

Green Synthesis of Silver Nanoparticles with *Allium paradoxum* Extract and Evaluation of their Antibacterial Activities

Termeh Ranjbar¹,
Zahra Hashemi¹,
Fereshteh Sadeghian¹,
Hamid Reza Goli²,
Mohammad Ahanjan³
Mohammad Ali Ebrahimzadeh⁴

¹ Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Department of Medical Microbiology and Virology, Molecular and Cell Biology Research Centre, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Department of Medical Microbiology and Virology, Molecular and Cell Biology Research Centre, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received September 2, 2019 ; Accepted December 15, 2019)

Abstract

Background and purpose: Microbial resistance against antibiotics is increasingly growing, therefore, it is necessary to develop new remedies. Silver nanoparticles have significant antibacterial properties and synthesis of silver nanoparticles mediated by plant extracts could be considered as an alternative in treatment in various infections.

Materials and methods: In this study, silver nanoparticles were synthesized using *Allium paradoxum* extract. Optimum temperature, concentration, and also optimum pH for production of silver nanoparticles were established. Formation of the particles was investigated by *UV-vis spectra*, *EDS*, *XRD*, and *SEM* techniques. The MIC and MBC values of the particles against several gram-positive and gram-negative bacteria strains were determined.

Results: Optimum condition for synthesis of silver nanoparticles was at 85°C, pH 12, 5 mM concentration, and 30 minutes after adding the extract solution to silver nitrate solution. The particles remained stable until two months after synthesis. The approximate size of silver nanoparticles was 30 to 40 nanometer. Nanoparticles shows strong antibacterial effects against *Pseudomonas aeruginosa*, and moderate antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Conclusion: In this study, *A. paradoxum* was found as a good reducing and coating agent in green synthesis of silver nanoparticles. These particles showed strong antibacterial activities Therefore, they can have high potential for use in biological fields.

Keywords: *Allium paradoxum*, silver nanoparticle, antibacterial, extract, green synthesis

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 29 (182): 1-11 (Persian).

* Corresponding Author Mohammad Ali Ebrahimzadeh - Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: zadeh20@yahoo.com)

سنتز سبز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه آلیوم پارادوکسوم و بررسی فعالیت ضد میکروبی آن

ترمه رنجبر^۱

زهرا هاشمی^۱

فرشته صادقیان^۱

حمید رضا گلی^۲

محمد آهنجان^۳

محمد علی ابراهیم زاده^۴

چکیده

سابقه و هدف: بروز مقاومت میکروبی در حال افزایش است، از این رو عرضه داروهای جدید ضروری به نظر می‌رسد. نانوذرات نقره فعالیت ضد میکروبی خوبی از خود نشان می‌دهند. سنتز این نانو ذرات با استفاده از عصاره‌های گیاهی می‌تواند راهی در درمان بیماری‌های عفونی باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه الزی (بومی مناطق شمال ایران) با نام علمی آلیوم پارادوکسوم انجام شد. دمای مطلوب، غلظت و pH مناسب در تولید آن به دست آمد. تشکیل و مورفولوژی ذرات با طیف ماورای بنفش، EDS، XRD و SEM مطالعه شد. همچنین اثرات ضد میکروبی آن‌ها به صورت حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) در مقابل چندین باکتری گرم مثبت و منفی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از بهینه‌سازی شرایط واکنش نشان داد که بهترین دما، ۸۵ درجه سانتی‌گراد، بهترین pH، ۱۲، بهترین غلظت ۵ میلی‌مولار نیترات نقره و در مدت زمان ۳۰ دقیقه است. نانو ذرات حداقل تا دو ماه پایدار بودند و اندازه تقریبی آن‌ها ۳۰ تا ۴۰ نانومتر بود. همچنین نانوذرات اثرات ضد میکروبی قوی بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا نشان داد. این ذرات بر استافیلوکوک اورئوس و اشرشیاکلی نیز اثرات ضدباکتریایی خوبی نشان دادند.

استنتاج: این مطالعه نشان داد که الزی گیاه مناسبی به عنوان عامل احیاکننده و پوشش‌دهنده در تهیه نانو ذرات نقره است. نانوذرات حاصل، اثرات ضد باکتریایی خوبی نیز از خود نشان دادند. از این رو، آن‌ها می‌توانند از پتانسیل بالایی برای استفاده در زمینه‌های بیولوژیکی برخوردار باشند.

واژه‌های کلیدی: الزی، الیوم پارادوکسوم، نانوذرات نقره، ضد باکتریایی، عصاره، سنتز سبز

مقدمه

مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در حال افزایش است و وضعیت در آینده بدتر نیز خواهد شد، زیرا که روند توسعه داروهای ضعیف می‌باشد. دلایل متعددی وجود دارد که چرا کاندیداهای جدید دارویی

E-mail:zadeh20@yahoo.com

مؤلف مسئول: محمد علی ابراهیم زاده - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

۱. دانشجوی داروسازی، دانشکده داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استادیار، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشیار، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوباتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

✉ تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۶/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۸/۶/۱۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۹/۲۴

در حال تولید نیستند. صنایع داروسازی تا حد زیادی عرصه را ترک کرده‌اند و بودجه محدودی برای کشف دارو در محیط‌های دانشگاهی وجود دارد (۱). مطالعات نشان داده است که مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها یک پدیده طبیعی است که به دلیل ویژگی تکاملی ذاتی و سازگاری باکتری‌ها، عصر طلایی درمان آنتی‌بیوتیکی را پیش از موقع از بین برده است. بدون شک رفتار انسان در دستیابی به مقاومت باکتری در مقابل سطح هشداردهنده فعلی تعیین کننده بوده است. استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها ظهور مقاومت را تسهیل می‌کند. آنتی‌بیوتیک‌های موجود مکانیسم‌های مشخصی دارند. بررسی آنتی‌بیوتیک‌هایی که اخیراً توسعه پیدا کرده‌اند مشخص نموده که متاسفانه این رویه، تغییر قابل ملاحظه‌ای نکرده است و تقریباً تمامی آنتی‌بیوتیک‌های پذیرفته شده در ۳۰ سال گذشته ناشی از اصلاحاتی در کلاس‌های قبلی هستند تا آن‌ها را در برابر باکتری‌های مقاوم موثرتر و قوی‌تر جلوه دهند. بر این اساس واضح به نظر می‌رسد که نه تنها باید در جستجوی داروهای ضد باکتریایی مؤثرتر بود بلکه باید ترکیبات شیمیایی نو با مکانیسم‌های عمل جدید توسعه یابد. با این حال، توسعه آنتی‌بیوتیک‌هایی که بر روی اهداف جدید عمل می‌کنند، کار بسیار چالش برانگیز و گرانی است (۲،۳).

امروزه از نانوتکنولوژی برای تمامی ابعاد زندگی استفاده می‌شود، اما مهم‌ترین کاربرد نانو نقره در علوم پزشکی می‌باشد. این ذرات به خاطر اثرات ضد باکتریایی و اثرات ضدالتهابی مورد استفاده قرار می‌گیرند و همچنین به عنوان پوششی بر روی تجهیزات پزشکی نیز به کار گرفته می‌شوند. از میان تمامی کاربردهای نانوذرات نقره، پرکاربردترین حوزه مربوط به اثرات ضد باکتریایی نقره می‌باشد، همچنین نانو ذرات نقره بالاترین پتانسیل تجاری شدن را نیز دارد (۴).

مطالعات بر روی اثرات نانوذرات نقره همچنان در حال گسترش و پیشرفت است، اما در تحقیقات به عمل آمده ثابت شده است که نانو ذرات نقره بر

بیش از ۶۰۰ نوع از میکروارگانیسم‌ها موثر است و قادر است آن‌ها را غیرفعال کند. از آن جمله می‌توان به *Candida albicans*، *Bacillus typhosus*، *Staphylococcus aureus*، *Salmonella aureus*، *Staphylococcus pyogene*، *Entamoeba histolytica*، *Escherichia* اشاره کرد. نانونقره برای از بین بردن ویروس‌ها نیز موثر بوده و تحقیقات در این زمینه همچنان ادامه دارد (۵). اثرات ضد باکتریایی نقره از دیرباز شناخته شده است، اما مکانیسم تاثیرگذاری در مورد نانو ذرات نقره به این صورت است که این ذرات در محلول‌های آبی یون‌هایی آزاد می‌کنند که از نظر بیولوژیکی فعال بوده و باعث ایجاد اثرات ضدباکتریایی می‌شوند (۶). این مکانیسم‌ها کاملاً شناخته شده نیستند، اما مطالعات اخیر نشان داد که یون‌های نقره با قسمت‌هایی از باکتری‌ها تداخل دارند و از این طریق اثرات ضدباکتریایی خود را آشکار می‌سازند. برای نمونه می‌توان به تاثیر نانوذرات نقره بر پپتیدوگلیکان‌های دیواره سلولی، غشای پلاسمایی، عملکرد DNA و همچنین تاثیر مخرب نانوذرات بر پروتئین‌ها و آنزیم‌ها اشاره کرد. از میان این تداخلات تخریب آنزیم‌هایی که در روند چرخه انتقال الکترون دخیل هستند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (۷). استفاده از عصاره‌های گیاهی برای سنتز نانوذرات به دلیل سهولت کار در مقیاس بالا، کاهش آثار مخرب زیست محیطی، مقرون به صرفه بودن از نظر اقتصادی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. همچنین فراهم کردن پایدارکننده‌ها برای تثبیت نانوذرات نقره بسیار حائز اهمیت هستند (۸). نانوذرات نقره اثر ضد سرطان بالایی نیز از خود نشان می‌دهند (۹).

Allium paradoxum (M.B.) G. Don. (*A. paradoxum*)
(آلیوم پارادوکسوم) که در گویش محلی الزی *Alezi* نامیده می‌شود، به عنوان یک سبزی و ادویه قابل کشت در باغات خانگی منطقه شمالی ایران به ویژه مازندران یافت می‌شود. از این گیاه برای تهیه انواع غذاهای محلی و خاص استفاده می‌شود. از الزی سولفوکسیدهای سیستمین،

۱۰ pH با سود ۲ مولار رسانده شد. محلول نیترات نقره به شکل قطره قطره به محلول عصاره اضافه شد. جذب UV مخلوط در طول موج ۳۵۰ تا ۵۰۰ نانومتر گرفته شد. (۲) مناسب ترین pH: در مرحله بعدی، مناسب ترین pH برای انجام واکنش مورد بررسی قرار گرفت. pH محلول عصاره در محدوده ۶-۵ بود. بر این اساس ۴ pH انتخاب و بررسی شد. pH های انتخابی عبارت بودند از: ۱۰ و ۱۲ و pH محلول عصاره که ۵/۵ بود.

در همین راستا به مانند مرحله قبل ۲۵ میلی لیتر محلول نقره نیترات با غلظت ۱ میلی مولار و ۲۵ میلی لیتر محلول عصاره ۱ میلی گرم بر میلی لیتر ساخته شد. ۴ ظرف واکنش برداشته و در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد عملیات زیر انجام شد، (غلظت مولی محلول نقره و عصاره و دما در این روند ثابت بوده و فقط pH عصاره متغیر بود). بعد از انجام واکنش به صورت بالا، نیم ساعت بر روی همزن برقی گذاشته شدند و در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۵۰ تا ۵۰۰ نانومتر اندازه گیری شد.

(۳) مناسب ترین غلظت: برای انجام این کار غلظت عصاره ۱ میلی گرم بر میلی لیتر در نظر گرفته شد و تغییر غلظت نقره نیترات از ۱ تا ۵ میلی مولار بررسی شد. دمای انجام واکنش ۸۵ درجه بود.

لوله‌های آزمایش، به مدت نیم ساعت در اتاق تاریک قرار داده شده و بعد از گذشت این زمان، با استفاده از دستگاه UV طیف هر کدام از نمونه‌ها با غلظت‌های متفاوت در طول موج ۳۵۰ تا ۵۰۰ نانومتر گرفته شد.

(۴) مناسب ترین زمان: بعد از به دست آمدن بهترین غلظت، pH و دما، زمان انجام واکنش اپتیمم شد. بدین منظور محلول نقره نیترات ۵ میلی مولار، محلول عصاره به غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر در دمای ۸۵ درجه و pH ۱۲ تهیه شد. با استفاده از یک قیف چکاننده، محلول عصاره به شکل قطره قطره به محلول نیترات نقره اضافه شد. سرعت افزایش قطرات عصاره به گونه‌ای تنظیم شد که در هر ۳ ثانیه، ۱ قطره خارج شود. بعد از اضافه شدن کامل محلول عصاره، از محلول واکنش در مدت

فعالیت آلیناز، فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی همولیتیک گزارش شده است (۱۱،۱۰). در این پژوهش از عصاره متانولی *A. paradoxum* برای سنتز سبزنانوذرات نقره به عنوان احیا کننده و پایدار کننده استفاده شد و فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها بر روی سویه‌های ATCC (American Type Culture Collection) و گونه‌های مقاوم جدا شده از کلینیک بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری و تهیه عصاره گیاه

اندام هوایی *A. paradoxum* از جنگل ساری (شمال ایران) جمع آوری شد. مواد به مدت ۲ هفته در دمای اتاق و سپس در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۲ روز خشک شدند. مواد خشک قبل از عصاره گیری به قطعات کوچک تری تبدیل شدند (۳-۲ میلی متر). برای عصاره گیری از روش پراکولسیون (خیساندن) استفاده شد. بدین منظور به ۱۰۰ گرم پودر گیاه، ۳۵۰ میلی لیتر متانول خالص اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت در دمای اتاق، مجموعه با استفاده از کاغذ صافی Whatman No.1 صاف شد. عمل استخراج سه بار تکرار شد و مجموع حلال آلی با استفاده از روتاری (تبخیر کننده چرخان) حذف شد تا عصاره‌های جامد خام بدست آمد، سپس برای حذف کامل حلال فریزدرایر انجام شد. بازده عصاره گیری ۲۷ درصد بود (۱۰).

برای سنتز نانوذرات نقره بهینه سازی شرایط واکنش صورت گرفت

(۱) مناسب ترین دما: انتخاب دمای مناسب اولین گام در بهینه سازی ساخت نانوذرات بود. بدین منظور واکنش در ۱۰ pH مورد بررسی قرار گرفت. دماهای مورد بررسی ۴۵، ۶۰، ۸۵ درجه سانتی گراد و دمای اتاق بودند. بدین منظور ۲۵ میلی لیتر محلول نقره نیترات با غلظت ۱ میلی مولار تهیه شد. سپس ۲۵ میلی لیتر محلولی از عصاره با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد و به

زمان‌های مشخصی نمونه‌برداری شد و طیف UV آن در طول موج ۳۵۰ تا ۵۰۰ نانومتر بررسی شد.

سنتر نانو ذرات نقره

۱۲/۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه در ارلن مایر به دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. ۲۱ میلی‌گرم نیترات نقره (معادل غلظت ۵ میلی‌مولار بر اساس مقادیر بهینه‌سازی شده) اضافه شد و مجموعه بهم زده شد. محلول عصاره آلوم پارادوکسوم با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با استفاده از آب دیونیزه تهیه شد. pH محلول با کمک سود ۲ مولار به ۱۲ رسانده شد. محلول عصاره به شکل قطره قطره به ارلن حاوی محلول نیترات نقره اضافه شد. رنگ محلول از زرد به قهوه‌ای تیره تبدیل شد. سرعت افزایش قطرات به صورت هر ۳ ثانیه، ۱ قطره تنظیم شد. پس از اتمام افزایش محلول عصاره، مجموعه واکنش به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد. در نهایت مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. رسوبات حاصل در آون خشک و سپس تحت آنالیز قرار گرفت.

تعیین اثرات ضد میکروبی

سنجش حداقل غلظت بازدارندگی (*Minimum inhibitory concentration*) به روش میکروداپلوشن:

سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل نیم مک فارلند تهیه شد. در این روش از میکروپلیت‌های U شکل استفاده شد. در تمامی چاهک‌های مربوطه در میکروپلیت، مقدار ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هیتتون برات اضافه شد. غلظت‌های مورد نظر از آنتی‌بیوتیک در چاهک‌های مربوطه تهیه شد. به همه چاهک‌ها، ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون رقیق شده باکتری اضافه شد. بعد از پوشاندن چاهک‌ها با پارافیلیم، میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد و سپس نتایج *MIC* مورد مطالعه قرار گرفت. اولین چاهکی که هیچ رشدی از ارگانسیم مورد

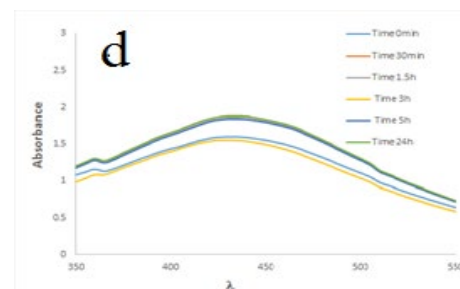
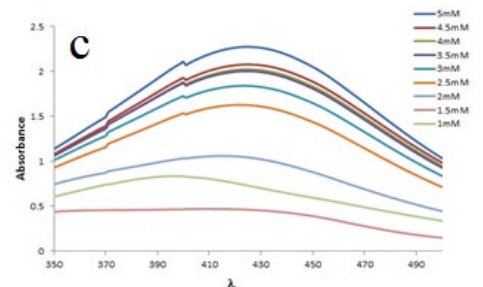
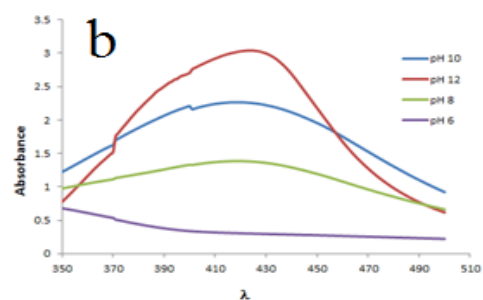
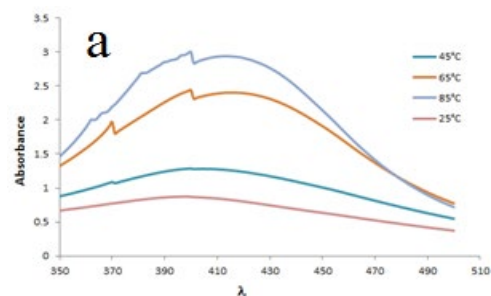
نظر را نشان ندهد، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی *MIC* گزارش شد. یکی از چاهک‌های انتهایی به‌عنوان کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری و بدون عصاره) و چاهک دیگر به‌عنوان کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) در نظر گرفته شد. سیپروفلوکساسین به‌عنوان ترکیب مرجع برای فعالیت‌های ضدباکتریایی در سویه‌ها با ATCC مورد استفاده قرار گرفت، سویه‌های جدا شده کلینیکی مقاومت در برابر چندین نوع از آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم را نشان دادند. استافیلوکوک اورئوس (*Staphylococcus aureus* ATCC27853)، آسیتوباکتر بائومانی (*Acinetobacter baumannii* ATCC29606)، پروتئوس می‌رابلیس (*Proteus mirabilis* ATCC25933)، انتروکوک فکالیس (*Enterococcus faecalis* ATCC29213)، اشرشیاکلی (*Escherichia coli* ATCC25922)، کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae* ATCC700603) و سودوموناس آئرژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) تمام ۷ باکتری جدا شده از نمونه بیماران (تراشه، ادرار، خون محیطی، زخم، خلط) از گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه شدند (۱۲، ۱۳).

سنجش حداقل غلظت کشندگی (*MBC, Minimum bactericidal concentration*)

برای انجام این تست، از اولین چاهکی که هیچ رشدی از ارگانسیم مورد نظر نشان نداده بود و ۳ تا ۴ چاهک بعدی نمونه برداشته و در محیط کشت مولر هیتتون آگار کشت داده شد. هر نمونه‌ای که هیچ رشدی در محیط نشان ندهد به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی (*MBC*) مطرح می‌شود. اگر *MIC* و *MBC* یک عدد مشترک را نشان داده یا حداکثر ۲ رقت تفاوت داشته باشند نشان‌دهنده باکتری کش بودن ترکیب مربوطه می‌باشد.

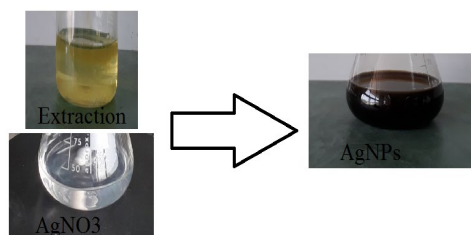
یافته ها

در نمودار شماره ۱، نتایج حاصل از ایتیم نمودن دمای واکنش آمده است. در این مطالعه چهار دما بررسی شد. دمای ۸۵ درجه سانتی گراد بیشترین جذب در طول موج حدود ۴۲۰ را نشان داد.



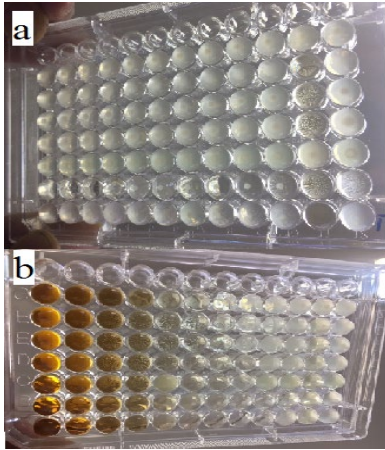
در نتایج حاصل از ایتیم نمودن، چهار pH بررسی شد. pH ۱۰ و ۱۲ مناسب بودند که pH ۱۲ به عنوان بهترین pH انتخاب شد. در نمودار شماره ۱c نتایج حاصل از ایتیم نمودن غلظت واکنش آمده است. در این مطالعه پنج غلظت بررسی شد. براساس میزان جذب، غلظت ۵ میلی مولار به عنوان بهترین غلظت برای ساخت مقادیر زیاد نانو ذرات انتخاب شد. در نمودار شماره ۱d، نتایج حاصل از ایتیم نمودن زمان واکنش آمده است. در این مطالعه زمان در پنج مرحله بررسی شد. طبق نتایج به دست آمده، ۳۰ دقیقه بعد از اتمام اضافه شدن محلول عصاره بهترین زمان برای تشکیل نانو نقره- عصاره بود، ضمن این که پایداری آن حداقل ۲ ماه بعد از تشکیل شدن نقره بررسی و تایید شد. در تصویر شماره ۱ نانوذرات نقره سنتز شده رنگ زرد قهوه‌ای تیره را در محلول آبی نقره مدیون پدیده رزونانس سطحی پلاسمون است. بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده توسط گیاه الزی در اندازه‌های مناسبی تشکیل شده‌اند و نتایج پراش اشعه ایکس (XRD) و SEM با هم تطابق دارند. بررسی‌های الگوی XRD در تصویر شماره ۲ آمده است.

پیک‌ها نشان دهنده این است که ساختار بلوری کمی نامنظم هستند. این الگو نشان دهنده این است که ناخالصی در نمونه بسیار ناچیز است و پیک‌ها منحصرًا متعلق به نانوذرات نقره هستند، اندازه ذرات مشابه نتایج SEM می‌باشد و اندازه ذرات بین ۴۵ تا ۵۰ نانومتر گزارش شد (نمودار شماره ۲).



تصویر شماره ۱: تغییر رنگ محلول واکنش پس از اضافه شدن عصاره زرد رنگ گیاه الزی به محلول بی رنگ نیترات نقره و تولید رنگ قهوه ای نانوذرات نقره

نمودار شماره ۱: طیف اشعه ماوراء بنفش سنتز نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره الزی برای بهینه سازی غلظت (a) درجه حرارت (b) pH (c) غلظت نیترات نقره (d) بهینه سازی زمان واکنش



تصویر شماره ۳: میکروپلیت ۹۶ خانه (a) عصاره الزی (b) MIC نانوقره سنتز شده

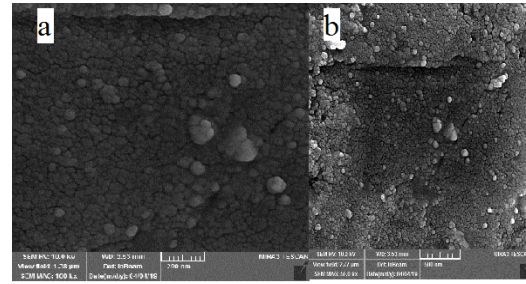
در مورد نانوذرات ساخته شده با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نتایج MIC نشان داد که نانوذرات به خصوص اثر ضدباکتریال قوی بر روی میکروارگانیزم پseudomonas آئروژینوزا دارد، همچنین بر روی استافیلوکوک اورئوس و اشرشیا کلای اثر مهارتی قابل قبولی نشان دادند (تصویر شماره ۳).

نتایج تست ضد میکروبی به تفصیل در جدول شماره ۱ آورده شده است.

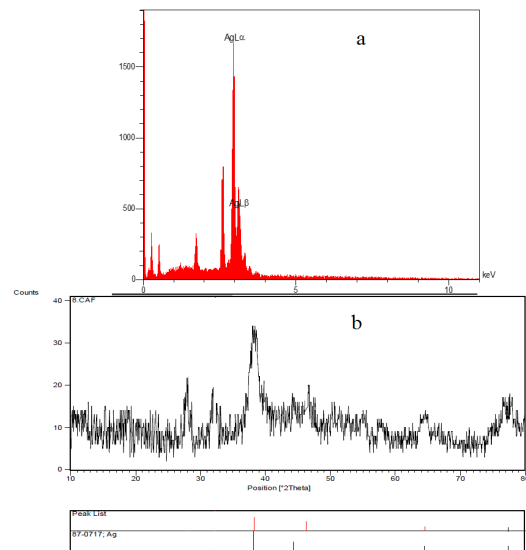
جدول شماره ۱: فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره بر روی سویه‌های ATCC

MBC (µg/ml) AgNPs	MIC (µg/ml) AgNPs	MIC of extraction (µg/ml)	Ciprofloxacin (µg/ml) MIC	ATCC	Bacteria
۳۰	۱/۸	>۴۰۰۰	۰/۲۱	ATCC 29213	<i>S. aureus</i>
۳۰	۱۵	>۴۰۰۰	۰/۲۱	ATCC 29212	<i>E. faecalis</i>
۷/۵	۱/۸	>۴۰۰۰	۵۱۲	ATCC27853	<i>P. aeruginosa</i>
۱۵	۴	>۴۰۰۰	۰/۲۵	ATCC 19606	<i>A. baumannii</i>
۱۵	۱/۸	>۴۰۰۰	۰/۱	ATCC 25922	<i>E. coli</i>
۳۰	۱/۸	>۴۰۰۰	۰/۱	ATCC700603	<i>K. pneumoniae</i>
۱۵	۴	>۴۰۰۰	۰/۱	ATCC 25933	<i>P. mirabilis</i>

برای بررسی اثرات کشندگی نانوذرات ساخته شده از عصاره الزی، کشت بر روی بلاگ آگار انجام شد که بعد از ۲۴ ساعت نتایج دیده شد و نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره الزی اثرات قوی کشندگی بر روی سودومونا آئروژینوزا دارند. اثرات کشندگی بر روی باکتری‌های آسینتوباکتر و اشرشیا کلای هم قابل توجه می‌باشد (تصویر شماره ۴).



تصویر شماره ۴: میکروگراف SEM از نانو ذرات نقره سنتز شده

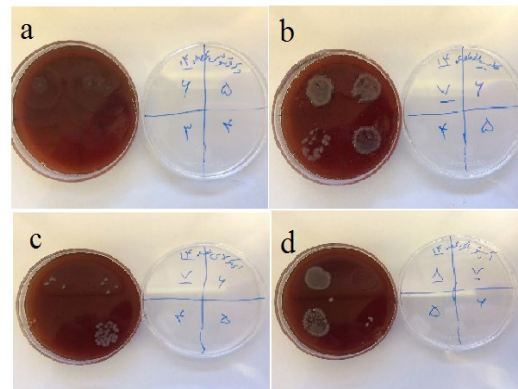


نمودار شماره ۴: (a) نمودار EDS (b) تصویر XRD از نانو ذرات نقره سنتز شده

بررسی‌های طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS) نانوذرات نقره در نمودار شماره ۲ آمده است. باتوجه به این که استاندارد ما در این آنالیز نقره بود، پیک شناسایی شده نشان از تشکیل نانوذرات نقره است و ارتفاع پیک‌ها هم نشان دهنده غلظت قابل توجه نانوذرات نقره می‌باشد. بر طبق داده‌ها درصد ناخالصی‌ها بسیار ناچیز بوده و میزان زیادی از نمونه مربوط به نانوذرات نقره است، پیک استاندارد نقره مشاهده شده قابل تطبیق با سایر گزارشات و مقالات ارائه شده است. اثر ضد میکروبی گیاه الزی به تنهایی با غلظت ۴۰۰۰ µg/m بر روی باکتری‌های مورد مطالعه بررسی شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت در تمام چاهک‌ها رشد باکتری‌ها قابل مشاهده بود (تصویر شماره ۳).

شده با عصاره نعناع، کم تر است. در مورد MIC استرپتوکوکوس موتانس، نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره شیرین بیان به طرز معنی داری از میزان MIC نانو ذرات بیوسنتز شده با عصاره نعناع، کم تر است ولی MBC تفاوت معنی داری ندارد. در مورد اکتینومیسس ویسکوز میزان MIC و MBC برای نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره شیرین بیان به طور معنی داری از میزان MIC و MBC نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره نعناع، کم تر است (۱۵).

تولید نانوذرات نقره در غلظت‌های مختلف نیترا ت نقره، دما، pH و زمان تماس با استفاده از طیف سنجی UV-Vis با اندازه گیری میزان جذب باندرزونانس پلاسمون سطحی (SPR) مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا با افزایش غلظت $AgNO_3$ از ۱ به ۵ میلی مولار، شدت باند SPR افزایش یافت. افزایش جذب در غلظت‌های بالاتر $AgNO_3$ نشان می‌دهد که برای تشکیل نانوذرات پایدار، یک غلظت بهینه لازم است. به منظور مشاهده تأثیر دما در ایجاد نانونقره‌ها، دمای واکنش از ۲۵ تا ۸۵ درجه سانتی گراد متغیر شد که دیده شد با افزایش دما شدت باند SPR نیز افزایش یافته است. برای مشاهده تأثیر pH در ایجاد و پایداری نانوذرات، واکنش در pH های مختلف اعم از ۶ تا ۱۲ با تنظیم با ۲ میلی مولار سدیم در محیط عصاره انجام شد. نانوذرات سنتز شده با افزایش pH افزایش می‌یابد. نانوذرات نقره‌ای جذب و قله‌های باریک را در بالاتر (pH 12) نمایش می‌دهند، که ممکن است به دلیل شکل گیری نانونقره‌های کوچک و متراکم و کوچک باشد (۱۸-۱۶). در مطالعه حاضر، سنتز سبز نانوذرات نقره از تصاویر SEM وجود نانوذرات شکل کروی را نشان داد. مطالعه XRD از آن‌ها، دو قله پراش در $38/3$ درجه و $42/6$ درجه از صفحات ساختار کریستالی نقره فلزی، مشاهده شد. طیف پروفایل EDS از نانو نقره سنتز شده یک سیگنال قوی Ag همراه با قله کربن ضعیف است، که از زیست مولکول‌ها ساخته شده است (۲۰، ۱۹).



تصویر شماره ۴: پلیتهای بلاد آگار (a) *P. aeruginosa* (b) *E. faecalis* (c) *K. pneumoniae*. (d) *P. mirabilis*

بحث

در مطالعه‌ای که توسط *Manish.R.Donda* و *Karunakar Rao Kudie securinega leucopyrus* همکارانش انجام شده، نانو ذرات نقره از عصاره برگ و میوه *securinega leucopyrus* به طور جداگانه ساخته شد. میکروگراف‌های به دست آمده توسط SEM نشان داد که ذرات، شکلی کروی تا کشیده دارند و برای آنالیز المنتال نمونه بررسی با EDX به کار گرفته شد. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که بیشترین جزء تشکیل دهنده، نقره المنتال می‌باشد. برای سنجش اثر ضد میکروبی این نانو ذرات در روش بررسی اندازه ناحیه مهارتی (Inhibitory zone) از آمپی سیلین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در نهایت نتایج نشان دادند که نانو ذرات به دست آمده اثرات ضد باکتریایی قابل توجهی روی باکتری‌های گرم منفی و هم چنین باکتری‌های گرم مثبت دارند (۱۴).

در مطالعات دیگری نتایج میکروبراث دایلوشن، میزان MIC و MBC (بر حسب میکرو گرم بر میلی لیتر) و سطح معنی داری آن برای نانوذرات بر روی سه گونه باکتری نشان داده شد است. کوچک تر بودن میزان MIC و MBC به معنی بالاتر بودن اثر ضد باکتریایی است. در مورد لاکتوباسیل میزان MIC و MBC برای نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره شیرین بیان به طور معنی داری از میزان MIC و MBC نانوذرات بیوسنتز

بر میلی لیتر گزارش شده است به ترتیب نانوقره‌های سنتز شده ما رشد این دو باکتری را در ۱ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان مقدار MIC نشان دادند. *E. coli* و *K. pneumoniae* جدا شده از ادرا که به کربانم‌ها مقاوم بودند، MIC کلستین سولفات ۱۲۸ و ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد، اما در گزارش ما MIC به ترتیب ۱۶ و ۲ میکروگرم بر میلی لیتر دیده شد. اگرچه *P. mirabilis* جدا شده از ادرا برای ایمی پنم و مروپنم با MIC ۲ و ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر مقاومت داشته باشد، نانوقره‌های سنتز شده با MIC ۲ میکروگرم بر میلی لیتر اثر داشتند. *E. fecalis* جدا شده از محیط برای آمپی سیلین، ونکومایسین، تیوکالانین، اریترومایسین، تتراسایکلین، لووفلوکسازین و کانامایسین حساس نبود اما می‌تواند به جنتامایسین حساس باشد و می‌تواند توسط نانوذرات‌های سنتز شده ما با مقدار ۴ میکروگرم در میلی لیتر مهار شود. در همه آن‌ها MBCها به عنوان کم‌ترین غلظتی که رشد باکتری بر روی پلیت‌های بلاد آگار مشاهده نشد، تعیین شد و در جداول شماره ۱ و ۲ آورده شدند.

فعالیت ضد باکتریایی یکی از ویژگی‌های شناخته شده نانوذرات نقره است. مکانیسم فعالیت ضد باکتریایی در مطالعات متعددی گزارش شده است:

الف) نانوقره‌ها به غشای سلول باکتری‌ها متصل شده و سوراخ می‌شوند تا عملکرد و نفوذپذیری و تنفس سلول را به هم ریخته و در نتیجه سلول‌ها را نابود کنند.

در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از گیاه الزی بررسی شد و نتایج نشان دادند که این نانوذرات توانایی در مقایسه با سیپروفلوکسازین (به عنوان یک آنتی بیوتیک رایج)، با اثرات بالقوه‌ای در مهار رشد و کشندگی باکتری‌های *E. coli*، *K. pneumoniae*، *P. aeruginosa*، *E. faecalis*، *S. aureus*، *A. baumannii*، *P. mirabilis* دارا می‌باشند. از این بین بهترین اثر در مهار رشد و کشندگی سودوموناس دیده شد. نانوذرات سنتز شده با گیاه الزی اثرات خوبی بر روی آسینتوباکتر و همچنین بر روی اشرشیاکلی دارند. در بررسی جامع‌تر در مطالعه ما، ۷ باکتری جدا شده بالینی نیز برای بررسی حساسیت در برابر نانوذرات نقره انتخاب شدند (جدول شماره ۲).

از این نظر *S. aureus* که از تراشه جدا شده بود مقاوم به متی سیلین، آگراسیلین، پنی سیلی، جنتامایسین، سیپروفلوکسازین، سفتازیدیم، اریترومایسین، کلیندامایسین، آمیکاسین و اما حساس به وانکومایسین است. نانوذرات سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه الزی در *S. aureus*، با MIC ۲ میکروگرم بر میلی لیتر اثر ضد باکتریایی را نشان داد.

MIC از *P. aeruginosa* و *A. baumannii* که از زخم و خلط جدا شده‌اند، وجود ژن‌های کدکننده آنزیم‌های کاربامپناز OXA-23 و OXA-24 تأیید شده است. از آن‌جا که کربانم‌ها آخرین خط درمان هستند و مقدار MIC برای کلستین سولفات در ۲۵۶ و ۸ میکروگرم

جدول شماره ۲: فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره بروی سویه‌های جداشده از کلینیک و مقاوم به درمان

Susceptibility to antimicrobial agents									Treatment with NPs			Bacteria	
MC	VC	OC	TC	GM	PC	CIF	CEZ	ERM	CM	AK	MIC AgNPs (µg/ml)		MBC AgNPs (µg/ml)
R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	۲	۱۲۵	<i>S. aureus</i>
R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	۴	۱۲۵	<i>E. fecalis</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	۱	۲	<i>P. aeruginosa</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	۲	۶۲.۵	<i>E. coli</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	۱۶	۶۲.۵	<i>K. pneumoniae</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	۱	۳۱	<i>A. baumannii</i>
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	۲	۶۲.۵	<i>P. mirabilis</i>

MC: Meticillin; VC: Vancomycin; OC: Oxacillin; TC: Tetracycline; GM: Gentamicin; PC: Penicillin;
CIF: Ciprofloxacin; CEZ: Cefazidime; ERM: Erythromycin; CM: Clindamycin; AK: Amikacin. R, resistant; S: sensitive.

این مسیر واکنش همه شرایط یک فرآیند شیمیایی سبز را نشان می‌دهد. مطالعه حاضر روشی نوآورانه برای سنتز نانونقره‌های ضد میکروبی با استفاده از محصولات طبیعی را نشان می‌دهد که می‌توانند در مصارف مختلف زیست پزشکی استفاده شوند. از این رو، نانونقره‌های سنتز شده می‌توانند از پتانسیل بالایی برای استفاده در کاربردهای بیولوژیکی برخوردار باشند. نتایج تأیید کرد که *A. paradoxum* یک منبع بسیار خوب زیست محیطی و غیر سمی برای سنتز سبز AgNP ها در مقایسه با روش‌های شیمیایی / فیزیکی معمولی است.

سپاسگزاری

این کار تحقیقاتی حاصل پایان نامه دوره دکترای داروسازی خانم ترمه رنجبر با کد اخلاق IR.MAZUMS..REC.1396.1310 می‌باشد. بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی واحد رامسر تشکر می‌گردد.

References

- Gengenbacher M, Dick T. Antibacterial drug discovery: doing it right. *Chem Biol* 2015; 22(1): 5-6.
- Docquier JD, Mangani S. An update on β -lactamase inhibitor discovery and development. *Drug Resist Updat* 2018; 36: 13-29.
- González-Bello C. Antibiotic adjuvants-A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. *Bioorg Med Chem Lett* 2017; 27(18): 4221-4228.
- Srikar SK, Giri DD, Pal DB, Mishra PK, Upadhyay SN. Green synthesis of silver nanoparticles: a review. *Green and Sustainable Chemistry* 2016; 6(1): 34-56.
- Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine* 2010; 6(2): 257-262.
- Kora AJ, Arunachalam J. Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanism of action. *World J Microbiol Biotechnol* 2011; 27(5): 1209-1216.
- Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 2009; 27(1): 76-83.
- Hebeish A, ElNaggar M, Fouda M, Ramadan M, Al-Deyab S, El-Rafie M. Highly effective antibacterial textiles containing green synthesized silver nanoparticles. *Carbohydr. Polym* 2011; 86(2): 936-940.
- Ebrahimzadeh MA, Tafazoli A, Akhtari J, Biparva P, Eslami S. Engineered silver nanoparticles, A new nanoweapon against cancer. *AntiCancer Agents Med Chem* 2018; 18(14): 1962-1969.
- Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM, Eslami B. Antihemolytic and antioxidant

- activities of *Allium paradoxum*. Cent Eur J Biol. 2010;5(3):338-345.
11. Ebrahimzadeh MA, Taheri MM, Ahmadpour E, Montazeri M, Sarvi S, Akbari M, et al. Anti-Toxoplasma Effects of Methanol Extracts of *Feijoa sellowiana*, *Quercus castaneifolia*, and *Allium paradoxum*. J Pharmacopuncture 2017; 20(3): 220-226.
 12. Celiktas OY, Kocabas EH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser KH. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chem 2007; 100(2): 553-559.
 13. Yang J, Pan J. Hydrothermal synthesis of silver nanoparticles by sodium alginate and their applications in surface-enhanced Raman scattering and catalysis. Acta Mater 2012; 60(12): 4753-4758.
 14. Khan A, El-Toni AM, Alrokayan S, Alsalhi M, Alhoshan M, Aldwayyan AS. Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using poly-N-isopropylacrylamide/acrylic acid microgel particles. Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp 2011; 377(1-3): 356-360.
 15. Alarcon EI, Udekwu K, Skog M, Pacioni NL, Stamplecoskie KG, González-Béjar M, et al. The biocompatibility and antibacterial properties of collagen-stabilized, photochemically prepared silver nanoparticles. Biomaterials 2012; 33(19): 4947-4956.
 16. Song JY, Kim BS. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. Bioprocess Biosyst Eng 2009; 32(1): 79-84.
 17. Krishnaraj C, Jagan EG, Ramachandran R, Abirami SM, Mohan N, Kalaichelvan PT. Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. Process Biochem 2012; 47(4): 651-658.
 18. Singh C, Sharma V, Naik PK, KHandelwal V, Singh H. A green biogenic approach for synthesis of gold and silver nanoparticles using *Zingiber officinale*. Dig J Nanomater Bios 2011; 6(2): 535-542.
 19. Kumar V, Yadav SK. *Plant mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications*. J Chem Technol Biotechnol 2009; 84(2): 151-157.
 20. Edison TJ, Sethuraman MG. Biogenic robust synthesis of silver nanoparticles using *Punica granatum* peel and its application as a green catalyst for the reduction of an anthropogenic pollutant 4-nitrophenol. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2013; 104: 262-264.