



## سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از اکالیپتوس کامالدولنسیس و بررسی اثرات ضدباکتریایی آن

سمانه دولت آبادی<sup>۱\*</sup>، شکوفه عمرانی<sup>۲</sup>، الناز مهرافروز<sup>۲</sup>، راحله ژبانی<sup>۳</sup>

۱- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

۲- کارشناسی ارشد، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

۳- دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

### چکیده

#### مقدمه

با توجه به گسترش نگران کننده مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی نسبت به عوامل ضد میکروبی کلاسیک، استفاده از روش نوین درمانی برای مبارزه با عوامل بیماری‌زای مقاوم ضروری به نظر می‌رسد. مطالعه حاضر به منظور سنتز نانوذرات نقره بوسیله عصاره آبی گل اکالیپتوس کامالدولنسیس (*Eucalyptus camaldulensis*) و بررسی اثر ضد باکتریایی آنها انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

ما از یک روش بیوسنتز خارج سلولی سازگار با محیط زیست یعنی عوامل احیاکننده عصاره آبی گل اکالیپتوس کامالدولنسیس برای تولید نانوذرات نقره استفاده کردیم. تولید نانوذرات نقره با استفاده از تغییر رنگ، طیف سنجی فرابنفش، الگوی پراش اشعه ایکس و میکروسکوپ الکترونی نگاره تایید گردید. فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره حاصل در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، با روش‌های میکروبروت دایلوشن و حداقل غلظت کشنده باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت.

#### یافته‌ها

وجود نانوذرات نقره توسط حداکثر میزان جذب در ۴۱۳ nm، تغییر رنگ تا قهوه‌ای تیره، طیف سنجی مادون قرمز و الگوی پراش اشعه ایکس تایید گردید. میانگین اندازه نانوذرات بین ۶۷-۸۰ nm اندازه‌گیری شد. در نهایت حداقل غلظت مهارت رشد و حداقل غلظت کشندگی بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۳/۱۲ و ۶/۲۵، باسیلوس سوبتیلیس ۶/۲۵ و ۶/۲۵ و سودوموناس آئروجینوزا ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml اندازه‌گیری شد.

#### نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده به وسیله عصاره آبی گل اکالیپتوس کامالدولنسیس فعالیت ضدباکتریایی خوبی در برابر باکتری‌های آزمایش شده داشته و می‌توانند در زمینه‌های مختلف به عنوان یک عامل ضدباکتری استفاده شوند. انجام مطالعات بیشتری برای بیان اثر سمیت این ذرات ضروری به نظر می‌رسد.

#### کلیدواژه‌ها

*Eucalyptus camaldulensis*، سنتز سبز، نانوذرات نقره، اثرات ضدباکتریایی

### مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۱۳

تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۹

\*نویسنده مسئول: سمانه دولت آبادی  
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه،  
واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی،  
نیشابور، ایران

تلفن: ۰۵۱-۴۲۶۲۱۹۰۱

پست الکترونیک:

S\_dolatbadi1436@yahoo.com



سیمن، کاتکول، تانن‌ها، ترپن‌ها، ایزوپرنوئیدها، فنولیک‌ها، کاردیا گلیکوزیدها، استرول‌ها، ساپونین‌ها و فلاونوئیدها ترکیبات فیتوشیمیایی شناسایی شده در گل‌های اکالیپتوس کامالدولنسیس هستند (۵ و ۴). ترکیبات این گیاه، فعالیت ضد میکروبی علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها از جمله کلبسیلا، یرسینیا انتروکولیتیکا، سالمونلا تیفی موریوم، شیگلا دیسانتری، باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئروژینوزا و قارچ کاندیدا آلبیکنس از خود نشان داده است (۷ و ۶).

یکی از زمینه‌های کاربردی نانوبیوتکنولوژی، استفاده از نانوذرات نقره به عنوان راهکاری نوین در درمان عفونت‌های میکروبی همراه با آنتی‌بیوتیک است. نانوبیوتکنولوژی یک فناوری تواناست که با موادی در مقیاس نانومتر در زمینه‌های علمی مختلف مانند بیوتکنولوژی، نانوتکنولوژی، فیزیک، شیمی و علم مواد سر و کار دارد. در این مقیاس، تفاوت‌های قابل توجهی در بسیاری از خواص مواد دیده می‌شود که به طور معمول در مقیاس بزرگتر به چشم نمی‌آید. خواص منحصر به فرد فیزیکوشیمیایی و اپتوالکترونیکی نانوذرات، برای تعدادی از برنامه‌های کاربردی اعم از کاتالیزورها، حسگرهای شیمیایی، قطعات الکترونیکی، تصویربرداری تشخیصی پزشکی، محصولات دارویی، و پروتکل‌های درمانی پزشکی نیز خواص ویژه هستند. به عنوان مثال، نانوذرات فلزی تولید شده از فلزات گرانبها مانند طلا، نقره، پلاتین و پالادیوم به طور گسترده در محصولاتی مانند لوازم آرایشی و بهداشتی، پزشکی و داروسازی استفاده شده است. نانوذرات طلا به صورت گسترده در کاربردهای زیست پزشکی (۹ و ۸)، تشخیص بیماری (۱۰)، و مواد دارویی (۱۱ و ۱۲) استفاده شده است. نانوذرات نقره نیز به عنوان یک ماده بازدارنده رشد و ضد

با توجه به استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت باکتری‌ها به این ترکیبات روز به روز در حال افزایش است که این مسأله باعث می‌شود تا بشر به فکر جایگزین کردن عوامل ضد میکروبی مؤثر و با عوارض جانبی کمتر به جای مواد ضد میکروبی با اثر کمتر و عوارض ناخواسته بیشتر باشد (۱). شیوع نسبتاً بالای عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا و همچنین اثرات جانبی آنتی‌بیوتیک‌های رایج علاوه بر ظهور سویه‌هایی با مقاومت‌های چند گانه<sup>۱</sup>، استفاده از روش‌های نوین در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها را توصیه می‌کند. بنابراین جستجو، اصلاح و توسعه در ترکیبات ضد میکروبی که پتانسیل ضد باکتریایی علیه باکتری‌هایی با مقاومت‌های چند گانه دارند، بخشی مهم و دارای اولویت پژوهشی است.

بروز این سویه‌ها و توانایی باکتری‌ها در ایجاد عفونت‌های حاد سبب شده است تا علاقه مجددی به گیاهان به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی آنها به وجود آید. گیاهان به علت فراوانی و عدم نیاز به شرایط و مواد غذایی خاص برای رشد، گزینه‌ای مناسب برای سنتز سبز نانوذرات محسوب می‌شوند (۲).

اکالیپتوس کامالدولنسیس یکی از معروف‌ترین گیاهان دارویی متعلق به خانواده موردیان است که از دیرباز از آن برای درمان گلودرد و دیگر عفونت‌های تنفسی و ادراری استفاده می‌شود (۳) و اثرات ضد میکروبی و خواص دیگر آن مورد توجه بوده است. این گیاه منبع غنی از پلی‌فنل‌ها و ترپنوئیدها بوده است و ترکیبات مهم به ویژه سینئول، کومینال، فلاندرن، آرومادندرال، والرآلدهید، ژرانیول،

<sup>۱</sup>Multi-Drug Resistance: MDR



در فرآیند بیوسنتز نانوذرات نقره) لذا در این مطالعه از عصاره گل اکالیپتوس کامالدولنسیس برای احیای یون های نقره که در محلول نیترات نقره وجود دارند، استفاده گردید. ما در این پژوهش یک روش سازگار با محیط زیست برای تولید نانوذرات نقره با استفاده از بیوسنتز خارج سلولی را بررسی نمودیم. یکی دیگر از اهداف مطالعه این بود که حداقل غلظت مهارتی<sup>۹</sup> و حداقل کشندگی<sup>۱۰</sup> نانوذرات نقره بیوسنتتیک را در برابر برخی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی بیابیم.

### مواد و روش ها

گل های اکالیپتوس کامالدولنسیس از خراسان رضوی تهیه شد و سپس در هر بار یوم گیاهی دانشگاه فردوسی مورد بررسی و تایید قرار گرفت. پس از جمع آوری گیاهان، گل ها در شرایط مناسب و در سایه خشک و سپس جهت تهیه عصاره، پودر گردیدند. نیترات نقره و محیط کشت های مولر هینتون آگار و مولر هینتون برات (MERCK, Germany) تهیه شدند.

### سویه های باکتریایی و محیط های کشت

دو باکتری های گرم مثبت (*S. aureus* (PTCC 1431) و *B. subtilis* (PTCC 1247) و یک باکتری گرم منفی (*P. aeruginosa* (PTCC1573) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. باکتری ها در شرایط استریل بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند.

### بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی

عصاره آبی اکالیپتوس کامالدولنسیس با مخلوط کردن ۱۰g از نمونه گل خشک در ۱۰۰ ml آب مقطر آماده شد. مخلوط به مدت ۷۲ ساعت بر روی دستگاه شیکر به آرامی مخلوط گردیده تا استخراج به خوبی صورت گیرد. محلول از فیلتر کاغذی واتمن شماره ۱ (اندازه منافذ ۱۲۵ mm)

باکتری، کاملا شناخته شده اند و دارای دو خاصیت ضد باکتریایی و ضد التهاب هستند که می تواند در بهبود سریع تر زخم موثر باشند.

روش های سنتز بیولوژیک می توانند از سنتز خارج سلولی میکروارگانیسم هایی مانند باکتری ها و قارچ ها یا عصاره های گیاهی برای تولید نانوذرات استفاده کنند. به تازگی، فرآیندهای سبز برای سنتز نانوذرات در حال تبدیل شدن به یک شاخه مهم از نانو تکنولوژی هستند (۱۴ و ۱۳). سنتز نانوذرات با روش های بیولوژیک یک روش پاک، غیرسمی و سازگار با محیط زیست است که سنتز نانوذرات با طیف گسترده ای از اندازه، شکل، ترکیب و خواص فیزیکوشیمیایی را پیشنهاد می کند (۱۵). مطالعات قبلی نشان می دهد که نانوذرات نقره از عصاره گل های زیزیفوس اسپینا کرسیتی<sup>۱</sup> (۱۶)، کاتارانتوس روزئوس<sup>۲</sup> (۱۷)، اکالیپتوس چاپمانیانا<sup>۳</sup> (۱۸)، اکالیپتوس گلوبوس<sup>۴</sup> (۱۹)، اکالیپتوس<sup>۵</sup> (۲۰)، کاملیا سینسی<sup>۶</sup> (۲۱)، عصاره پودر دانه کومینوم سیمیموم<sup>۷</sup> (۲۲) و غیره به دست آمده است. علاوه بر این از عصاره اتانولی اکالیپتوس کامالدولنسیس به عنوان یک عامل احیا کننده طبیعی در تشکیل نانوذرات مخلوط طلای مگنتیت با اندازه بین ۶-۲۰ نانومتر استفاده شده است (۲۳). در این مطالعه، از اکالیپتوس کامالدولنسیس به عنوان عامل احیا کننده در بیوسنتز سازگار با محیط زیست نانوذرات نقره از نیترات نقره<sup>۸</sup> در دمای اتاق استفاده گردید.

باتوجه به اینکه فلاونوئیدها نقش مهمی در عصاره اکالیپتوس کامالدولنسیس دارند (یعنی نقش احیا کنندگی

<sup>۱</sup>*Ziziphus Spina-christi* L

<sup>۲</sup>*Catharanthus roseus*

<sup>۳</sup>*Eucalyptus chapmaniana*

<sup>۴</sup>*Eucalyptus globulus*

<sup>۵</sup>*Eucalyptus*

<sup>۶</sup>*Camellia sinensis*

<sup>۷</sup>*Cuminum cyminum*

<sup>۸</sup>AgNO<sub>3</sub>

<sup>۹</sup>Minimum Inhibitory Concentration: MIC

<sup>۱۰</sup>Minimum Bactericidal Concentration: MBC



میکروسکوپ الکترونی نگاره پودرنانوذرات نقره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی JEOL مدل JSM 6390 انجام شد (۲۰،۲).

#### پراش اشعه ایکس

برای تایید نتایج، نانوذرات نقره هدف پراش اشعه ایکس<sup>۴</sup> قرار گرفتند (فیلیپس-آلمان)، که این کار به منظور کریستالوگرافی ساختاری از یک نمونه خشک شده می باشد. محلول واکنش به وسیله دستگاه خشک کن به صورت پودر درآمد. پس از آماده سازی نمونه بر روی بستر شیشه‌ای اسکن با زاویه  $2\theta$  و محدوده اسکن  $50-90^\circ$  درجه انجام شد (۲۰،۲).

#### بررسی خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده

نانوذرات نقره‌ای که با استفاده از عصاره گل اکالیپتوس کامالدولنسیس سنتز شدند، برای بررسی فعالیت ضد میکروبی در برابر سه نوع باکتری بیماری‌زا از جمله سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس و با استفاده از روش رقت‌سازی استاندارد (CLSI M07-A8) مورد آزمایش قرار گرفتند. حداقل غلظت مهارتی در پلیت میکروتیتر ۹۶ خانه و با استفاده از مولر هینتون برات تعیین شد. سویه‌ها در محیط مولر هینتون برات و در دمای  $37^\circ\text{C}$  به مدت یک شب کشت داده شدند سپس سوسپانسیون باکتریایی برابر با کدورت استاندارد  $0.5$  مک فارلند از آنها تهیه شد ( $10^8$  CFU در هر میلی لیتر). در این روش جهت تعیین نسبی حداقل غلظتی که باعث مهار رشد باکتری‌ها و حداقل غلظتی که باعث مرگ باکتری‌ها می‌گردد سریال‌های  $12/5 - 25 - 50 - 100 - 200 - 400$  mg/ml -  $6/25 - 3/12 - 1/56 - 0/75$  از نانوذرات نقره تهیه

عبور داده شد تا عصاره از مخلوط جدا شود. برای سنتز نانوذرات نقره، ۱۲ ml عصاره آبی گل اکالیپتوس کامالدولنسیس با ۸۸ ml از محلول نترات نقره (۱ میلی مولار) مخلوط شده و به منظور انجام واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرارداد شده. محلول نانوذرات نقره تا زمان بررسی بیشتر در دمای  $4^\circ\text{C}$  ذخیره گردید.

#### تایید تولید نانوذرات نقره

#### بررسی طیفی قابل مشاهده - فرابنفش<sup>۱</sup>

اسپکتروفوتومتر قابل مشاهده - فرابنفش یک تکنیک مهم برای تجزیه و تحلیل نانوذرات سنتز شده است. پس از تغییر رنگ مخلوط واکنش به قهوه‌ای تیره، میزان سنتز نانوذرات نقره توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر جذبی قابل مشاهده - فرابنفش در طول موج  $200-800$  nm مشخص شد (۲۰،۲).

#### بررسی طیف سنجی مادون قرمز<sup>۲</sup> نانوذرات نقره

برهمکنش‌ها در مخلوط واکنش با روش طیف سنجی مادون قرمز مورد بررسی قرار گرفت. طیف سنجی مادون قرمز به منظور شناسایی گروه‌های مختلف عملکردی و بیومولکول‌های مسئول احیای یونهای نقره انجام می‌شود. طیف سنجی مادون قرمز با پودر نمونه (خشک شده) با استفاده از دستگاه پروکر (مدل تنسور ۷) انجام شد (۲۰،۲).

#### میکروسکوپ الکترونی نگاره

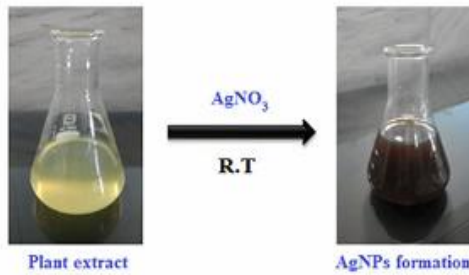
خصوصیات مورفولوژیکی نانوذرات نقره سنتز شده، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره<sup>۳</sup> بررسی شد. یک قطره از نمونه سوسپانسیونی نانوذرات بر روی گرید فیلم کربنی قرار داده شد و پس از خشک شدن، بررسی

<sup>۱</sup>UV-Visible

<sup>۲</sup> Fourier-Transform Infrared Spectroscopy: FTIR

<sup>۳</sup>Transmission Electron Microscope: SEM

<sup>۴</sup>XRD

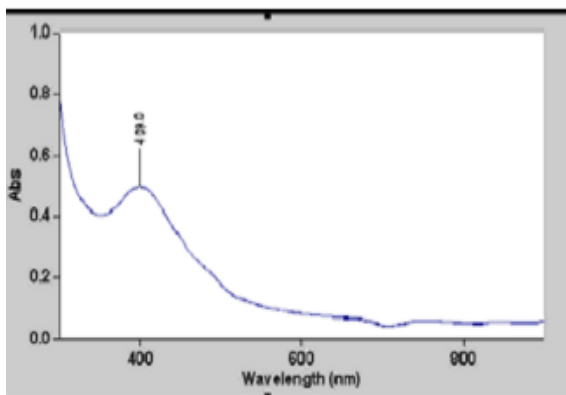


شکل ۱- تایید سنتز نانوذرات نقره با تغییر رنگ محلول به قهوه ای تیره

### تایید سنتز نانوذره با روش اسپکتروفتومتری -

#### فرابنفش

در این مطالعه نظارت بر فرآیند احیای زیستی یون نقره به نانوذرات نقره توسط طیف سنجی قابل مشاهده- فرابنفش انجام شد. طیف سنجی قابل مشاهده- فرابنفش می‌تواند برای تشخیص و کنترل اندازه و شکل نانوذرات در سوسپانسیون مایع استفاده گردد (شکل ۲).



شکل ۲- طیف سنجی قابل مشاهده- فرابنفش نانوذرات نقره تشکیل شده از عصاره گل اکالیپتوس کامالدولنسیس

### تایید سنتز نانوذرات با روش طیف سنجی مادون

#### قرمز

به منظور شناسایی گروه‌های عملکردی که مسئول محدود کردن و تثبیت نانوذرات نقره هستند، آنالیز طیف سنجی مادون قرمز بین  $400$  و  $7800$   $\text{cm}^{-1}$  انجام شد. نتیجه طیفی نشان داده شده (شکل ۳)، مربوط به نانوذرات نقره

گردید. به هر چاهک  $100 \mu\text{l}$  از سوسپانسیون باکتریایی (هر کدام از باکتری‌ها به صورت جداگانه) که در بالا گفته شد و  $100 \mu\text{l}$  از هر کدام از غلظت‌های نانوذره به ترتیب کاهش غلظت به چاهک مربوطه اضافه شد. حداقل غلظت مهاری نانوذرات نقره علیه سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس در محیط مولر هینتون براث با روش استاندارد (۲۴) تعیین شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در  $37^\circ\text{C}$  جذب نوری<sup>۱</sup> هر چاهک در  $600 \text{ nm}$  با استفاده از اسپکتروفتومتر دو پرتویی اندازه‌گیری شد. از عصاره آبی گل اکالیپتوس کامالدولنسیس نیز به عنوان کنترل استفاده گردید. حداقل غلظت مهاری یعنی کمترین غلظتی از عوامل ضد میکروبی که بتواند رشد ۹۹٪ از ارگانیسم‌ها را مهار کند. پس از تعیین حداقل غلظت مهاری از نانوذرات نقره،  $10 \mu\text{l}$  از چاهکی که هیچ رشد قابل مشاهده از باکتری را نشان نداد در پلیت حاوی مولر هینتون آگارکشت داده شد به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  انکوبه شدند، این پلیت کاملاً فاقد نانوذرات نقره بود. حداقل غلظت کشندگی به معنی حداقل غلظت عامل ضد میکروبی مورد نیاز برای کشته شدن ۹۹/۹٪ از جمعیت باکتریایی اولیه می‌باشد (۲۵).

#### یافته‌ها

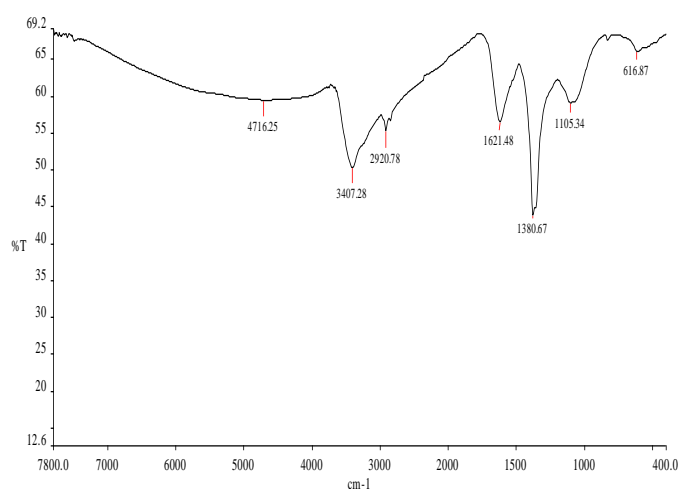
### نتایج سنتز نانوذرات

در این پروژه، نانوذرات نقره به عنوان یک عامل ضد میکروبی به صورت بیولوژیک سنتز شد. سنتز نانوذرات نقره از محلول نیترات نقره با استفاده از گل اکالیپتوس کامالدولنسیس با تغییر رنگ محلول از بی‌رنگ به قهوه‌ای که نشان دهنده تشکیل نانوذرات نقره است، مشخص شد (شکل ۱).

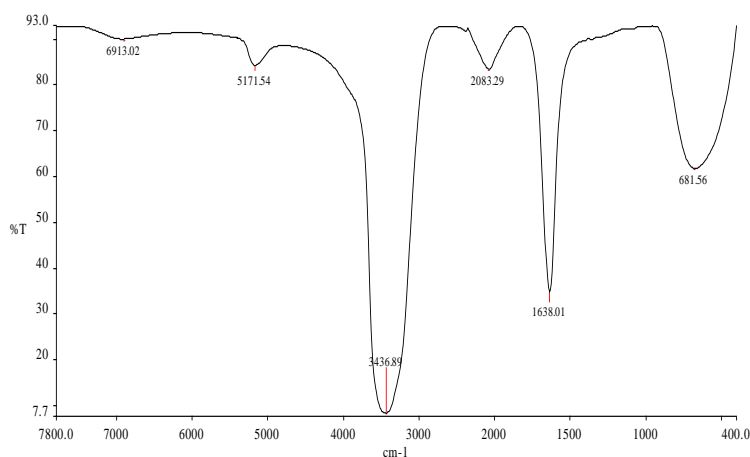
<sup>۱</sup>Optical Density: OD

ثبیت کننده احتمالی که به تشکیل نانوساختارهای یون نقره کمک می‌کردند، شناسایی شدند و در طیف سنجی مادون قرمز نشان داده شده‌اند ( شکل ۳ ). مقایسه دو طیف نشان از کاهش شدت پیک CO در طیف نانوذرات (شکل ۳) نسبت به  $1638 \text{ cm}^{-1}$  در (شکل ۴) دارد که نشان می‌دهد ثبیت سیستم ممکن است ناشی از اتصال گروه کربونیل قندهای احیاکننده به نقره باشد (۲۷).

در عصاره گل می‌باشد در حالیکه شکل ۴ عصاره اکالیپتوس کامالدولنسیس معمولی را نشان می‌دهد. پیک گسترده در  $3436 \text{ cm}^{-1}$  می‌تواند به علت پیوند OH باشد (شکل ۴). به نظر می‌رسد، تشکیل پیک در  $1638 \text{ cm}^{-1}$  به علت پیوند C=O در گروه کربونیل باشد. همچنین فقدان پیک گسترده در  $2083 \text{ cm}^{-1}$  به حالت پیوند O-C مربوط می‌شود (۲۶). این مولکول‌های زیستی به عنوان گروه‌های



شکل ۳- بررسی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گل اکالیپتوس کامالدولنسیس با روش طیف سنجی مادون قرمز



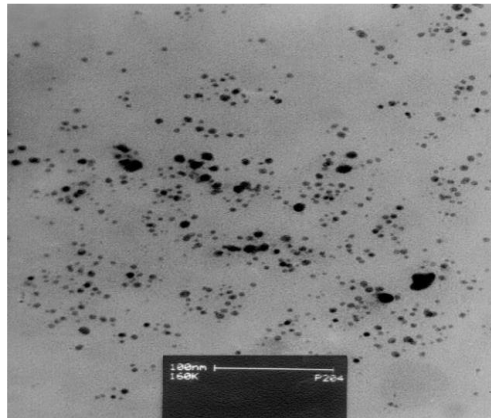
شکل ۴ - بررسی عصاره گل اکالیپتوس کامالدولنسیس با روش طیف سنجی مادون قرمز



### تایید سنتز نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره

نانوذرات تقریباً کروی است (شکل ۵). اندازه متوسط نانوذرات بین ۶۷-۸۰ نانومتر مشاهده شد.

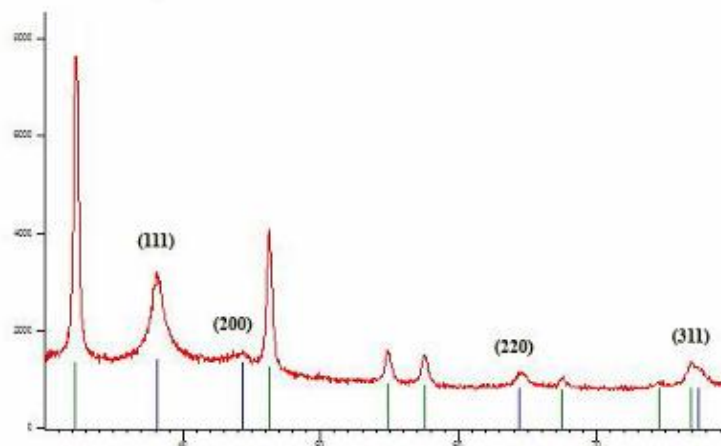
تصاویری است که توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره از نانوذرات نقره تهیه شده است و نشان می‌دهد که ساختار



شکل ۵- اندازه نانوذرات نقره تولید شده با عصاره آبی گل اکالیپتوس کامالدولنسیس توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره

تایید سنتز نانوذرات با استفاده از پراش اشعه ایکس الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات نقره در شکل ۶ مشاهده می‌شود. پهنای نقطه اوج با یک پودرسلیکونی استاندارد

که فاقد اندازه، ضخامت و کشش سطحی باشد، بدست می‌آید. که به ترتیب با صفحات کریستالی (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) مطابقت دارند.



شکل ۶- الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات نقره



## فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره

پتانسیل فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره که به روش بیولوژیکی سنتز شدند، علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت با استفاده از حضور یا فقدان مهارکننده به صورت کمی ارزیابی شد. نانوذرات نقره فعالیت مهاری را علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس PTCC1431 و سودوموناس آئروژینوزا PTCC1573 و باسیلوس سوبتیلیس PTCC1247 با شدت‌های مختلف نشان دادند. مقادیر حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی در محدوده‌های ۳/۱۲ - ۶/۲۵ - ۵۰ mg/ml مشاهده شد. مقادیر حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی در جدول ۱ ارائه شده است. حداقل غلظت مهاری در برابر استافیلوکوکوس اورئوس (۳/۱۲ mg/ml) و حداقل غلظت کشندگی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس (۶/۲۵ mg/ml) مشاهده شد و به طور کلی نتایج نشان داد که سودوموناس آئروژینوزا با میزان حداقل غلظت مهاری بیشتر، مقاومت بیشتری نسبت به نانوذرات نقره در مقایسه با دو باکتری دیگر دارد. عصاره آبی گل اکالیپتوس کامالدولنسیس در محدوده غلظت‌های ارزیابی شده از رشد هیچ یک از میکروارگانیسم‌ها جلوگیری نکرد.

جدول ۱- فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتتیک

غلظت نانوذرات نقره (mg/ml)		گونه‌های باکتری
MIC	MBC	
۳/۱۲	۶/۲۵	استافیلوکوکوس اورئوس
۵۰	۱۰۰	سودوموناس آئروژینوزا
۶/۲۵	۶/۲۵	باسیلوس سوبتیلیس

## بحث

در سالیان اخیر مقاومت گسترده باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها سبب شد تا محققین به دنبال راهکاری مناسب برای کشف مواد جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها باشند. در سال ۱۰۶۰ از نیترات نقره ۵٪ برای درمان سوختگی‌ها استفاده می‌شد (۲۸) و با پیشرفت علم در حوضه نانو تکنولوژی در سال ۲۰۰۴ با بررسی اثرات نانوذرات نقره بر روی باکتری *E.coli* این نانوذرات را به عنوان عامل ضد میکروبی جدید معرفی کردند (۲۹). در این مطالعه، نانوذرات نقره به عنوان یک پیشنهاد نویدبخش در زمینه پزشکی بیوسنتز گردید. بیوسنتز نانوذرات با استفاده از عوامل بیولوژیکی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، اکتینومیست‌ها، مخمرها، جلبک‌ها و گیاهان ثبت شده است (۳۰). سنتز نانوذرات نقره از محلول نیترات نقره و با استفاده از گل اکالیپتوس کامالدولنسیس با تغییر رنگ محلول شناسایی شد. اکالیپتوس کامالدولنسیس غنی از فلاونوئید و تریپنویید است (۵۴). آنها مولکول‌های فعال سطحی هستند که نقش مهمی در فرآیندهای احیا و تثبیت نانوذرات نقره بازی می‌کنند (۳۱). طیف جذبی نانوذرات نقره تشکیل شده در محیط واکنش نشان داد که پیک در محدوده ۴۱۰-۴۴۰ نانومتر بوده که زمینه مناسب برای تشکیل نانوذرات نقره را فراهم می‌کند (۳۲). طیف جذبی نانوذرات آماده شده با استفاده از عصاره آبی گل اکالیپتوس کامالدولنسیس، اوج ارتعاشات سطحی پلاسمون را در ناحیه ۴۱۳ نانومتر نشان دادند. عملکرد اختصاصی نانوذرات فلزی که بیوسنتز خارج سلولی داشته‌اند، هنوز مبهم است. با این حال، فعالیت ضد باکتری نانوذرات وابسته به گونه باکتری می‌باشد. وجود تانن‌ها، ساپونین‌ها، گلیکوزیدهای کاردیپاک در





نانوذرات از خود نشان دادند. دلیل احتمالی این نتیجه می تواند تفاوت در جنس و ساختمان دیواره باکتری های گرم مثبت و منفی باشد. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهار و حداقل غلظت کشندگی برای باکتری استافیلوکوکس اورئوس به ترتیب  $3/12$  و  $6/25$  mg/ml برای باسیلوس سوبتیلیس به ترتیب  $6/25$  و  $6/25$  mg/ml اندازه گیری شد که این مقادیر برای سودوموناس آئروجینوزا به ترتیب  $50$  و  $100$  mg/ml می باشد. این نتایج مشابه با پژوهش نبی پور و همکاران می باشد که نشان دادند باکتری استافیلوکوکوس اورئوس حساسیت بیشتری نسبت به نانوذره نقره و نانوذره روی نسبت به سودوموناس آئروجینوزا نشان می دهد (۳۹). در پژوهش مشابه دیگری کیم<sup>۲</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که اثرات نانوذرات نقره بر روی *S.aureus* بیشتر از *E.coli* باشد (۴۰). در گزارشی دیگر گوزمان<sup>۳</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره روی باکتری های مختلف مانند *E. coli*، *P. aeruginosa* و *aureus*، اعلام داشته اند که هر چند فعالیت نانوذرات وابسته به غلظت است ولی برای باکتر های گرم منفی به نسبت گرم مثبت این اثر چشمگیرتر بوده است (۴۱). دلیل تفاوت در نتایج حاضر احتمالاً ترکیبات موجود در عصاره آبی، تفاوت در میزان مقاومت سویه های میکروبی و ساختار متفاوت دیواره سلولی در باکتری ها می باشد. همچنین با افزایش میزان دوز نانوذرات میزان اثر ضد میکروبی افزایش می یابد و بنابراین عملکرد نانوذرات وابسته به دوز بود.

### نتیجه گیری

به طور کلی نتایج این پژوهش پتانسیل بالای عصاره آبی گل اکالیپتوس کامالدولنسیس را در احیای یون های فلزی

عصاره گل اکالیپتوس کامالدولنسیس (۵) و علاوه بر این، اثر ضدباکتریایی تانن یعنی توانایی مهار سنتز پروتئین های سلولی از طریق مکانیسم های اتصال به پروتئین شناخته شده است (۳۳). تا کنون نانوذرات نقره توانایی بالاتری برای مهار رشد میکروبی نسبت به عصاره های آبی نشان دادند. علیرغم استفاده گسترده از نانوذرات نقره، روش فعالیت میکروارگانیسیم ها به طور کامل شناخته شده نیست. با این حال، گزارش ها حاکی از آن است که نانوذرات نقره به دلیل اندازه کوچک به راحتی وارد سلول های باکتری می شوند و بر روند فرایندهای داخل سلولی مانند سنتز DNA، RNA و پروتئین تاثیر می گذارند (۳۴ و ۱۹). علاوه بر این، فرض بر اینست که یون های نقره (به ویژه  $Ag^+$ ) حاصل از نانوذرات نقره قادر به برهمکنش با اجزای فسفردار DNA یا واکنش با پروتئین های گوگردی هستند که منجر به توقف حیات سلولی و در نهایت مرگ سلول می شود (۳۵ و ۳۶). مطالعات بسیاری در زمینه ترکیب نانوذرات نقره با ترکیبات طبیعی از جمله عصاره ها انجام شده از آن جمله مطالعه شریفی راد و همکاران است که اثر سینرژیسیم ضد میکروبی آلئوسین سیر و نانوذرات نقره را روی عفونت پوستی ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین<sup>۱</sup> بررسی کردند (۳۷). نتایج پژوهش مبینی و همکاران نشان داد افزودن اسانس برگ اکالیپتوس به نانوذرات نقره، سبب کاهش حداقل غلظت مهار نانوذرات نقره و افزایش اثر آن بر روی سودوموناس آئروژینوزا می شود (۳۸). نتایج پژوهش حاضر نشان می دهد که نانوذرات نقره تولید شده با عصاره آبی گل اکالیپتوس کامالدولنسیس دارای پتانسیل ضدباکتریایی قابل توجهی نسبت به باکتری های گرم مثبت در مقایسه با باکتری های گرم منفی هستند و باکتری های گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت به

<sup>۱</sup>Kim

<sup>۲</sup>Guzman

<sup>۱</sup>Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: MRSA



جنبه‌های مهم نانوذرات، راه را برای استفاده همه جانبه از فناوری نانو می‌گشاید.

### تشکر و قدردانی

پشتیبانی مالی از این پروژه توسط دانشگاه آزاد نیشابور صورت پذیرفت. از دانشگاه علوم پزشکی مشهد برای دراختیار گذاشتن امکانات و تجهیزات طیف سنجی مادون قرمز و پراش اشعه ایکس صمیمانه قدردانی می‌نماییم. همچنین از جناب آقای مهندس جوهرچی جهت تایید گیاهان سپاسگزاری می‌نماییم.

نقره و تبدیل آنها به اتم‌های نقره در ابعاد نانومتریک نشان می‌دهد. وجود فعالیت ضد میکروبی بالای نانوذرات نقره سنتز شده به ویژه علیه باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس استفاده از آنها را در زمینه‌های مختلف به منظور از بین بردن میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا پیشنهاد می‌کند. برای مشخص کردن نحوه عمل تولید نانوذرات نقره توسط گیاه و مکانیسم فعالیت ضد میکروبی این ذرات، اطلاعات بیشتری مورد نیاز است. قطعاً افزایش درک ما در مورد این

### References

- 1- Rios J, Recio M. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 2005; 100(1-2):80-4.
- 2- Ahmad N, Sharma S, Alam MK, Singh V, Shamsi S, Mehta B, *et al.* Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010; 81(1):81-6.
- 3- Adeniyi B, Lawal T, Olaleye S. Antimicrobial and gastroprotective activities of *Eucalyptus camaldulensis* crude extracts. *J Biol Sci* 2006; 6(6):1141-5.
- 4- Ayepola O, Adeniyi B. The antibacterial activity of leaf extracts of *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae). *J Appl Sci Res* 2008; 4(11):1410-3.
- 5- Babayi H, Kolo I, Okogun J, Ijah U. The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biokemistry* 2004; 16(2):106-11.
- 6- Satari M, Shahbazi N, Najar Pirayeh Sh. An assessment of antibacterial effect of alcoholic and aquatic extracts of *Eucalyptus* leaves on *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathobiology Research* 2005; 8(1):19-21. [Persian]
- 7- Srinivasan D, Nathan S, Suresh T, Lakshmana Perumalsamy P. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 2001; 74(3):217-20.
- 8- Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60(11):1289-306.
- 9- Sperling RA, Gil PR, Zhang F, Zanella M, Parak WJ. Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews* 2008; 37(9):1896-908.
- 10- Torres-Chavolla E, Ranasinghe RJ, Alocilja EC. Characterization and functionalization of biogenic gold nanoparticles for biosensing enhancement. *IEEE Transactions on Nanotechnology* 2010; 9(5):533-8.
- 11- Bhumkar DR, Joshi HM, Sastry M, Pokharkar VB. Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin. *Pharm Res* 2007; 24(8):1415-26.
- 12- Cai W, Gao T, Hong H, Sun J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol Sci Appl* 2008; 1:17-32.
- 13- Dwivedi P, Narvi S, Tewari R. Green route to a novel Ag/PLGA bionanocomposite: A self-sterilizing surgical suture biomaterial. *International Journal of Advances in Engineering & Technology (IJAET)* 2012; 2(3):236-43.
- 14- Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in colloid and interface science* 2009; 145(1-2):83-96.



- 15- Gowramma B, Keerthi U, Rafi M, Rao DM. Biogenic silver nanoparticles production and characterization from native stain of *Corynebacterium* species and its antimicrobial activity. 3 Biotech 2015; 5(2):195-201.
- 16- Mohammed A, Albrahim J. Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial potency of silver nanoparticles using *Ziziphus Spina-christi* L. leaf extract. Journal of Pure and Applied Microbiology 2014; 8(5):3903-8.
- 17- Manisha D.R, Alwala J, Kudle KR, Rudra Pratap MP. Biosynthesis of silver nanoparticles using flower extracts of *Catharanthus roseus* and evaluation of its antibacterial efficacy. World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences 2014; 3(5):877-85.
- 18- Sulaiman GM, Mohammed WH, Marzoog TR, Al-Amiery AAA, Kadhun AAH, Mohamad AB. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Eucalyptus chapmaniana* leaves extract. Asian Pac J Trop Biomed 2013; 3(1):58-63.
- 19- A.F.Abd E, Tahany M. Green synthesis of silver nanoparticle using *Eucalyptus globulus* leaf extract and its antibacterial activity. Journal of Applied Sciences Research 2013; 9(10):6437-40.
- 20- Okafor F, Janen A, Kukhtareva T, Edwards V, Curley M. Green synthesis of silver nanoparticles, their characterization, application and antibacterial activity. Int J Environ Res Public Health 2013; 10(10):5221-38.
- 21- Vilchis-Nestor AR, Sánchez-Mendieta V, Camacho-López MA, Gómez-Espinosa RM, Camacho-López MA, Arenas-Alatorre JA. Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. Materials Letters. 2008; 62(17-18):3103-5.
- 22- Kudle KR, Donda MR, Alwala J, Koyyati R, Nagati V, Merugu R, et al. Biofabrication of silver nanoparticles using *Cuminum cyminum* through microwave irradiation. International Journal of Nanomaterials and Biostructures. 2012; 2(4):65-9.
- 23- Al din Haratifar E, Shahverdi HR, Shakibaie M, Moghaddam KM, Amini M, Montazeri H, et al. Semi-biosynthesis of magnetite-gold composite nanoparticles using an ethanol extract of *Eucalyptus camaldulensis* and study of the surface chemistry. Journal of Nanomaterials 2009; 2009:23.
- 24- Lancini G, Parenti F. Antibiotics: an integrated view. Germany: Springer Science & Business Media; 2013.
- 25- Kazemian H, Ghafourian S, Heidari H, Amiri P, Yamchi JK, Shavalipour A, et al. Antibacterial, anti-swarming and anti-biofilm formation activities of *Chamaemelum nobile* against *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Soc Bras Med Trop 2015; 48(4):432-6.
- 26- Areán CO, Palomino GT, Tsyganenko A, Garrone E. Quantum chemical and FTIR spectroscopic studies on the linkage isomerism of carbon monoxide in alkali-metal-exchanged zeolites: a review of current research. Int J Mol Sci 2002; 3(7):764-76.
- 27- Venu R, Ramulu T, Anandakumar S, Rani V, Kim C. Bio-directed synthesis of platinum nanoparticles using aqueous honey solutions and their catalytic applications. Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects 2011; 384(1-3):733-8.
- 28- Moyer CA, Brentano L, Gravens DL, Margraf HW, Monafu WW Jr. Treatment of large human burns with 0.5% silver nitrate solution. Arch Surg 1965; 90(6):812-67.
- 29- Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. Journal of colloid and interface science 2004; 275(1):177-82.
- 30- Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 2010; 6(2):257-62.
- 31- Stoycheva M. Pesticides Formulations, Effects, Fate. InTech Janeza Trdine. 2011; 9:51000.
- 32- Sastry M, Patil V, Sainkar S. Electrostatically controlled diffusion of carboxylic acid derivatized silver colloidal particles in thermally evaporated fatty amine films. J Phys Chem B 1998; 102(8):1404-10.
- 33- Stern JL, Hagerman AE, Steinberg PD, Mason PK. Phlorotannin-protein interactions. J Chem Ecol 1996; 22(10):1877-99.
- 34- Ouda SM. Some nanoparticles effects on *Proteus* sp. and *Klebsiella* sp. isolated from water. American Journal of Infectious Diseases and Microbiology 2014; 2(1):4-10.



- 35- Kim SH, Lee HS, Ryu DS, Choi SJ, Lee DS. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Korean J Microbiol Biotechnol 2011; 39(1):77-85.
- 36- Ravishankar Rai V, Jamuna Bai A. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials, science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. In: Méndez-Vilas A, editor. Formatex, Microbiology Series, 2011; 3(1):197-209.
- 37- Sharifi-Rad J, Hoseini-Alfatemi S, Sharifi-Rad M, Iriti M. Antimicrobial synergic effect of Allicin and silver nanoparticles on skin infection caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* spp. Ann Med Health Sci Res 2014; 4(6):863-8.
- 38- Mobini M, AH M. Study of the synergy of silver nanoparticles and essential oil of *Eucalyptus* leaves against *pseudomonas earuginosa*. NAVIDNO 2016; 19(61):54-61. [Persian]
- 39- Nabipour Y, Rostamzad A, Ahmadyasbchin S. The evaluation of antimicrobial properties of zink and silver nanoparticles on pathogenic bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. sjimu 2015; 23(5):173-81.
- 40- Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J-H, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine 2007; 3(1):95-101.
- 41- Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine 2012; 8(1):37-45.