتریال نانوذرات نقره قبلاً مورد مطالعه قرار گرفته، اما با توجه به هزینه‌ی بالای سنتز شیمیایی آن‌ها و افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، بررسی بیوسنتز نانوذرات نقره و نیز تاثیر آن‌ها بر سویه‌های بالینی و استاندارد باکتری‌های مختلف دارای اهمیت بسزایی می‌باشد. **روش کار:** نانوذرات نقره به دو روش احیاء شیمیایی و بیوسنتز با استفاده از سوپرناتانت باکتریال سنتز شدند و اندازه و توزیع اندازه‌ی ذرات با میکروسکوپ الکترونی عبوری مورد بررسی قرار گرفت. سپس نانوذرات سنتز شده به روش احیاء شیمیایی به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی، به محیط کشت TSB حاوی سویه‌های مختلف باکتری‌ها درون لوله‌ی آزمایش اضافه شدند و کمترین غلظت مهارکنندگی آن‌ها محاسبه شد. **یافته‌ها:** نانوذرات سنتز شده به روش احیاء شیمیایی مونودیسپرسیتی بالایی داشتند، در حالی که روش بیوسنتز، نانوذراتی با پلی‌دیسپرسیتی بالا سنتز نمود. نانوقره‌ی کوچک‌تر حاصل از احیاء شیمیایی، فعالیت خوبی بر ضد باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت داشت و در غلظت ۰/۲ میلی‌مولار از رشد تمام باکتری‌ها جلوگیری کرد، اما نانوذرات درشت‌تر فعالیت بسیار کمتری داشتند. **نتیجه‌گیری:** روش بیوسنتز با استفاده از باکتری‌ها روشی کم هزینه است، اما نانوذرات پلی‌دیسپرس ایجاد می‌کند. نانوذرات نقره با توجه به فعالیت خوب آنتی‌باکتریال، می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشند، اما باید توجه شود که میزان مقاومت سویه‌های بالینی در مقایسه با سویه‌های استاندارد بالاتر می‌باشد و باید پیش از تجویز نانوذرات، مقاومت باکتری‌ها نسبت به آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: نانوذرات نقره، اثرات آنتی‌باکتریال، میکروسکوپ الکترونی عبوری، سوپرناتانت باکتریال.

مقدمه

کم و با توسعه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی ضد باکتری، استفاده از آن محدود شده بود. با این حال، با توسعه‌ی تولید AgNPs استفاده‌ی مجدد از نقره به عنوان ماده‌ی باکتری‌کش قدرتمند رونق یافته است (۶).

برای سنتز نانوذرات، روش‌های شیمیایی متفاوتی عرضه شده‌اند، از جمله روش میکروامولسیون (۷)، سنتز با کمک امواج ریز موج (میکرو ویو) (۸)، روش استفاده از الگو (Template) (۹)، روش‌های احیاء شیمیایی (۱۰)، احیاء الکتروشیمیایی (۱۱)، احیاء با روش پرتوتابی (۱۲)، احیاء شیمیایی در محلول آبی (۱۳)، احیاء

نانوذرات فلزی در زمینه‌های مختلف علمی و صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱ و ۲). در این میان، نانوذرات نقره (AgNPs) به دلیل رسانایی خوب، پایداری شیمیایی، خواص کاتالیتیک، فتونیک و اپتوالکترونیک بسیار مورد توجه بوده‌اند (۳). در زمینه‌ی تحقیقات مرتبط با علوم زیست‌شناسی، AgNPs به عنوان مواد باکتری‌کش استفاده شده‌اند، البته اخیراً در ردیابی DNA نیز کاربرد پیدا کرده‌اند (۴ و ۵). نقره از دیرباز به عنوان یک ماده‌ی ضد عفونی‌کننده مورد توجه بوده است، اما به دلیل خاصیت باکتری‌کشی

اخیراً کلاوس و همکاران (۲۳) تولید نانوذرات نقره‌ی شش ضلعی و نیز کروی را توسط باکتری *Sodomonas/stutzeri* AG۲۵۹ ثابت کرده‌اند. در این مطالعه علاوه بر استفاده از روش احیاء شیمیایی جهت سنتز نانوقره، از سوپرناتانت شش باکتری استاندارد نیز جهت تولید آن‌ها استفاده و نتایج سنتز و خواص آنتی‌میکروبی آن‌ها مقایسه شده است.

روش کار

سنتز نانوذرات کوچک‌تر نقره با روش احیاء شیمیایی: ۳۰ میلی لیتر آب مقطر استریل درون ارلن استریل که داخل بشر حاوی یخ بود ریخته شد. ۶۷ میکرولیتر از محلول سدیم بوروهیدرات ۲ میلی مولار به آن اضافه گردید و ۱ میلی لیتر محلول $AgNO_3$ ۲ میلی مولار به صورت قطره قطره اضافه شد تا محلول زرد رنگ به دست آید. ارلن از روی یخ برداشته شد و محتویات آن به صورت قطره قطره به ارلن حاوی ۲۰ میلی لیتر محلول تری‌سدیم سیترات ۲ میلی مولار که روی شیکر با دور ۱۵۰ RPM قرار گرفته بود، اضافه گردید. محلول نهایی درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتر تقسیم و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ G سانتریفیوژ گردید. جهت حذف آلودگی‌ها و مواد اضافی واکنش، سه بار شستشوی رسوب نانوذرات با استفاده از آب مقطر استریل انجام گرفت. رسوب نهایی در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل دیسپرس گردید. غلظت نقره‌ی احیاء شده‌ی فلزی در این محلول معادل ۰/۲ میلی مولار بود (۱۳).

سنتز نانوذرات درشت‌تر نقره با روش احیاء شیمیایی: ۳۰ میلی لیتر آب مقطر استریل درون ارلن استریل که داخل بشر حاوی یخ بود ریخته شد. ۶۷ میکرولیتر از محلول سدیم بوروهیدرات ۲ میلی مولار به آن اضافه گردید و ۱۶ میلی لیتر محلول نیترات نقره ۲ میلی مولار به صورت قطره قطره اضافه شد تا محلول قهوه‌ای رنگ به دست آید. بقیه‌ی مراحل همانند مرحله‌ی قبل به انجام رسید. غلظت نقره‌ی احیاء شده‌ی فلزی در این محلول معادل ۳/۲ میلی مولار بود (۱۳).

شیمیایی بدون محلول آبی (۱۴)، احیاء القاء شده با نور یا احیاء فتوکاتالیتیک (۱۵)، احیاء با کمک امواج اولتراسونیک (۱۶) و روش‌های بیوشیمیایی (۱۷).

از معایب مشخص روش‌های احیاء شیمیایی، استفاده از عوامل احیاء کننده است که از یک سو می‌توانند برای سلامتی انسان و محیط زیست خطرات بالقوه داشته باشند و از سوی دیگر معمولاً گران قیمت هستند. در نتیجه اخیراً روش‌های بیولوژیک سنتز نانوذرات توسعه یافته‌اند تا نانوذراتی سازگار با محیط زیست و ارزان قیمت تولید کنند.

بیوسنتز نانوذرات توسط میکروب‌ها اخیراً به عنوان یک جایگزین مناسب جهت تولید انبوه نانوذرات مورد توجه قرار گرفته است (۱۸). "نانومواد سبز" نامی است که برای این دسته از نانوذرات استفاده می‌شود و هدف بسیاری از تحقیقات در نانوفناوری می‌باشند. جالب توجه است که در زمینه‌ی توسعه‌ی پروتکل‌های تجربی تولید سریع و قابل اعتماد نانومواد سبز، فاکتورهای متعددی مانند ترکیب شیمیایی نانومواد نهایی، اندازه‌ی ذرات آن‌ها، موندیسپرسیته‌ی بالا و قابلیت تولید مقادیر زیاد مورد تاکید هستند.

بیوسنتز AgNPs توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها قبلاً مورد مطالعه قرار گرفته است. به طور مثال، در ایران سجادی و همکاران از مایع رویی کشت قارچ فوزاریوم اگریسپوریوم جهت تولید نانوذرات نقره در مقیاس آزمایشگاهی استفاده نمودند (۱۹). Jaidev و همکاران در هندوستان از مایع رویی کشت *Aspergillus niger* جهت بیوسنتز AgNPs بهره جستند (۲۰). Sadhasivam و همکاران در جمهوری کره بیوسنتز AgNPs را با استفاده از استرپتومایسس هایگروسکوپیکوس به انجام رساندند (۲۱). یکی از معایب استفاده از قارچ‌ها در بیوسنتز AgNPs مدت زمان طولانی رشد سلول‌های قارچی است. موکرجی و همکاران (۲۲) نشان دادند که بیوسنتز نانوذرات فلزی توسط قارچ‌ها حدود ۱۲۰ ساعت طول می‌کشد، در حالی که کلاوس و همکاران (۲۳) این زمان را برای باکتری‌ها در حدود ۲۴ ساعت گزارش نمودند.

محصول نهایی ناشی از سنتز شیمیایی نانوذرات نقره و نیز برای بررسی فازهای کریستالی آن ها، از روش پراکنش اشعه X استفاده شد. این آزمون در زاویه تابش معادل 2θ و در دامنه $10-0$ درجه و با استفاده از دستگاه Macscience X-ray Diffractometer مجهز به منبع فتون $\text{Cu K}\alpha$ (انجام شد. 40 kV , 20 mA , $\lambda = 0.154 \text{ nm}$) الگوی XRD به دست آمده با داده‌های استاندارد مرکز بین المللی داده‌های پراکنش (ICDD) مقایسه و تفسیر شد.

بررسی شکل، اندازه و نحوه توزیع (دیسپرسیون) نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری: محلول‌های نانوذراتی که در مراحل متفاوت و با روش‌های گوناگون (احیاء شیمیایی یا استفاده از سوپرناتانت باکتریال) سنتز شده بودند، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission Electron Microscope) مورد بررسی قرار گرفتند. بدین صورت که محلول نانوذرات به مدت ۲۰ دقیقه تحت تاثیر امواج اولتراسونیک با فرکانس ۵۰ هرتز قرار گرفت تا دیسپرسیون مناسب نانوذرات ایجاد شود و از اگریگاسیون آن‌ها جلوگیری به عمل آید. ۱۵ میکرولیتر از محلول مورد نظر با استفاده از سمپلر و نوک سمپلرهای فیلتردار برداشته شد و بر روی گریدهای مخصوص میکروسکوپ الکترونی (300 mesh holey carbon-coated grids, EMS, USA) ریخته شد. پس از خشک شدن، گریدها درون میکروسکوپ الکترونی قرار داده شدند و با ولتاژ ۱۰۰ کیلوولت توسط میکروسکوپ الکترونی مرکز قلب تهران از نوع Philips CM120 (Netherland) مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده با روش‌های مختلف: برای بررسی اثر آنتی‌باکتریال نانوذرات سنتز شده به روش احیاء شیمیایی، ۱۴ سویه‌ی بالینی باکتری شامل ده سویه‌ی اشیریشیا کلی که یکی از آن‌ها تولیدکننده‌ی متالوبتالاکتاماز نوع IMP بود ($E1$) تا $E9$ و $E-IMP$ ، یک سویه‌ی سودوموناس

سنتر نانوپارتيكل نقره به روش مخلوط کردن اجزاء واکنش به طور هم‌زمان و بررسی تاثیر آن بر اندازه‌ی ذرات: نمونه‌ای دیگر از نانوپارتيكل نقره به روش مخلوط کردن هم‌زمان اجزاء واکنش تهیه شد. در این روش ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۶۷ میکرولیتر سدیم بوروهیدرات، ۱ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره ۲ میلی‌مولار و ۲۰ میلی‌لیتر تری سدیم سیترات به طور هم‌زمان با هم مخلوط شدند که محلولی زرد رنگ ایجاد شد. در واکنشی دیگر ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۶۷ میکرولیتر سدیم بوروهیدرات، ۱۶ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره ۲ میلی‌مولار و ۲۰ میلی‌لیتر تری سدیم سیترات به طور هم‌زمان با هم مخلوط شدند که محلول قهوه‌ای رنگی به دست آمد.

بررسی تاثیر حجم تولید بر اندازه‌ی نانوذرات با افزایش حجم تولید به میزان پنج برابر: حجم تمامی محلول‌هایی که جهت سنتز نانونقره (محلول زرد رنگ) به کار رفتند پنج برابر گردید تا تاثیر حجم تولید بر اندازه‌ی نانوذرات مشخص گردد. در روش انجام کار تغییر تکنیکی دیگری داده نشد.

سنتر نانوپارتيكل نقره با استفاده از سوپرناتانت باکتریایی: از شش باکتری استاندارد شامل اشیریشیا کلی سویه‌ی DH5 α ، اشیریشیا کلی سویه‌ی K12، اشیریشیا کلی ATCC35218، باسیلوس سرئوس ATCC9634، استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 و انتروکوکوس فکالیس ATCC29212 در ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع TSB به صورت جداگانه کشت ۱۸ ساعته تهیه شد. محیط کشت مایع درون لوله‌های فالکون تقسیم شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰ RPM سانتریفیوژ شد. مایع رویی با دقت برداشته و پس از فیلتراسیون با فیلتر ۰/۲۵ میکرون، در ارلن استریل ریخته شد. به مایع رویی درون ارلن که بر روی یخ قرار گرفته بود، محلول نیترات نقره ۲ میلی‌مولار قطره قطره اضافه شد تا محلول زرد رنگ به دست آید. بقیه‌ی مراحل مانند روش سنتز شیمیایی انجام گرفت.

آزمون پراکنش اشعه‌ی X (XRD): برای بررسی دقیق یون‌ها و مولکول‌های به کار رفته در ساختار

به گونه‌ای که نانوذرات کوچک تر واجد اندازه‌ای بین ۲۵-۱۰ نانومتر (تصاویر ۱a و ۱b) و نانوذرات درشت‌تر واجد اندازه‌ای بین ۶۰-۴۰ نانومتر (تصاویر ۱c و ۱d) بودند و اکثر آن‌ها نیز شکل کروی داشتند. در حالی که نانوذراتی که با روش بیوسنتز و با استفاده از سوپرناتانت باکتریایی سنتز شده بودند، پلی‌دیسپرسیته شدیدی داشتند، به گونه‌ای که اندازه ذرات در آن‌ها از ۲۰ نانومتر تا بیش از ۱۲۰ نانومتر متفاوت بود. علاوه بر این شکل فیزیکی آن‌ها نیز بسیار متفاوت بود (تصاویر ۱e و ۱f).

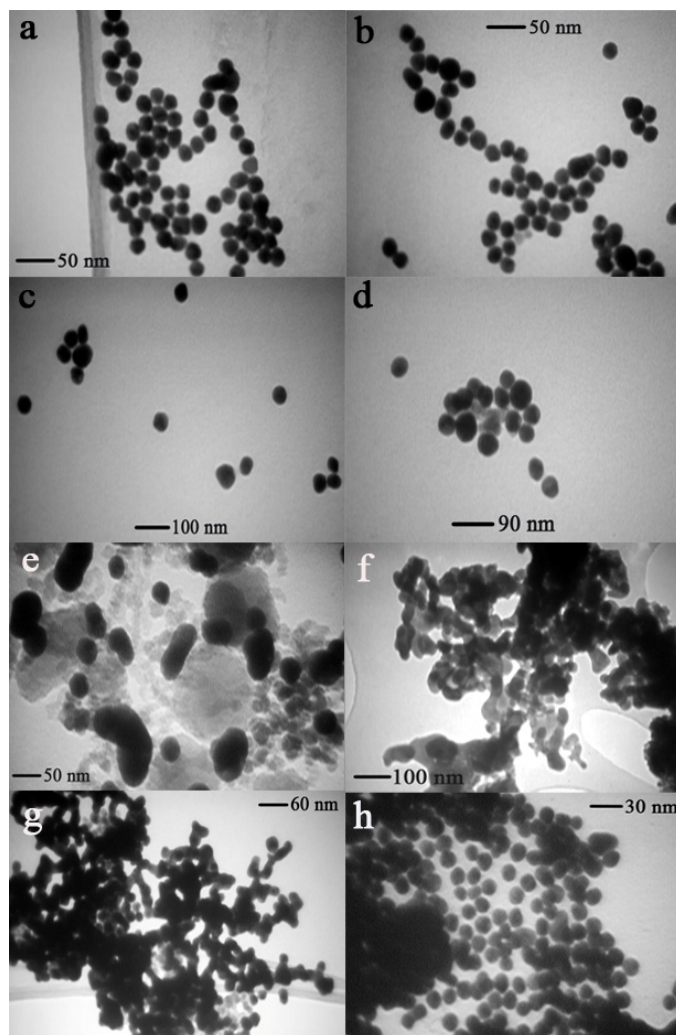
تصاویر ۱e و ۱f به ترتیب مربوط به سنتز نانوذرات نقره با استفاده از سوپرناتانت دو باکتری استاندارد/شریشیا کلی ATCC۳۵۲۱۸ و استافیلوکوکوس اورئوس ATCC۲۵۹۲۳ می‌باشند که نشان می‌دهند نانوذرات سنتز شده توسط سوپرناتانت باکتریال از نظر اندازه‌ی ذره و شکل ذره بسیار متفاوت بودند. از سوی دیگر، ظاهراً سوپرناتانت باکتری گرم منفی/شریشیا کلی بهتر از باکتری گرم مثبت/استافیلوکوکوس اورئوس در سنتز نانوذرات نقره عمل کرده است. نتایج حاصل از سنتز نانوذرات نقره توسط باکتری استاندارد/شریشیا کلی سویه‌ی K۱۲ مشابه/شریشیا کلی ATCC۳۵۲۱۸ و نتایج حاصل از سنتز نانوذرات نقره توسط باکتری‌های استاندارد باسیلوس سرئوس ATCC۹۶۳۴ و اتروکوکوس فکالیس ATCC۲۹۲۱۲ مشابه/استافیلوکوکوس اورئوس ATCC۲۵۹۲۳ بود، اما سوپرناتانت باکتری استاندارد/شریشیا کلی سویه‌ی DH5 α در سه بار تکرار پروسه‌ی سنتز، توان تولید نانوذرات نقره را نداشت.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری مربوط به نمونه نانوذرات به دست آمده ناشی از مخلوط کردن هم‌زمان اجزاء واکنش و نیز ناشی از افزایش حجم اجزاء واکنش به میزان پنج برابر (تصاویر شماره ۱g و ۱h) نشان می‌دهند که مخلوط کردن هم‌زمان، تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر روی مونودیسپرسیته و شکل و نیز درجه‌ی تجمع (اگریگاسیون) نانوذرات داشته، در حالی که افزایش حجم اجزاء واکنش به میزان پنج برابر، تاثیری بر

آرژوینوزا و سه سویه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس (S1 تا S3) و نیز تمامی سویه‌های استاندارد که سوپرناتانت آن‌ها در مراحل قبلی جهت تولید نانوذرات استفاده شده بود، انتخاب شدند. بررسی خاصیت آنتی‌باکتریال با تعیین MIC انجام گرفت. برای هر باکتری در دو سری ۵ لوله‌ای سریال رقت از دو میلی‌لیتر نانوذرات نقره (سنتز شده به صورت شیمیایی) در دو میلی‌لیتر محیط کشت TSB تهیه گردید، در یک سری، نانوذرات کوچکتر نقره و در سری دیگر، نانوذرات درشت تر تلقیح شدند. از باکتری‌های تحت آزمایش، کدورت معادل نیم مک فارلند تهیه گردید و به تمامی لوله‌ها، ۲۰ میکرولیتر از باکتری اضافه شد و سپس در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت قرار گرفتند. به عنوان کنترل مثبت، درون یک لوله تنها یک میلی‌لیتر محیط کشت TSB ریخته شد و ۲۰ میکرولیتر باکتری تلقیح و انکوبه گردید. به عنوان کنترل منفی و جهت اطمینان از استریل بودن خود محلول‌های نانونقره‌ی سنتز شده، درون یک لوله، یک میلی‌لیتر محیط کشت TSB و یک میلی‌لیتر از محلول‌های نانونقره‌ی سنتز شده اضافه شد و همراه با نمونه‌های تست انکوبه گردید. پس از انکوباسیون، لوله‌های حاوی کشت باکتری‌ها، به صورت چشمی در مقابل نور مستقیم از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری بررسی شدند. جهت اطمینان از کشته شدن باکتری و اثرات باکتریسیدال نانونقره سنتز شده، از لوله‌هایی که فاقد کدورت بودند ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و بر روی محیط آگار خون‌دار به صورت چمنی کشت داده شد. برای اطمینان از نتیجه‌ی آزمایش‌ها، تمامی تست‌ها سه بار تکرار و نتایج با یکدیگر مقایسه گردید.

یافته‌ها

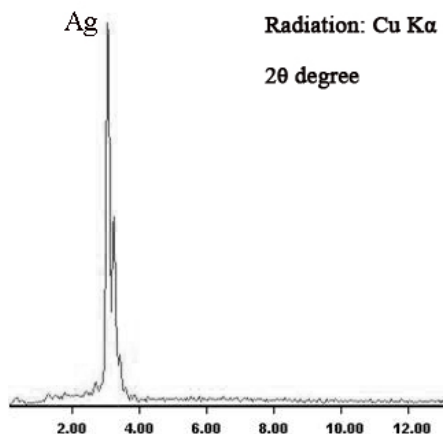
تمامی نانوذرات سنتز شده با روش‌های متفاوت (شیمیایی یا بیوسنتز) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفتند (تصاویر شماره ۱a تا ۱h). همان‌گونه که در تصاویر ۱a تا ۱d دیده می‌شود، نانوذراتی که با روش شیمیایی سنتز شدند، از مونودیسپرسیته بالایی برخوردار بودند،



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گرفته شده از نانوذرات نقره سنتز شده به روش های گوناگون. تصاویر ۱a و ۱b: نانوذرات کوچک تر نقره سنتز شده به روش احیاء شیمیایی. تصاویر ۱c و ۱d: نانوذرات درشت تر نقره سنتز شده به روش احیاء شیمیایی. تصویر ۱e: نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از سوپرناتانت باکتری استاندارد اشربشیا کلی ATCC۳۵۲۱۸، تصویر ۱f: نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از سوپرناتانت باکتری استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC۲۵۹۲۳، تصویر ۱g: تاثیر مخلوط کردن همزمان اجزاء واکنش احیاء شیمیایی بر اندازه و شکل ذرات، تصویر ۱h: تاثیر افزایش حجم اجزاء واکنش احیاء شیمیایی بر اندازه و شکل ذرات

نانوذرات خالص نقره می باشد (شکل ۲). وجه کریستالی ۱۱۱ که در زاویه ی ۳۸/۱ مشاهده شد، به دلیل الکترون دانسیته ی بالا، بسیار واکنشگر است و می تواند علت برقراری پیوند توسط نانوذرات نقره و خواص آنتی میکروبی آن باشد. نتایج مربوط به بررسی خاصیت آنتی باکتریال نانوذرات نقره ی سنتز شده با روش احیاء شیمیایی در جداول شماره ۱ و ۲ خلاصه شده اند.

روی سائز و شکل ذرات نداشته است و در نتیجه می توان روش سنتز احیاء شیمیایی فوق الذکر را برای تولید انبوه نانوذرات نقره به کار برد. الگوی پراش اشعه ی X که از نانوذرات کوچک تر (محلول زرد رنگ) سنتز شده با روش احیاء شیمیایی به دست آمده بود، نشان می دهد که نانوذرات سنتز شده با روش شیمیایی پس از شستشو با آب مقطر و حذف مواد زائد، از جنس نقره ی فلزی (Ag⁰) بوده اند و در نتیجه روش احیاء شیمیایی، روش مناسب و کاملی جهت سنتز



شکل ۲. الگوی پراش اشعه X بر روی نمونه نانوذرات کوچک تر سنتز شده به روش احیاء شیمیایی. نانوذرات سنتز شده پس از شستشو با آب مقطر و حذف مواد زائد، از جنس نقره‌ی فلزی (Ag₀) بودند.

جدول ۱: نتایج بررسی خاصیت آنتی‌باکتریال غلظت‌های مختلف نانوذرات کوچک تر نقره سنتز شده به روش احیاء شیمیایی بر ۲۰ سویه‌ی باکتریال

غلظت نانوقره					نام سویه‌ی باکتریال
۰/۰۱۲۵mM	۰/۰۲۵mM	۰/۰۵mM	۰/۱mM	۰/۲mM	
+	-	-	-	-	اشریشیا کلی سویه‌ی DH۵α، اشریشیا کلی سویه‌ی K۱۲، اشریشیا کلی ATCC۳۵۲۱۸
+	+	-	-	-	E۹، E۸، E۶، E۵، E۴، E۱
+	+	+	-	-	ATCC۹۶۳۴، باسیلوس سرئوس E-IMP، E۷، E۳، E۲
+	+	+	+	-	سودوموناس آئروژینوزا (سویه بالینی)، S۲، استافیلوکوکوس اورئوس ATCC۲۵۹۲۳، انتروکوکوس فکالیس ATCC۲۹۲۱۲
+	+	+	+	+	S۳، S۱

۱-۹: سویه‌های شماره‌ی ۱ تا ۹ اشریشیا کلی بالینی، E-IMP: سویه‌ی بالینی اشریشیا کلی تولید کننده‌ی متالوبتالاکتاماز IMP، ۳-۱: سویه‌های شماره‌ی ۱ تا ۳ استافیلوکوکوس اورئوس بالینی، -: نشان‌دهنده‌ی عدم رشد باکتری، +: نشان‌دهنده‌ی رشد باکتری

جدول ۲: نتایج بررسی خاصیت آنتی‌باکتریال غلظت‌های مختلف نانوذرات درشت تر نقره سنتز شده به روش احیاء شیمیایی بر ۲۰ سویه باکتریال

غلظت نانوقره					نام سویه‌ی باکتریال
۰/۲mM	۰/۴mM	۰/۸mM	۱/۶mM	۳/۲mM	
+	-	-	-	-	اشریشیا کلی سویه‌ی DH۵α
+	+	-	-	-	سودوموناس آئروژینوزا (سویه بالینی)
+	+	+	-	-	E۹، E۸، E۷، E۶، E۵، E۳، E۱، اشریشیا کلی سویه‌ی E-IMP، K۱۲، اشریشیا کلی ATCC۳۵۲۱۸
+	+	+	+	-	E۴، E۲، باسیلوس سرئوس ATCC۹۶۳۴
+	+	+	+	+	S۳، S۲، S۱، استافیلوکوکوس اورئوس ATCC۲۵۹۲۳، انتروکوکوس فکالیس ATCC۲۹۲۱۲

۱-۹: سویه‌های شماره‌ی ۱ تا ۹ اشریشیا کلی بالینی، E-IMP: سویه‌ی بالینی اشریشیا کلی تولید کننده‌ی متالوبتالاکتاماز IMP، ۳-۱: سویه‌های شماره‌ی ۱ تا ۳ استافیلوکوکوس اورئوس بالینی، -: نشان‌دهنده‌ی عدم رشد باکتری، +: نشان‌دهنده‌ی رشد باکتری

بالینی در مقایسه با سویه‌های استاندارد به نانوذرات نقره کمتر است. نکته‌ی قابل توجه این است که با وجود اینکه غلظت نانوذرات نقره در لوله‌ی شماره‌ی پنج حاوی نانوذرات درشت تر

همان گونه که مشاهده می‌شود، به طور کلی، باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت به نانوذرات نقره حساسیت بیشتری نشان داده‌اند. علاوه بر این میزان حساسیت سویه‌های

منفی، آن‌ها را به عنوان عوامل ضد میکروبی جدید معرفی کردند (۲۷). در همان سال Furno و همکاران پس از ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و محدودیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، نانونقره را برای درمان بسیاری از بیماری‌های باکتریایی و قارچی موثر دانست (۲۸). در سال ۲۰۱۰ Chaloupka و همکاران ثابت کردند که نانوذرات نقره به دلیل عملکرد چندگانه‌ی ضد میکروبی، یکی از موثرترین نانوذرات فلزی واجد خاصیت ضد میکروبی می‌باشند (۲۹).

در این مطالعه مشخص شد که نانوذرات نقره‌ی سنتز شده به روش احیاء شیمیایی به مراتب بر روی باکتری‌های گرم منفی مثل *اشریشیا کلی* موثرتر بودند، در حالی که بر روی باکتری‌های گرم مثبت، به خصوص *استافیلوکوکوس اورئوس* تاثیر کمتری داشتند. در مطالعات مختلف، نتایج متفاوتی حاصل شده است. در سال ۲۰۱۰، Nanda و Saravanan نشان دادند که نانوذرات نقره بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بسیار موثر بوده است (۳۰). در سال ۲۰۱۱، مبارک علی و همکاران بیان نمودند که تاثیر نانوذرات نقره بر روی *اشریشیا کلی* بیشتر از *استافیلوکوکوس اورئوس* است و علت این امر را ضخامت بیشتر دیواره‌ی سلولی باکتری‌های گرم مثبت از جمله *استافیلوکوکوس* ذکر کردند (۳۱). شاید دلیل این تفاوت در نتایج ارائه شده، مربوط به تفاوت ساختاری و ژنتیک سویه‌ها با توجه به مکان جغرافیایی باشد.

در مطالعه‌ی اخیر مشخص شد نانوذرات واجد اندازه‌ی کوچک تر، تاثیر آنتی‌باکتریال بیشتری دارند، به گونه‌ای که ذرات درشت‌تر با غلظت مشابه ذرات کوچک تر، فاقد اثرات آنتی‌باکتریال بودند. مشابه این نتایج در مطالعات دیگر نیز به دست آمده است. در سال ۲۰۰۵ Shrivastava و همکاران تأثیر نانونقره با اندازه‌ی ۱۰ تا ۱۵ نانومتر را بر روی باکتری‌ها مورد بررسی قرار دادند که در نتیجه مشخص شد نانونقره با اندازه‌ی کوچک تر خواص ضد باکتری بیشتری را از خود به نمایش گذاشت (۳۲). Guzman و همکاران در سال

مساوی غلظت آن در لوله‌ی شماره‌ی یک حاوی نانوذرات کوچک تر بود (معادل ۰/۲ میلی مولار)، اما به دلیل کوچک تر بودن نانوذرات در سری اخیر تاثیر آن بر روی باکتری‌ها به مراتب بیشتر بود، به گونه‌ای که در لوله‌ی شماره‌ی پنج سری حاوی نانوذرات درشت تر، تمامی سویه‌های باکتری قابلیت رشد داشتند، در حالی که در لوله‌ی شماره‌ی یک سری حاوی نانوذرات کوچک تر، با وجود غلظت یکسان نقره، هیچ یک از سویه‌های باکتری رشد نکردند.

در غلظت ۰/۰۱۲۵ میلی مولار نانوذرات کوچک‌تر نقره (معادل ۱۲/۵ نانومولار) تمامی باکتری‌های تحت آزمایش قابلیت رشد داشتند و غلظت مذکور نتوانست از رشد باکتری‌ها جلوگیری کند. در مقابل، غلظت ۰/۲ میلی مولار نتوانست رشد اکثر باکتری‌های تحت آزمایش را مهار کند، لذا در مورد نانوذرات کوچک‌تر نقره می‌توان غلظت مذکور را به عنوان کمترین غلظت مهار کننده (Minimum Inhibitory Concentration-MIC) مطرح نمود.

بحث و نتیجه گیری

پس از ظهور و افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، تحقیقات بسیاری در سطح آزمایشگاهی برای کشف مواد جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها انجام شده است. در سال ۱۹۶۰ Moyer از نیترا نقره ۰/۵٪ برای درمان سوختگی‌ها استفاده کرد. او همچنین ثابت کرد که این محلول خاصیت ضد باکتریایی علیه *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* را دارا می‌باشد (۲۴ و ۲۵).

در سال ۱۹۶۸ نیز نیترا نقره با سولفونامید برای ساخت کرم سولفادیازین که از طیف وسیع فعالیت ضد باکتریایی برخوردار می‌باشد، ترکیب شد. سولفادیازین نقره علیه باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* موثر بود، اما این فعالیت زیاد قابل توجه نبود (۲۶). در سال ۲۰۰۴ Sondi و Salopek با بررسی اثرات نانوذرات نقره بر باکتری *اشریشیا کلی* به عنوان شاخص باکتری‌های گرم

مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

1. Shipway AN, Katz E, Willner I. Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical and sensor applications. *Chem Phys Chem J.* 2000;1:18-52.
2. Rao CNR, Nath M. Inorganic nanotubes. *Dalton Trans.* 2003;1:1-24.
3. Hussain S, Pal AK. Incorporation of nanocrystalline silver on carbon nanotubes by electrodeposition technique. *Mater Lett.* 2008;62:1874-7.
4. Cho KH, Park JE, Osaka T, Park S. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochim Acta.* 2005; 51:956-60.
5. Cao YWC, Jin RC, Mirkin CA. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science.* 2002; 297:1536-40.
6. Jiang HQ, Manolache S, Wong ACL, Denes FS. Plasma-enhanced deposition of silver nanoparticles onto polymer and metal surfaces for the generation of antimicrobial characteristics. *J Appl Polym Sci.* 2004; 93:1411-22.
7. McLeod MC, McHenry RS, Beckman EJ, Roberts CB. Synthesis and stabilization of silver metallic nanoparticles and premetallic intermediates in perfluoropolyether/CO₂ reverse micelle systems. *J Phys Chem B.* 2003;107:2693-700.
8. He BL, Tan JJ, Kong YL, Liu H. Synthesis of size controlled Ag nanoparticles. *J Mol Catal A: Chem.* 2004;221:121-6.
9. Faure C, Derre A, Neri W. Spontaneous formation of silver nanoparticles in multilamellar vesicles. *J Phys Chem B.* 2003;107:4738-46.
10. Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, Whyman R. Synthesis of thiol derivatised gold nanoparticles in a two phase liquid/liquid system. *J Chem Soc Chem Commun.* 1994;7:801-2.
11. Zhang YH, Chen F, Zhuang JH. Tang Y, Wang D. Synthesis of silver nanoparticles via electrochemical reduction on compact zeolite film modified electrodes. *Chem Commun.* 2002; 23:2814-5.
12. Hornebecq V, Antonietti M, Cardinal T, Treguer-Delapierre M. Stable silver nanoparticles immobilized in mesoporous silica. *Chem Mater.* 2003;15:1993.
13. Leopold N, Lendl B. A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride. *J Phys Chem B.* 2003;107:5723-7.
14. Chen DH, Huang YW. Spontaneous formation of Ag nanoparticles in dimethylacetamide solution of poly (ethylene glycol). *Colloid Interface*

۲۰۱۲ تأثیر بسیار زیاد نانونقره را بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و حتی برخی گونه‌های بسیار مقاوم شده همچون MRSA نشان دادند و بیان کردند که اندازه‌ی نانوذرات نقره تأثیر زیادی در خواص ضد باکتری دارد، به گونه‌ای که ذراتی با اندازه‌ی بین ۹ تا ۱۹ نانومتر بیشترین تأثیر را بر باکتری‌ها داشت (۳۳). به نظر می‌رسد اندازه‌ی نانوذرات بر مکانیسم عمل آنتی‌باکتریال آن‌ها تأثیر می‌گذارد که این امر می‌تواند احتمالاً به دلیل افزایش سطح به حجم ذرات نقره و سطح در دسترس بزرگ تر آن‌ها جهت واکنش با پروتئین‌های باکتریال یا به دلیل قابلیت نفوذ بیشتر نانوذرات کوچک تر به درون سلول باکتری باشد.

با توجه به روش‌های متفاوتی که جهت سنتز نانونقره وجود دارد، روش بیوسنتز و استفاده از میکروپها مقرون به صرفه به نظر می‌رسد. اما در این تحقیق مشخص شد که سنتز نقره با استفاده از سوپرناتانت شش سویه‌ی مختلف باکتری، نتایج رضایت بخشی ندارد و از مونودیسپرسیته خوبی برخوردار نیست. علت این امر می‌تواند وجود مواد بسیار متفاوتی باشد که توسط باکتری تولید می‌شوند و خواص احیاء کنندگی بسیار متفاوت دارند. در سال ۲۰۱۲، Li و همکاران ثابت کردند که دمای واکنش، مدت زمان واکنش، غلظت واکنشگرها و غلظت سورفکتانت‌ها و سایر مواد موجود در واکنش در اندازه و توزیع اندازه‌ی نانونقره موثر هستند (۳۴).

روش بیوسنتز با استفاده از باکتری‌ها روشی کم هزینه است، اما نانوذرات پلی‌دیسپرس ایجاد می‌کند. به نظر می‌رسد در صورت ایجاد تغییر در روش بیوسنتز نانوذرات، به گونه‌ای که ذراتی با مونودیسپرسیته بالاتر و هزینه‌ی کمتر تولید کند، این روش بتواند جایگزین روش‌های احیاء شیمیایی شود. نانوذرات نقره با توجه به فعالیت خوب آنتی‌باکتریال، می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشند، اما باید توجه شود که میزان مقاومت سویه‌های بالینی در مقایسه با سویه‌های استاندارد بالاتر می‌باشد و باید پیش از تجویز نانوذرات، مقاومت باکتری‌ها نسبت به آن‌ها

- 2004;54:1019-24.
29. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trend Biotechnol.* 2010;28:580-8.
30. Saravanan M, Nanda A. Extracellular synthesis of silver bionanoparticles from *Aspergillus clavatus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* 2010;77:214-8.
31. MubarakAli D, Thajuddin N, Jeganathan K, Gunasekaran M. Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* 2011;85:360-5.
32. Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh J, Ramachandrarao P, Dash D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2007;18:225103-11.
33. Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnol Biol Med.* 2012;8:37-45.
34. Li L, Sun J, Li X, Zhang Y, Wang Zh, Wang Ch, et al. Controllable synthesis of monodispersed silver nanoparticles as standards for quantitative assessment of their cytotoxicity. *Biomaterials.* 2012;33:1714-21.
- Sci. 2002;255:299-302.
15. Shchukin DG, Radtchenko IL, Sukhorukov GB. Photoinduced reduction of silver inside microscale polyelectrolyte capsules. *Chem Phys Chem.* 2003;4:1101-3.
16. Zhang JP, Sheng LQ, Chen P. Synthesis of various types of silver nanoparticles used as physical developing nuclei in photographic science. *Chin Chem Lett.* 2003;14:645-8.
17. Kowshik M, Ashtaputre S, Kharrazi S, Vogel W, Urban J, Kulkarni SK, et al. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. *Nanotechnology.* 2003;14:95-100.
18. Verma VC, Kharwar RN, Gange AC. Biosynthesis of noble metal nanoparticles and their application. *Nutr Nat Resour.* 2009;4:1-17.
19. Sajadi G, Shojaei A, Fazeli MR, Amini J, Jamalifar H. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by *Fusarium exisporium* in laboratory scale. *Donyay-e-Microbeha J.* 2010;1:44-47. Persian.
20. Jaidev LR, Narasimha G. Fungal mediated biosynthesis of silver nanoparticles, characterization and antimicrobial activity. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* 2010;81:430-3.
21. Sadhasivam S, Shanmugam P, Yun K. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces hygroscopicus* and antimicrobial activity against medically important pathogenic microorganisms. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* 2010;81:358-62.
22. Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Ahmad A, Islam Khan M, Kumar R, et al. Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*. *Chem Biochem.* 2002;3:461-3.
23. Klaus T, Joerger R, Olsson E, Granqvist CG. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96:13611-4.
24. Moyer CA, Brentano L, Gravens DL, Margraf HW, Monafu WW. Treatment of large human burns with 0.5% silver nitrate solution. *Arch Surg.* 1965;90:812-7.
25. Hartford CE. The bequests of Moncrief and Moyer: an appraisal of topical therapy of burns: 1981 American Burn Association Presidential address. *J Trauma.* 1981;21:827-34.
26. Fox CL, Discussion. In: Stanford W, Rappole BW, Fox CL, editors. Clinical experience with silver-sulphadiazine. *J Trauma.* 1969. 9: 387-388.
27. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Science.* 2004;275:177-82.
28. Furno F, Morley KS, Wong B, Sharp BL, Arnold PL, Howdle SM, et al. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? *J Antimicrob Chemother.*

Synthesis of silver nanoparticles through chemical reduction and biosynthesis methods and evaluation of their antibacterial effects

Mahnaz Mohtashami, MSc. Microbiology Department, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. mahnazmohtashami@gmail.com

* **Saeed Sepehrisesht**, PhD. Animal, Poultry and Aquatics Department, Agricultural Research Center, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran (*Corresponding author). s.sepehrisesht@gmail.com

Esmael Asli, PhD. Assistant Professor of Pharmacology, Microbiology Department, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. easli62@yahoo.com

Mohammad Ali Boroumand, MD. Associate Professor of Pathology, Microbiology Department, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. maboroumand@yahoo.com

Ahmad Ghasemi, MSc. Biochemistry Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. ghasemi.a51@gmail.com

Abstract

Background: Silver nanoparticles have wide applications in medicine and treatment of bacterial infections due to their disinfection properties. Chemical synthesis, biosynthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles have been studied previously, but regarding the high costs of chemical synthesis and the increase of antibiotic-resistance phenomenon among bacteria, assessment of the biosynthesis of silver nanoparticles and their effects on different clinical and standard bacterial strains is of great importance.

Methods: Silver nanoparticles were synthesized through chemical and biosynthesis methods and their size and size distribution was assessed Transmission Electron Microscope. Chemically synthesized nanoparticles were added to tubes containing TSB medium and different bacterial strains for their antibacterial effects and their minimum inhibitory concentration was calculated

Results: Chemically synthesized silver nanoparticles had high monodispersity, but biosynthesized nanoparticles had higher polydispersity. Smaller silver nanoparticles had better antibacterial effects on Gram-negative and Gram-positive bacteria, in such a manner that they inhibited the bacterial growth at 0.2 mM concentration, but larger nanoparticles had lesser effects.

Conclusion: Biosynthesis through bacterial supernatant is cost effective, but it produces polydisperse nanoparticles. Silver nanoparticles can replace antibiotics due to their suitable antibacterial effects, but it should be mentioned that clinical strains are more resistant than standard strains and bacterial resistance to these nanoparticles should be checked before their prescription.

Keywords: Silver nanoparticles, Antibacterial effects, Transmission electron microscope, Bacterial supernatant.