مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 23:11 IRDT on Sunday May 20th 2018

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

سمانه دولت آبادی*[1]، شکوفه عمرانی[2]، الناز مهرافروز[2]، راحله ژیانی[3]

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

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_dolatabadi1436@yahoo.com

چکیده

مقدمه

با توجه به گسترش نگران کننده مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی نسبت به عوامل ضدمیکروبی 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 میکروبراث دایلوشن و حداقل غلظت کشنده باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

وجود نانوذرات نقره توسط حداکثر میزان جذب در nm ۴۱۳، تغییر رنگ تا قهوه‌ای تیره، طیف سنجی مادون قرمز و الگوی پراش اشعه ایکس تایید گردید. میانگین اندازه نانوذرات بین nm ۸۰-۶۷ اندازه‌گیری شد. در نهایت حداقل غلظت مهاری 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 mg/ml ۱۰۰ 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

مقدمه

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 23:11 IRDT on Sunday May 20th 2018

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 ضدمیکروبی مؤثر و با عوارض جانبی کمتر به جای مواد ضدمیکروبی با اثر کمتر و عوارض ناخواسته بیشتر باشد (۱). شیوع نسبتا بالای عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس وسودوموناس آئروژینوزا و همچنین اثرات جانبی آنتی بیوتیک‌های رایج علاوه بر ظهور سویه‌هایی با مقاومت‌های چند گانه[۱]، استفاده از روش‌های نوین در درمان عفونت های 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، سیمن، کاتکول، تانن‌ها، ترپن‌ها، ایزوپرنوئیدها، فنولیک‌ها، کاردیا گلیکوزیدها، استرول‌ها، ساپونین‌ها و فلاونوئیدها ترکیبات فیتوشیمیایی شناسایی شده در گل‌های اکالیپتوس کامالدولنسیس هستند (۴و۵). ترکیبات این گیاه، فعالیت ضد میکروبی علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها از جمله کلبسیلا، یرسینیا انتروکولیتیکا، سالمونلا تیفی موریوم، شیگلا دیسانتری، باسیلوس سرئوس وسودوموناس آئروژینوزا و قارچ کاندیدا آلبیکنس از خود نشان داده است (۶و۷).

یکی از زمینه‌های کاربردی نانوبیوتکنولوژی، استفاده از نانوذرات نقره به عنوان راهکاری نوین در درمان عفونت های 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 نمی آید. 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 خواصی 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 (۸و۹)، تشخیص بیماری (۱۰)، و مواد دارویی (۱۱و۱۲) استفاده شده است. نانوذرات نقره نیز به عنوان یک ماده بازدارنده رشد و ضد

[۱] Multi-Drug Resistance: MDR

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 23:11 IRDT on Sunday May 20th 2018

باکتری، کاملا شناخته شده‌اند و دارای دو خاصیت ضد باکتریایی و ضد التهاب هستند که می‌تواند در بهبود سریع تر زخم موثر باشند.

روش‌های سنتز بیولوژیک می‌توانند از سنتز خارج سلولی میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها 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 نانوتکنولوژی هستند (۱۳و۱۴). سنتز نانوذرات با روش‌های بیولوژیکی یک روش پاک، غیرسمی و سازگار با محیط زیست است که سنتز نانوذرات با طیف گسترده‌ای از اندازه، شکل، ترکیب و خواص فیزیکوشیمیایی را پیشنهاد می‌کند (۱۵). مطالعات قبلی نشان می‌دهد که نانوذرات نقره از عصاره گل‌های زیزیفوس اسپینا کرسیتی[۱] (۱۶)، کاتارانتوس روزئوس[۲] (۱۷)، اکالیپتوس چاپمانیانا[۳] (۱۸)، اکالیپتوس گلوبلوس[۴] (۱۹)، اکالیپتوس[۵] (۲۰)، کاملیا سیننسی[۶] (۲۱)، عصاره پودر دانه کومینوم سیمیموم[۷] (۲۲) و غیره به دست آمده است. علاوه بر این از عصاره اتانولی اکالیپتوس کامالدولنسیس به عنوان یک عامل احیاکننده 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 احیاکننده در بیوسنتز سازگار با محیط زیست نانوذرات نقره از نیترات نقره[۸] در دمای‌اتاق استفاده گردید.

باتوجه به اینکه فلاوونوئیدها نقش مهمی در عصاره اکالیپتوس کامالدولنسیس دارند (یعنی نقش احیاکنندگی 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 مهاری[۹] و حداقل غلظت کشندگی[۱۰] نانوذرات نقره بیوسنتتیک را در برابر برخی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیابیم.

مواد و روش‌ها

گل‌های اکالیپتوس کامالدولنسیس از خراسان رضوی تهیه شد و سپس در هرباریوم گیاهی دانشگاه فردوسی مورد بررسی و تایید قرار گرفت. پس از جمع‌آوری گیاهان، گل ها در شرایط مناسب و در سایه خشک و سپس جهت تهیه عصاره، پودر گردیدند. نیترات نقره و محیط کشت‌های مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث (MERCK, Germany) تهیه شدند.

سویه‌های باکتریایی و محیط‌های کشت

دو باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus (PTCC 1431)* و *B. subtilis (PTCC 1247)* و یک باکتری گرم منفی *P.aeruginosa (PTCC*1573) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. باکتری‌ها در شرایط استریل بر روی محیط نوترینت اگار 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 شماره۱ (اندازه منافذ ۱۲۵ mm)

[۱] *ZiziphusSpina-christi L*
[۲] *Catharanthus roseus*
[۳] *Eucalyptus chapmaniana*
[۴] *Eucalyptus globulus*
[۵] *Eucalyptus*
[۶] *Camellia sinensis*
[۷] *Cuminum cyminum*
[۸] AgNO3

[۹] Minimum Inhibitory Concentration: MIC
[۱۰] Minimum Bactericidal Concentration: MBC

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 23:11 IRDT on Sunday May 20th 2018

عبورداده شد تا عصاره از مخلوط جدا شود. برای سنتز نانوذرات نقره، ۱۲ ml عصاره آبی گل اکالیپتوس کامالدولنسیس با ۸۸ ml از محلول نیترات نقره (۱ میلی مولار) مخلوط شده و به منظور انجام واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرارداده شد. محلول نانوذرات نقره تا زمان بررسی بیشتر در دمای C° ۴ ذخیره گردید.

تایید تولید نانوذرات نقره

بررسی طیفی قابل مشاهده- فرابنفش[۱]

اسپکتروفتومتر قابل مشاهده- فرابنفش یک تکنیک مهم برای تجزیه و تحلیل نانوذرات سنتز شده است. پس از تغییررنگ مخلوط واکنش به قهوه‌ای تیره، میزان سنتز نانوذرات نقره توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر جذبی قابل مشاهده- فرابنفش در طول موج nm ۸۰۰-۲۰۰ مشخص شد (۲،۲۰).

بررسی طیف سنجی مادون قرمز[۲] 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 تنسور۷) انجام شد (۲،۲۰).

میکروسکوپ الکترونی نگاره

خصوصیات مورفولوژیکی نانوذرات نقره سنتز شده، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره[۳] بررسی شد. یک قطره از نمونه سوسپانسیونی نانوذرات بر روی گرید فیلم کربنی قرار داده شد و پس از خشک شدن، بررسی میکروسکوپ الکترونی نگاره پودرنانوذرات نقره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی JEOL مدل JSM 6390 انجام شد (۲،۲۰).

پراش اشعه ایکس

برای تایید نتایج، نانوذرات نقره هدف پراش اشعه ایکس[۴] 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 آماده‌سازی نمونه بر روی بستر شیشه‌ای اسکن با زاویه θ ۲ و محدوده اسکن ۵۰-۹۰ درجه انجام شد (۲،۲۰).

بررسی خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره **سنتزشده**

نانوذرات نقره‌ای که با استفاده ازعصاره گل اکالیپتوس کامالدولنسیس سنتز شدند، برای بررسی فعالیت ضد میکروبی در برابر سه نوع باکتری بیماری‌زا ازجمله سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس و با استفاده از روش رقت‌سازی استاندارد (CLSI M07-A8) مورد آزمایش قرار گرفتند. حداقل غلظت مهاری در پلیت میکروتیتر ۹۶ خانه و با استفاده از مولر هینتون براث تعیین شد. سویه‌ها در محیط مولرهینتون براث و در دمای C° ۳۷ به مدت یک شب کشت داده شدند سپس سوسپانسیون باکتریایی برابر با کدورت استاندارد ۰/۵ 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 غلظتی mg/ml ۴۰۰ – ۲۰۰ – ۱۰۰ – ۵۰ – ۲۵ – ۱۲/۵ – ۶/۲۵ – ۳/۱۲ – ۱/۵۶ – ۰/۷۵ از نانوذرات نقره تهیه

[۱] UV-Visible
[۲] Fourier-Transform Infrared Spectroscopy: FTIR
[۳] Transmission Electron Microscope: SEM
[۴] XRD

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 23:11 IRDT on Sunday May 20th 2018

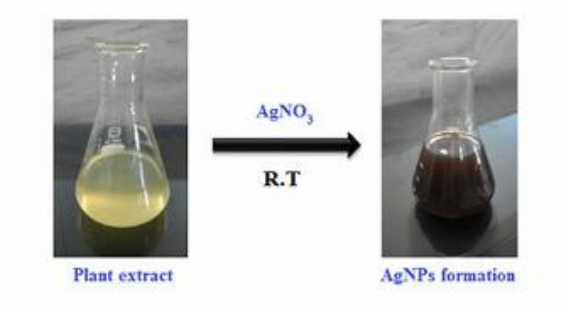
گردید. به هر چاهک µl ۱۰۰ از سوسپانسیون باکتریایی (هر کدام از باکتری‌ها به صورت جداگانه) که در بالا گفته شد و µl ۱۰۰ از هر کدام از غلظت‌های نانوذره به ترتیب کاهش غلظت به چاهک مربوطه اضافه شد. حداقل غلظت مهاری نانوذرات نقره علیه سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس در محیط مولر هینتون براث با روش استاندارد (۲۴) تعیین شد. بعد از ۲۴ساعت انکوباسیون در C° ۳۷ جذب نوری[۱] هر چاهک در nm ۶۰۰ 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 ، µl ۱۰ 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 C ° ۳۷ انکوبه شدند، این پلیت کاملا فاقد نانوذرات نقره بود. حداقل غلظت کشندگی به معنی حداقل غلظت عامل ضدمیکروبی 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).

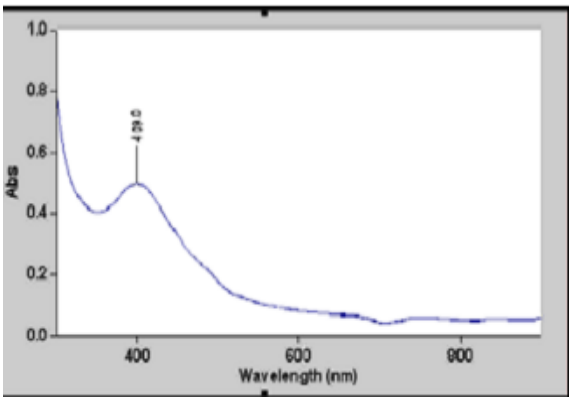
[۱] Optical Density: OD



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 (شکل۲).



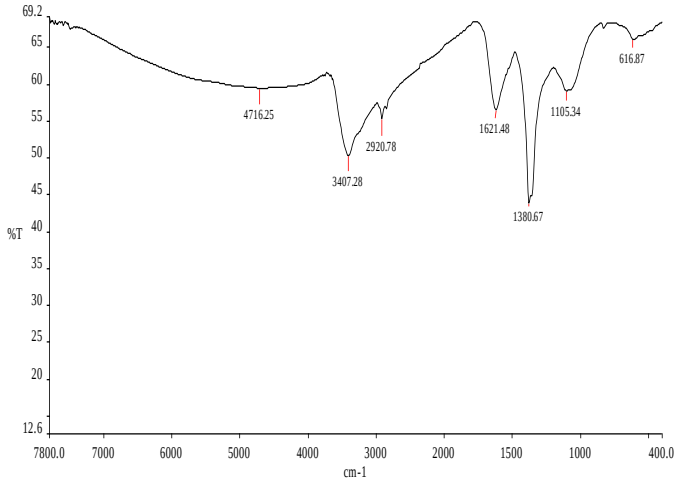
شکل۲- طیف سنجی قابل مشاهده- فرابنفش نانوذرات نقره تشکیل شده از عصاره گل اکالیپتوس کامالدولنسیس

تایید سنتز نانوذرات با روش طیف سنجی مادون قرمز

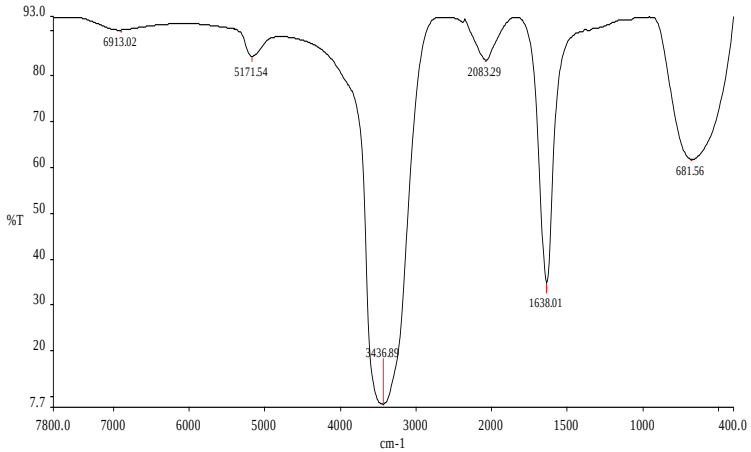
به منظور شناسایی گروه‌های عملکردی که مسئول محدود کردن و تثبیت نانوذرات نقره هستند، آنالیز طیف سنجی مادون قرمز بین cm^{-1} ۴۰۰ و ۷۸۰۰ انجام شد. نتیجه طیفی نشان داده شده (شکل ۳)، مربوط به نانوذرات نقره

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 23:11 IRDT on Sunday May 20th 2018

درعصاره گل می‌باشد درحالیکه شکل ۴ عصاره اکالیپتوس کامالدولنسیس معمولی را نشان می‌دهد. پیک گسترده در $۳۴۳۶ cm^{-1}$ می‌تواند به علت پیوند OH باشد (شکل ۴). به نظر می‌رسد، تشکیل پیک در $۱۶۳۸ cm^{-1}$ به علت پیوند C = O در گروه کربونیل باشد. همچنین فقدان پیک گسترده در $۲۰۸۳ cm^{-1}$ به حالت پیوند O-C مربوط می شود (۲۶). این مولکول‌های زیستی به عنوان گروه‌های تثبیت کننده احتمالی که به تشکیل نانوساختارهای یون نقره کمک می‌کردند، شناسایی شدند و در طیف سنجی مادون قرمز نشان داده شده‌اند (شکل۳). مقایسه دو طیف نشان از کاهش شدت پیک CO در طیف نانوذرات (شکل۳) نسبت به $۱۶۳۸ cm^{-1}$ در (شکل۴) دارد که نشان می‌دهد تثبیت سیستم ممکن است ناشی از اتصال گروه کربونیل قندهای احیاکننده به نقره باشد (۲۷).



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

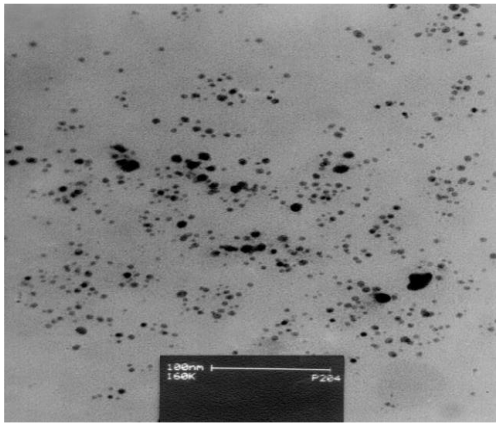


شکل۴ – بررسی عصاره گل اکالیپتوس کامالدولنسیس با روش طیف سنجی مادون قرمز

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 23:11 IRDT on Sunday May 20th 2018

تایید سنتز نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره

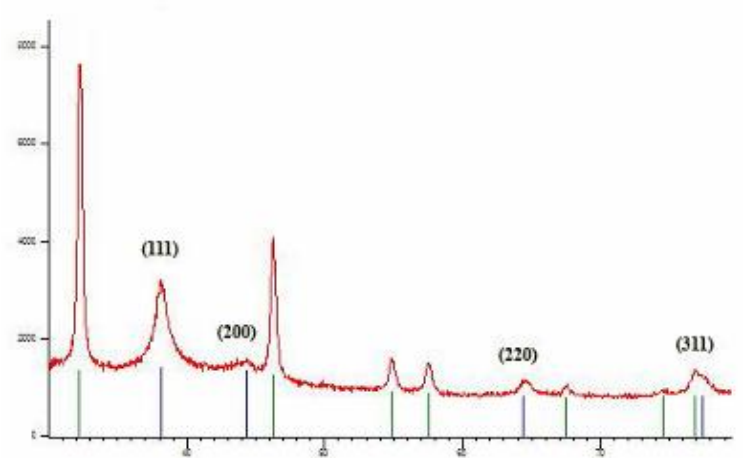
تصاویری است که توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره از نانوذرات نقره تهیه شده است و نشان می‌دهد که ساختار نانوذرات تقریبا کروی است (شکل ۵). اندازه متوسط نانوذرات بین ۶۷-۸۰ نانومتر مشاهده شد.



شکل ۵- شکل و 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 پودرسیلیکونی استاندارد که فاقد اندازه، ضخامت و کشش سطحی باشد، بدست می آید. که به ترتیب با صفحات کریستالی (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) مطابقت دارند.



شکل۶- الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات نقره

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 23:11 IRDT on Sunday May 20th 2018

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 سوبتیلیسPTCC1247 با شدت‌های مختلف نشان دادند. مقادیر حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی در محدوده‌های mg/ml ۵۰ - ۶/۲۵ - ۳/۱۲ مشاهده شد. مقادیر حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی در جدول ۱ ارائه شده است. حداقل غلظت مهاری در برابر استافیلوکوکوس اورئوس (mg/ml ۳/۱۲) و حداقل غلظت کشندگی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس (mg/ml ۶/۲۵) 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

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

بحث

در سالیان اخیر مقاومت گسترده باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک ها 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 نانوتکنولوژی در سال ۲۰۰۴با 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، جلبک ها 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 فلاوونوئید و ترپنوئید است (۴و۵). 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 کاردیاک در

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 23:11 IRDT on Sunday May 20th 2018

عصاره گل اکالیپتوس کامالدولنسیس (۵) و علاوه بر این، اثر ضدباکتریایی تانن یعنی توانایی مهار سنتز پروتئین های سلولی از طریق مکانیسم‌های اتصال به پروتئین شناخته شده است (۳۳). تا کنون نانوذرات نقره توانایی بالاتری برای مهار رشد میکروبی نسبت به عصاره‌های آبی نشان دادند. علیرغم استفاده گسترده از نانوذرات نقره، روش فعالیت میکروارگانیسم‌ها به طور کامل شناخته شده نیست. با این حال، گزارش‌ها حاکی از آن است که نانوذرات نقره به دلیل اندازه کوچک به راحتی وارد سلول های باکتری می‌شوند و بر روند فرایندهای داخل سلولی مانند سنتز DNA، RNA و پروتئین تاثیر می‌گذارند (۱۹و۳۴). علاوه بر این، فرض براینست که یون‌های نقره (به ویژه Ag^+) حاصل از نانوذرات نقره قادر به برهمکنش با اجزای فسفردار DNA یا واکنش با پروتئین‌های گوگردی هستند که منجر به توقف حیات سلولی و در نهایت مرگ سلول می‌شود (۳۵و۳۶). مطالعات بسیاری در زمینه ترکیب نانوذرات نقره با ترکیبات طبیعی از جمله عصاره‌ها انجام شده از آن جمله مطالعه شریفی راد و همکاران است که اثر سینرژیسم ضد میکروبی آلیسین سیر و نانوذرات نقره را روی عفونت پوستی ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین[۱] بررسی کردند (۳۷). نتایج پژوهش مبینی و همکاران نشان داد افزودن اسانس برگ اکالیپتوس به نانوذرات نقره، سبب کاهش حداقل غلظت مهاری نانوذرات نقره و افزایش اثر آن بر روی سودوموناس آئروژینوزا می‌شود (۳۸). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که نانوذرات نقره تولید شده با عصاره آبی گل اکالیپتوس کامالدولنسیس دارای پتانسیل ضدباکتریایی قابل توجهی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی هستند و باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت به نانوذرات از خود نشان دادند. دلیل احتمالی این نتیجه می تواند تفاوت در جنس و ساختمان دیواره باکتری‌های گرم مثبت و منفی باشد. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهار و حداقل غلظت کشندگی برای باکتری استافیلوکوکس اورئوس به ترتیب ۳/۱۲ و ۶/۲۵ mg/ml برای باسیلوس سوبتیلیس به ترتیب ۶/۲۵ و ۶/۲۵ mg/ml اندازه‌گیری شد که این مقادیر برای سودوموناس آئروجینوزا به ترتیب ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml می باشد. این نتایج مشابه با پژوهش نبی پور و همکاران می‌باشد که نشان دادند باکتری استافیلوکوکوس اورئوس حساسیت بیشتری نسبت به نانوذره نقره و نانوذره روی نسبت به سودوموناس آئروجینوزا نشان می‌دهد (۳۹). در پژوهش مشابه دیگری کیم[۲] 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[۳] و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره روی باکتری‌های مختلف مانند *E. coli*، *P .aeroginosa* و *S .aureus*اعلام داشته‌اند 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 احتمالا ترکیبات موجود در عصاره آبی، تفاوت در میزان مقاومت سویه‌های میکروبی و ساختار متفاوت دیواره سلولی در باکتری‌ها می‌باشد. همچنین با افزایش میزان دوز نانوذرات میزان اثر ضد میکروبی افزایش می‌یابد و بنابراین عملکرد نانوذرات وابسته به دوز بود.

نتیجه‌گیری

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

[۱] Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: MRSA

[۲] Kim

[۳] Guzman

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 23:11 IRDT on Sunday May 20th 2018

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 ضدمیکروبی این ذرات، اطلاعات بیشتری موردنیاز است. قطعا افزایش درک ما در مورد این 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 .

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.

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 23:11 IRDT on Sunday May 20th 2018

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 ZiziphusSpina-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, Kadhum 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, Monafo 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- Stoytcheva 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.

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 23:11 IRDT on Sunday May 20th 2018

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.