Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 32, No. 1, Spring 2022 ORIGINAL ARTICLE

Phytosynthesis of silver nanoparticles with the aqueous extract of portulaca oleracea and its antimicrobial and antioxidant effect against gram-positive and gram-negative bacteria

Niloofar Elyasi[1], Simin Nabizadeh[2], Zahra Shafiei[3]
[1] MSc in Microbiology, Department of Microbiology, School of Science and Agriculture, Islamic Azad University, Roudehen Branch, Tehran, Iran
[2] Faculty, PhD in Cellular-Developmental-Plant Biology, Department of Biology, School of Science and Agriculture, Islamic Azad University, Roudehen Branch, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, PhD in Microbial Biotechnology, Department of Biology, School of Science and Agriculture, Islamic Azad University, Roudehen Branch, Tehran, Iran

Abstract

Background: Due to the importance of investigating nosocomial infections and drug resistance in bacteria causing these infections, the use of herbs can be very helpful in treatment. In the present study, the effect of silver nanoparticles obtained from portulaca oleracea extract on bacteria causing nosocomial infections and effective parameters in the synthesis of these nanoparticles were investigated.
Materials and methods: First, an aqueous extract of portulaca oleracea was added to a 1 mM silver nitrate solution. The extract was used as a reducing and stabilizing agent for nanoparticles. The effect of effective parameters for the optimization of silver nanoparticles was evaluated by ultraviolet-visible spectroscopy and transmission electron microscopy. The antioxidant and antibacterial effect of the synthesized nanoparticles was determined by studying the activity of catalase, MIC, MBC, disk, and well method.
Results: The results showed the effect of alkaline pH as well as silver salt concentration on the quality of synthesized nanoparticles. Also, the results of the antimicrobial test showed that gram-negative bacteria revealed significant sensitivity to synthetic nanoparticles and *Staphylococcus aureus* showed the highest resistance to nanoparticles. Antioxidant properties were also observed against gram-negative strains.
Conclusion: The results showed that silver nanoparticles synthesized with portulaca oleracea had antibacterial and antioxidant properties. Therefore, photosynthesis of nanoparticles can be a good option for the treatment of infectious diseases caused by gram-negative bacteria.
Keywords: *Phytosynthesis, Silver nanoparticles, Portulaca oleracea, Antimicrobial activity, Antioxidant activity.*

Cited as: Elyasi N, Nabizadeh S, Shafiei Z. Phytosynthesis of silver nanoparticles with the aqueous extract of portulaca oleracea and its antimicrobial and antioxidant effect against gram-positive and gram-negative bacteria. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2022; 32(1):**21-30.**

Correspondence to: Simin Nabizadeh
Tel: *+98 2176502974*
E-mail: Nabizadeh.simin@gmail.com
ORCID ID: 0000-0001-8017-1368
Received: 6 Jul 2021; **Accepted:** 25 Oct 21

Original Article

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۲، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱، صفحات ۲۱ تا ۳۰

فیتوسنتز نانوذره نقره به کمک عصاره آبی گیاه خرفه و تاثیر ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

نیلوفر الیاسی[۱]، سیمین نبی زاده[۲]، زهرا شفیعی[۳]

[۱]کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن
[۲]هیأت علمی، دکتری تخصصی زیست شناسی سلولی - تکوینی-گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن
[۳]استادیار، دکتری تخصصی بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن

چکیده

سابقه و هدف: *با توجه به اهمیت بررسی عفونت‌های بیمارستانی و مقاومت‌های دارویی ایجاد شده در باکتری‌های مولد این عفونت‌ها، استفاده از گیاهان دارویی می‌تواند بسیار کمک کننده به درمان باشند. در مطالعه حاضر تاثیر نانوذرات نقره حاصل از عصاره گیاه خرفه بر باکتری‌های مولد عفونت‌های بیمارستانی و پارامترهای مؤثر در سنتز این نانوذرات، مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *ابتدا محلول عصاره آبی گیاه خرفه به محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار اضافه شد. از عصاره به عنوان عامل کاهنده و پایدار کننده نانوذرات استفاده شد. تاثیر پارامترهای موثر جهت بهینه سازی نانوذرات نقره بوسیله تکنیک اسپکتروسکوپی فرابنفش-مرئی و میکروسکوپ الکترونی عبوری ارزیابی شد. اثر ضداکسیدانی و ضد باکتریایی نانوذرات سنتز شده به کمک بررسی فعالیت کاتالازی، MIC، MBC، روش دیسک گذاری و چاهک گذاری تعیین شد.*

یافته‌ها: *نتایج حاکی از تاثیر pH قلیایی و همچنین غلظت نمک نقره بر کیفیت نانوذرات سنتز شده بود. همچنین نتایج تست ضدمیکروبی نشان داد باکتری های گرم منفی حساسیت قابل توجهی به نانوذرات سنتزی نشان دادند و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین مقاومت را به نانوذرات نشان داد. همچنین خاصیت ضداکسیدانی علیه سویه های گرم منفی نیز مشاهده شد.*

نتیجه‌گیری: *نتایج به دست آمده نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده با گیاه خرفه خاصیت ضد باکتریایی و ضداکسیدانی دارد. بنابراین فیتوسنتزی نانوذرات می‌تواند گزینه مناسبی در جهت درمان بیماری‌های عفونی ناشی از باکتری‌های گرم منفی باشد.*

واژگان کلیدی: *فیتوسنتز، نانوذرات نقره، گیاه خرفه، فعالیت ضد میکروبی، فعالیت ضد اکسیدانی.*

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی یکی از مهم‌ترین مشکلات در زمینه پزشکی در اقصی نقاط دنیا به حساب می‌آید. باکتری‌های فراوانی موجب بروز عفونت‌های بیمارستانی می‌شوند که از جمله آنها استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، اشیریشیاکلای، سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتر جدا شده از نمونه‌ها هستند. این باکتری‌ها با سازوکارهای مختلف از جمله دارا بودن ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک، بیوفیلم و پمپ افلاکس می‌توانند سبب بروز عفونت های بیمارستانی شوند. از آن جا که این باکتری توانایی بالقوه ای در مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها داشته و به راحتی در محیط اطراف باقی می‌مانند، بنابراین در بروز بیماری و مرگ و میر در افراد مستعد نقش دارند. تاکنون تلاش‌های بی‌شماری برای مقابله با این عفونت ها انجام گرفته است (۱).

آدرس نویسنده مسئول: رودهن، گروه زیست شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن، سیمین نبی زاده (**email**: Nabizadeh.simin@gmail.com)
ORCID ID: 0000-0001-8017-1368
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۴/۱۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۸/۳

از جمله این تلاش‌ها می‌توان به استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها اشاره کرد که از دیرباز جهت مقابله با عفونت‌ها و بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. امروزه با پیشرفت جوامع بشری داروهای شیمیایی جایگزین گیاهان دارویی شده‌اند که البته مشکلات عدیده‌ای از قبیل مقاومت چشمگیر میکروارگانیسم‌ها و کاهش تاثیر آن‌ها در اثر استفاده پی در پی با خود به همراه داشته‌اند. با این وجود، همواره از گیاهان دارویی به دلیل قیمت مناسب‌تر و عوارض جانبی کمتر در مقایسه با داروهای سنتتیک و صنعتی در درمان بیماری-های مختلف استفاده می‌شود. گیاه خرفه با نام علمی Portulaca Oleracea L یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی است که تقریباً در تمام نقاط ایران به خصوص نواحی گیلان، تهران و اطراف آن پراکندگی دارد و در مناطق جنوبی ایران به عنوان سبزی خوردن کاشته می‌شود (۲). کاربردهای درمانی این گیاه شامل خواص آنتی‌سپتیکی، آنتی‌اکسیدانی، ضد هموروئیدی، ضد یبوست، پیشگیری از حمله قلبی و تقویت سیستم ایمنی است. همچنین مطالعات مختلف این گیاه را به دلیل داشتن خواص ضد سرطانی و ضدمیکروبی جایگزین مناسبی برای داروهای سنتتیک و آنتی‌بیوتیک‌ها جهت مقابله با بیماری‌ها و عفونت‌های بیمارستانی معرفی کرده‌اند (۳).

رویکرد جدید معرفی شده دیگر جهت مدیریت عفونت‌های بیمارستانی مقاوم به دارو، به کارگیری نانوتکنولوژی در عرصه پزشکی است. اغلب نانوذرات فلزی در درمان سرطان و همچنین عفونت‌های بیمارستانی ناشی از میکروارگانیسم‌ها نقش به سزایی دارند که از مهم‌ترین این نانوذرات می‌توان به استفاده از فناوری نانوذرات نقره اشاره داشت. نقره در ابعاد نانو بر متابولیسم، تنفس و تولید مثل میکروارگانیسم اثر می‌گذارد (۴، ۵). در بررسی‌های مختلف، نانوذرات نقره به طور موثر باعث مهار سیستم تنفسی و تکثیر باکتریها می‌شوند که در نهایت موجب از بین رفتن میکروارگانیسم می‌گردند. با توجه به توانایی بالای این عنصر در زمینه میکروب‌زدایی، روش‌های متنوعی از جمله فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی جهت سنتز نانوذرات نقره معرفی شده‌اند. با این وجود، در سال‌های اخیر توجه بسیاری از پژوهشگران به به کارگیری گیاهان به عنوان منابع پایا و در دسترس برای سنتز نانو ذرات جلب شده است و از امتیازات این تکنیک می‌توان به زیست سازگار بودن، قیمت مناسب، غیرسمی بودن و تولید نانو ذرات با خلوص بالا اشاره داشت. گیاهان به دلیل دارا بودن متابولیت‌های ثانویه مختلف از جمله فنل‌ها و فلاونوئیدها، آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و لیپیدها در سنتز نانو ذرات فلزی از جمله نانوذرات نقره از اهمیت بالایی برخوردار هستند (۶). مطالعات مختلفی حاکی از آن هستند که گیاهان دارویی به عنوان عامل کاهنده برای تولید زیستی نانو ذرات نقره استفاده شده‌اند (۷). اگر چه مطالعات معدودی در زمینه سنتز نانوذرات نقره از عصاره‌های مختلف گیاه خرفه انجام گرفته است، با این وجود مطالعه حاضر برای اولین بار با هدف بررسی اثر نانوذرات نقره حاصل از عصاره گیاه خرفه بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مولد عفونت‌های بیمارستانی انجام گرفت و پارامترهای موثر در سنتز این نانوذرات نیز بررسی شد.

مواد و روشها

جمع آوری گیاه و عصاره گیری آبی

گیاه خرفه از مناطق محلی حومه تهران جمع آوری، سپس جنس و گونه گیاه خرفه با همکاری هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشگاه علوم پزشکی ایران شناسایی و تایید شد. پس از جمع‌آوری گیاه خرفه و به منظور عصاره‌گیری مطلوب ابتدا، گیاه در مکانی به دور از آفتاب خشک شد. سپس برگ‌های خشک شده با آسیاب برقی آزمایشگاهی مدل(Waring) پودر شد. جهت تهیه عصاره آبی، پودر خشک شده برگ گیاه به میزان ۱۰۰ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و محلول سطحی به دور از آفتاب نگهداری شد (۳).

سنتز نانوذرات نقره و تعیین ویژگی‌های آن

جهت سنتز نانوذرات نقره از گیاه خرفه، ۰/۱ گرم از عصاره برگ گیاه در ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه شده حل و با ۹۰ سی سی محلول نیترات نقره مخلوط شد. به جهت احیای یونهای نقره ظرف محلول حاصله در دمای اتاق و در شرایط تاریکی بر روی لرزاننده قرار گرفت. سپس جهت خالص سازی نانوذرات، از سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. در نهایت، از آون تحت دمای ۶۰ درجه برای فراهم سازی پودر نانوذرات بهره گرفته شد. جهت شناسایی نانوذرات نقره و احیای زیستی نقره عصاره آبی گیاه، از مولفه تغییر رنگ محلول به سمت قهوه‌ای استفاده شد و همچنین بدین منظور بررسی روند جذب آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-Visible) در طول موج ۴۲۰ نانومتر انجام گرفت (۸).

بررسی پارامترهای مؤثر بر سنتز نانوذرات نقره

تأثیر pH

برای بهینه سازی مقدار pH، پنج سری محلول حاوی ۲ میلی لیتر عصاره و ۴ میلی‌لیتر محلول نمک نیترات نقره با غلظت ۱

میلی مولار ساخته و پس از تنظیم pH (۳، ۹-۶)، حجم نهایی محلول در بالن حجمی به ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. طیف‌های جذبی محلول‌ها توسط اسپکتروفتومتر فرابنفش- مرئی در محدوده ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر گرفته و pH بهینه انتخاب شد. برای تنظیم pH محلول از یکی از دو محلول NaOH و یا HCl با غلظت ۰/۱ مولار استفاده شد (۸).

تأثیر میزان عصاره

برای بررسی تأثیر میزان عصاره گیاه مقادیر ۱ تا ۵ میلی لیتر از آن به ۴ میلی لیتر محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار افزوده شد و pH واکنش برابر pH بهینه تنظیم و همانند مرحله قبل حجم نهایی محلول در بالن حجمی به ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. از هر کدام از محلول‌های ساخته شده، جداگانه طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی گرفته و در انتها مقدار حجم بهینه عصاره انتخاب شد (۸).

تأثیر غلظت نمک نیترات نقره

برای بررسی تأثیر غلظت یون نقره (I)، مقدار بهینه شده از حجم عصاره به ۴ میلی لیتر از غلظت های متفاوت محلول نقره نیترات (۰/۵ تا ۴) میلی مولار افزوده و پس از تنظیم pH بهینه، حجم نهایی محلول واکنش به۵۰ میلی لیتر رسانده شد. از محلول‌های ساخته شده طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته و غلظت بهینه انتخاب شد (۸).

بررسی کیفی نانو ذره سنتز شده

توزیع شکل و اندازه نانوذرات نقره سنتز شده با اعمال فاکتورهای مؤثر در هر مرحله توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (Zeiss-EM10C-80 KV) بررسی شد. همچنین جهت شناسایی کیفی پایدارکننده‌های اطراف نانوذرات نقره، از دستگاه اسپکتوفتومتر در محدوده طول موج ۴۰۰-۴۰۰۰ استفاده شد (۸).

بررسی فعالیت ضد میکروبی

الف - انتشار در آگار

در روش انتشار در آگار (دیسک دیفوژن) ابتدا یک لوپ از کشت استاندارد پنج سوش استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، اشیریشیاکلای، سودوموناس آئروژینوزا، انتروباکتر جدا شده از ادرار بیماران بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار(مرک آلمان) کشت داده شدند. سپس دیسک‌های کاغذی (جنس صافی واتمن با نانو ذره نقره آغشته و توسط پنس استریل در سطح محیط کشت قرار داده شدند. بعد از گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از خط کش به طور دقیق قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. تمامی آزمایشات با ۳ بار تکرار انجام پذیرفت (۹).

ب- روش چاهک گذاری

در این روش همچون روش دیسک‌گذاری، پس از کشت سوسپانسیون باکتریایی در محیط مولر هینتون آگار، بر روی پلیت‌ها چاهک ایجاد شد و به آن مقادیر مشخصی (۱۰۰-۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) از نانوذرات نقره اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد جهت بررسی هاله عدم رشد قرار داده شد (۹).

ج- MIC و MBC

جهت بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی عصاره گیاه خرفه و نانوذرات نقره حاصل از آن، ابتدا به ۱۰ لوله ۵۰۰ واحد محیط کشت TSB اضافه شد و سپس رقت-های ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲۵ و ۷/۱۲۵ میکروگرم از نانوذرات نقره بصورت سریالی به لوله‌ها اضافه شدند و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی از هر پنج سوش با غلظت نیم مک فارلند به درون لوله‌ها اضافه گردید(بعداز تهیه تک کلنی، مقداری از کلنی در سرم فیزیولوژی حل شد تا به غلظت 1×10^8 CFU/ml بدست آمد). سه لوله به عنوان شاهد تلقی شدند که لوله شماره ۸ حاوی محیط کشت و نانوذره نقره (بدون باکتری)، لوله ۹ حاوی باکتری و محیط کشت و لوله شماره ۱۰ فقط دارای محیط کشت TSB بود. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در نهایت رشد باکتری‌ها بررسی شد و غلظتی که ۹۹/۹ درصد باکتری را کشته بود به عنوان MBC و لوله شفاف به عنوان MIC تلقی گردید (۹).

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی(کاتالازی)

جهت بررسی اثر آنتی-اکسیدانی نانوذرات نقره زیستی، از تست کاتالاز استفاده شد. در این تست تشکیل حباب نشان دهنده فعالیت کاتالازی باکتری است. در این تست از سه سوش سودوموناس آئروژینوزا، اشیریشیاکولای و انتروباکتر استفاده شد و میزان تولید حباب در این سوش‌ها، پس از مجاورت با نانوذرات نقره سنجیده شد (۱۰).

روش تحلیل آماری

تحلیل آماری تمام داده های حاصل از آزمایش‌های مختلف با استفاده نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و روش آنالیز واریانس یک طرفه One-way ANOVA انجام شد. حساسیت گونه‌های مورد مطالعه به آنتی بیوتیک‌ها به روش دیسک دیفیوژن ارزیابی شد و قطر منطقه عدم رشد به صورت میانگین ±

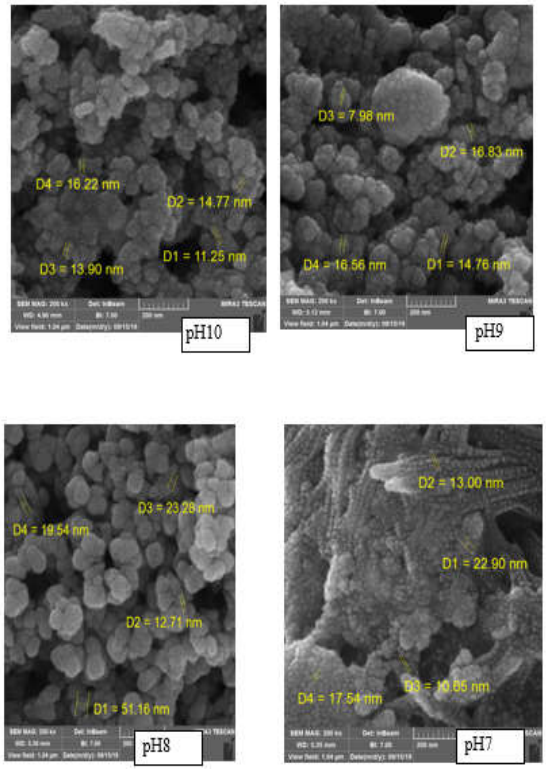
انحراف معیار گزارش شد. هر آزمایش به صورت تصادفی و سه بـار تکرار شد. از نظر آماری P<۰/۰۵ قابل قبول در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آنالیز تاثیرگذاری پارامترهای مختلف بر سنتز نانوذرات زیستی نقره

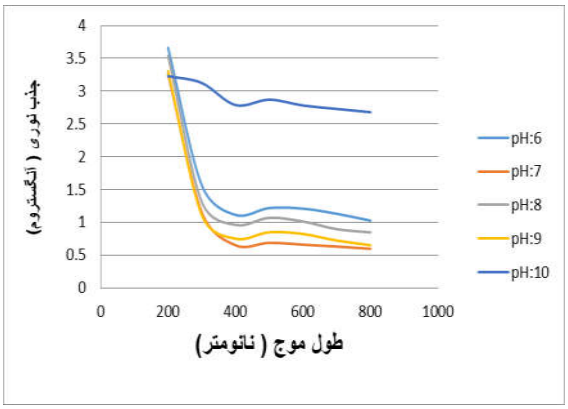
الف- تأثیر میزان PH محیط

شکل ۱ نشان دهنده تصاویر TEM تهیه شده برای نانوذرات نقره سنتز شده زیستی از عصاره گیاه خرفه در چهار pH ۷، ۸، ۹ و ۱۰ است. همان طور که در شکل یک مشاهده می‌شود، در pH ۱۰ نانوذرات سنتز شده دارای اندازه‌ای بین ۱۱/۲۵ تا ۱۶/۲۲ نانومتر هستند که نسبت به سایر نانوذرات تشکیل شده در pHهای دیگر اندازه کوچک‌تری را دارا هستند.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نانوذرات نیترات نقره سنتز شده با بهینه نمودن پارامتر pH.

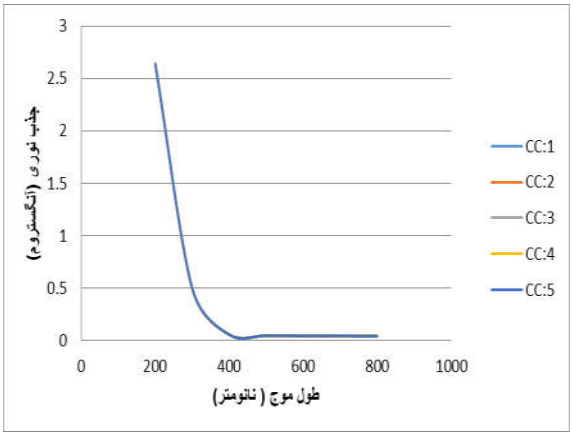
نمودار ۱ بیانگر تخمین میزان پایداری نانوذرات نقره سنتز شده در pHهای مختلف با استفاده از طیف سنجی فرابنفش-مرئی می باشد. مطابق با شکل ۲، در pH ۱۰ بالاترین میزان رزونانس پلاسمون سطحی نانو ذرات نقره ثبت شده است. در نتیجه این pH به عنوان مناسب ترین pH معرفی گردید.



نمودار ۱. طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره سنتز شده در pH های متفاوت (۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰).

ب- تاثیر میزان عصاره

نمودار ۲ بیانگر طیف های ثبت شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی برای نانوذرات نقره سنتز شده به کمک غلظت‌های ۱-۵ میلی‌مولار عصاره گیاه خرفه است. با توجه به این شکل، می‌توان مشاهده کرد که در طیف ۲۰۰ نانومتر تفاوتی در میزان تاثیر عصاره در سنتز نانو ذرات نقره وجود ندارد.

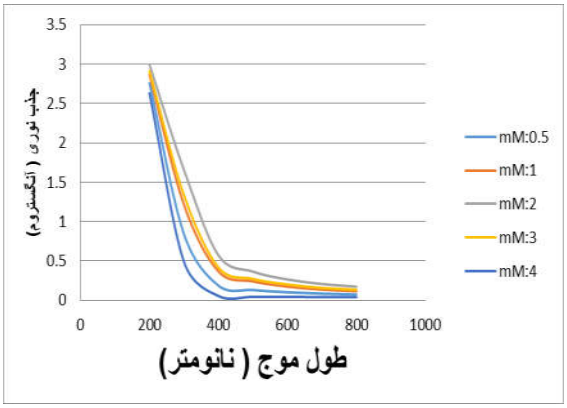


نمودار ۲. طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره سنتز شده به کمک غلظت های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی مولار از عصاره گیاه خرفه.

ج- تأثیر غلظت نمک نیترات نقره

طیف‌های ثبت شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی برای نانوذرات نقره سنتز شده به کمک غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌مولار نیترات نقره در نمودار ۳ نمایش داده شده است. همان طور که در نمودار ۳

مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت نمک نقره تا ۲ میلی-مولار، در طول موج ۲۰۰ نانومتری افزایش قابل قبولی در میزان جذب مشاهده شد. با این حال در نانوذرات سنتز شده با نمک نقره ۳ و ۴ میلی‌مولار این میزان کاهش قابل توجهی داشت. این نتایج بیان می‌کنند غلظت نمک ۲ میلی مولار غلظت بهینه برای سنتز نانو ذرات است.



نمودار ۳. طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره سنتز شده به کمک غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی مولار نمک نقره.

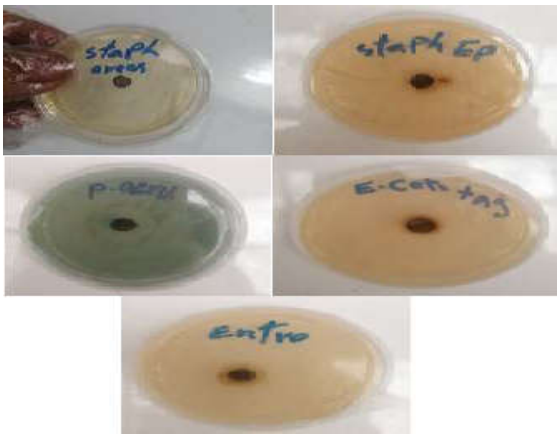
آنالیز نتایج حاصل از تست های ضدمیکروبی

الف- روش دیسک گذاری

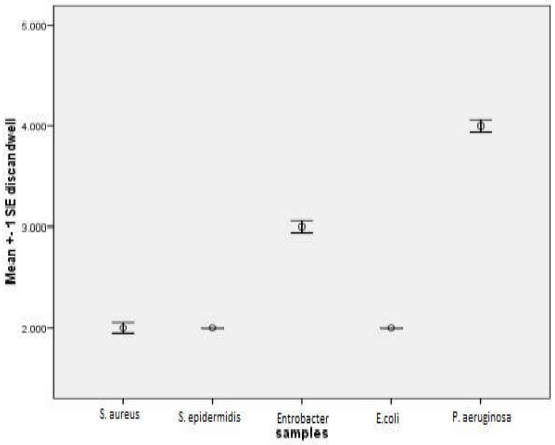
نتایج حاصل از تست دیسک گذاری در سوش‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، سودوموناس آئروژینوزا، اشیریشیا کولای و انتروباکتر تیمار شده با نانوذرات نقره زیستی در شکل ۲ نمایش داده شده است. با توجه به این شکل، میانگین قطر هاله ایجاد شده برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا ۴/۲±۰/۱۴ سانتی متر، اشیریشیا کولای ۲/۳±۰/۱۷ سانتی متر، استافیلوکوکوس اپیدرمیس تقریبا ۲/۱±۰/۱۱ سانتی متر، انتروباکتر ۳/۴±۰/۱۸ سانتی‌متر و در نهایت استافیلوکوکوس اورئوس ۲/۲±۰/۱۶ سانتی‌متر مشاهده شد. این نتایج بیانگر اثر بالقوه این نانوذرات بر روی سوش‌های استافیلوکوکوس اورئوس بود.

ب- روش چاهک‌گذاری

اطلاعات به دست آمده از روش چاهک گذاری در سوش-های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، سودوموناس آئروژینوزا، اشیریشیا کولای و انتروباکتر تیمار شده با نانوذرات نقره زیستی در آنالیز آماری نمودار ۴ نشان داده شده است. نتایج مطابق با روش دیسک گذاری بود و ثابت کننده اثر ضد باکتریایی قابل توجه این نانوذرات برعلیه سوش‌های استافیلوکوکوس اورئوس بود.



شکل ۲. اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره بر روی پنج سوش استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، سودوموناس آئروژینوزا، اشیریشیا کولای و انتروباکتر به کمک روش دیسک گذاری

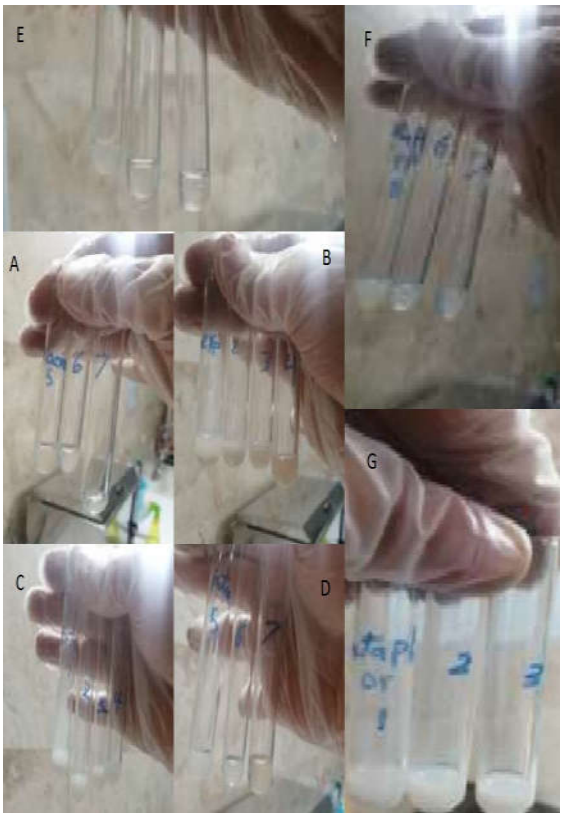


نمودار ۴. نتایج آماری مربوط به قطر هاله ایجاد شده در سوش-های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، سودوموناس آئروژینوزا، اشیریشیا کولای و انتروباکتر تیمار شده با نانوذرات نقره حاصل از گیاه خرفه

ج- روش MIC و MBC

مقادیر به دست آمده برای حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل بیان می‌کند هیچ کدام از باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، انتروباکتر و اشیریشیاکولای در محیط TSB رشد نکردند که نشان دهنده حساسیت بالای سویه‌های گرم منفی نسبت به نانوذرات نقره سنتز شده از روش زیستی است. از طرفی نتایج همچنین بازگوکننده آن

هستند که سوش استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس قادر به رشد در لوله‌های غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات نقره سنتز شده از گیاه خرفه نیست ولی در غلظت های کمتر رشد این سوش مشاهده می‌شود. با این وجود، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس توانست در حضور غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات سنتز شده رشد کرده که این نتایج نشان دهنده مقاومت بالقوه سوش‌های گرم مثبت در برابر نانوذرات نقره سنتز شده از گیاه خرفه است.



شکل ۳. اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره بر روی پنج سوش مورد بررسی A و B) سودوموناس آئروژینوزا ، C و D) انتروباکتر، E) اشریشیا کولای، F) استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس و G) استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده روش MIC و MBC.

آنالیز نتایج آنتی اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی (کاتالازی) نانوذرات نقره سنتز شده از گیاه خرفه بر روی سه سوش سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیاکولای و انتروباکتر بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزودن نانو ذرات نقره زیستی به باکتری‌های گرم منفی مورد آزمایش، حباب‌های حاصله کوچک‌تر شد که نشان دهنده کاهش خاصیت کاتالازی باکتری‌ها بود.

بحث

در حال حاضر سنتز مواد در ابعاد نانو یکی از جذاب‌ترین و پر توجه‌ترین عرصه‌ها در علوم نانو است. یکی از نانو مواد پرکاربرد در علم پزشکی، نانوذرات نقره است که مطالعات فراوانی در ارتباط با خواص ضد میکروبی و ضد باکتریایی آنها صورت گرفته است (۱۲،۱۱). یون‌های نقره قابلیت اتصال به گروه‌های دهنده الکترون مثل گلوکز، اکسیژن یا نیتروژن در مولکول‌های زیستی را دارا هستند (۱۳). نانو ذرات نقره سبب شکست اجزای حاضر در غشای خارجی باکتری شده خود این عمل موجب آزادسازی تصادفی، مولکولهایی نظیر لیپوپلی ساکارید و پورین از سیتوپلاسم می‌شود. پس از ورود نانوذرات نقره به داخل سلول باکتری، با اتصال به گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها، موجب غیرفعال شدن آنزیمهای باکتری و آسیب به DNA شده ودر نهایت موجب از بین رفتن باکتری می‌شوند (۱۴). همچنین پژوهش‌های گسترده نشان داده که غلظت یون نقره بر خواص سیتوتوکسیسیته و اثرات توکسیک آن موثر است و نتایج بررسی‌ها بر روی رده‌های سلولی انسانی نشان داده که نانوذرات نقره باعث افزایش استرس اکسیداتیو، آپاپتوز و ژنوتوکسیسیتی در شرایط in vitro می‌شوند (۸). اما مطالعات بر روی گیاهان، نتایج متناقضی را در برداشت. از جمله قندهاری و همکارانش در سال ۱۳۹۷، مشخص کردند که نانوذرات نقره به صورت وابسته به غلظت اثر مهاری بر رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH اعمال می‌کنند، به طوری که با افزایش غلظت تا ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر میزان مهار رادیکال‌های آزاد به بالای ۸۰ درصد افزایش می‌یابد (۱۵).شاید به این دلیل که گیاهان حاوی شبکه پیچیده‌ای از متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌هایی هستند که برای جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو سلول عمل می‌کنند و همچنین برخی توانایی بالقوه برای احیاء زیستی یونهای Ag^{+} به Ag0 را دارند؛ بنابراین سبب تولید نانوذراتی با خاصیت آنتی اکسیدانی می‌شوند (۱۶).

تکنیک‌های متعددی جهت سنتز نانو ذرات ارائه شده‌اند که از این میان تکنیک‌های سنتتیک فیزیکی و شیمیایی به موجب تولید آلودگی‌های زیست محیطی قادر به جایگزینی با تکنیک-های سبز و بیولوژیک که مقرون به صرفه‌تر بوده و سازگار با محیط زیست هستند، می‌باشند (۱۷). گیاهان دارویی دارای قابلیت منحصر به فرد برای احیاء زیستی یون‌های نقره بوده و سبب تولید نانوذرات نقره با خواص دارویی می‌شوند. از این رو گیاه خرفه به موجب دارا بودن متابولیت‌های ثانویه از جمله

فنول و فلاونوئید، کاندیدای مناسبی برای سنتز نانوذرات نقره بوده و عملکرد ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی مناسبی را نشان داده و مانع از آسیب های اکسیداتیو در سلول‌های عادی انسان می‌شوند (۱۸).

در تحقیق حاضر به سنتز سبز نانوذرات نقره از گیاه خرفه با بررسی اثرات پارامترهای مختلف بر روی سنتز این نانوذرات پرداخته شد. نتایج بررسی اثر پارامتر های pH، میزان عصاره و میزان نمک نیترات نقره نشان داد که pH ۱۰ مناسب‌ترین pH جهت سنتز نانوذرات نقره است. از طرفی میزان عصاره آبی تهیه شده از گیاه تاثیر قابل توجهی بر روی سنتز نانوذرات نقره نداشت. با این وجود نمک نیترات نقره به میزان ۲ میلی مولار در کیفیت سنتز نانوذرات نقره تاثیر گذار است. چندین مطالعه در راستای بررسی پارامترهای دخیل در سنتز نانوذرات نقره انجام گرفته است. در مطالعه Nikparast Y و همکارانش گزارش شد محیط‌های قلیایی برای سنتز نانوذرات نقره مناسب‌تر بوده و نسبت درصد عصاره به نیترات نقره (۰/۱) بهترین کارایی را داشت (۱۹). همچنین Azizian Sh و همکارانش به بررسی تاثیر پارامترهای موثر جهت بهینه نمودن سنتز نانوذرات نقره حاصل از گیاه کور نظیر pH واکنش، میزان عصاره و میزان نمک نیترات نقره پرداختند. آنها نشان دادند pH قلیایی ۹، pH بهینه برای سنتز نانوذرات نقره است که نزدیک به pH به دست آمده در تحقیق حاضر بود. تغییرات قابل توجه در طیف‌های به دست آمده از محلول‌هایی با pH مختلف بیانگر آن است که اندازه و پایداری نانوذرات سنتز شده از گیاه خرفه به این پارامتر وابسته است. همچنین بیان کردند با افزایش میزان عصاره، پیک‌های شارپ‌تری به دست آمده و سنتز نانوذرات سرعت گرفته‌اند که این نتایج برخلاف نتایج مطالعه حاضر بود. دلیل این اتفاق می‌تواند اتصال نانوذرات نقره به یکدیگر چسبیده و در نتیجه از پایداری نانوذرات کاسته شده و میزان جذب کاهش یابد. به علاوه نتایج نشان داد غلظت‌های ۰/۵ تا ۳ میلی مولار نیترات نقره، موجب افزایش چشم‌گیر در میزان جذب می‌شود. این مطالعه نیز تا حدودی همسو با نتایج به دست آمده در این مطالعه بود. مطالعات گزارش کرده‌اند که افزایش جذب در اثر ازدیاد در غلظت یون نقره بدین سبب است که یون‌ها تحت احیای بیشتری قرار گرفته و نانوذرات نقره بیشتری تولید خواهد شد (۲۰).

نتایج آزمون‌های ضد میکروبی نیز نشان دهنده تاثیرگذاری بالقوه نانوذرات سنتز شده علیه باکتری های گرم منفی بود، اما بر روی باکتری‌های گرم مثبت تاثیرات ضدباکتریایی کمی داشت. نتایج به دست آمده از آزمون دیسک گذاری و چاهک گذاری با هم مشابه بود و نشان داد بیشترین مقاومت در برابر نانوذرات نقره مربوط به سوش استافیلوکوکوس اورئوس بود. همچنین غلظت‌های پایین نانوذرات نقره موجب جلوگیری از رشد باکتری های گرم منفی شد، در حالی که غلظت‌های بالای آن (۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) از رشد سوش استافیلوکوکوس اورئوس جلوگیری نکرد. همچنین خواص آنتی اکسیدانی نانوذرات سنتز شده از عصاره گیاه خرفه بر روی سه سوش گرم منفی بررسی شد، که نتایج اذعان کردند نانوذرات نقره زیستی توانایی کاهش خاصیت کاتالازی این سوش‌ها را دارند. مطالعات متعددی نشان دهنده اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده از مسیر زیستی هستند (۲۳-۲۱). اما مطالعات حاکی از آن هستند که نانوذرات نقره زیستی اثرات ضدباکتریایی خود را علیه سوش‌های گرم مثبت نسبت به سوش های گرم منفی بیشتر القا می‌کنند که این مطالعات برخلاف اطلاعات به دست آمده در تحقیق حاضر است. نتایج بررسی خواص ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده از عصاره آبی گیاه شاه‌تره در مطالعه دوستی و همکارانش نشان داد که فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده با افزایش غلظت نانوذرات افزایش می‌یابد، به طوری که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر علیه استافیلوکوک اورئوس میانگین قطر هاله عدم رشد بزرگ‌تر از میانگین قطر محاسبه شده برای باکتری اشیریشیا کولای بود (۶). در مطالعه انجام گرفته توسط Shaik MR و همکارانش نتایج بیانگر ایجاد قطر عدم هاله رشد ۱۸ میلی متری و ۱۶ میلی متری به ترتیب در استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکولای تیمار شده با نانوذرات سنتز شده از عصاره آبی Origanum vulgare بود (۲۴). همچنین در مطالعه Dolatabadi S و همکارانش حداقل غلظت مهاری رشد و حداقل غلظت کشندگی نانوذرات نقره زیستی بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۳/۱۲ و ۶/۲۵، باسیلوس سوبتیلیس ۶/۲۵ و ۶/۲۵ و سودوموناس آئروجینوزا ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر اندازه‌گیری شد که نشان دهنده مقاومت بالای باکتری‌های گرم منفی در برابر نانوذرات سنتزی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت است (۲۵). البته مطالعه Jain D و همکارانش اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره را بر روی هر دو باکتری گرم مثبت و منفی یکسان ارزیابی کردند و این اثر را به تاثیر نانوذرات نقره بر روی دیواره و غشای باکتری‌ها نسبت دادند (۲۶). همسو با نتایج حاضر، در مطالعه Guzman M و همکارانش نانوذرات نقره سنتز شده کمترین اثر ضد میکروبی را در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کولای نشان

دادند و بیشترین اثر ضد باکتریایی علیه باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا ثبت شد که این امر به تاثیر شکل نانوذرات نسبت داده شد (۲۷).

از آن جا که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها با عوارض همراه است و از طرف دیگر، سنتز و نگهداری نانو ذرات آسان و ارزان است، این نانوذرات قادرند جایگزین قابل قبولی برای داروها و آنتی بیوتیک‌ها باشند. تکنیک به کار گرفته شده در این تحقیق جهت ساخت نانو ذرات نقره از عصاره آبی خرفه به دلیل به کارگیری منابع زیست محیطی کم مخاطره به عنوان یک روش سبز و بیولوژیک به حساب آمده و مزایای متعدد این تکنیک همچون زیست سازگاری مناسب، ارزان قیمت بودن، عدم حضور حلال های سمی و فعالیت ضد میکروبی اجازه می‌دهد تا این تکنیک در ابعاد کلان تجاری و صنعتی به کار گرفته شود.

تقدیر و تشکر

از همکاران گروه زیست و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن به علت حمایت معنوی در اجرای این کارپژوهشی تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Rajabpour M, Arabestani mR, Yousefi mashof R, Alikhani MY. MIC determination of Pseudomonas aeruginosa strains were isolated from clinical specimens of patients admitted to educational hospitals in Hamedan (90-91). Iran J Med Microbiol 2013;7:18-25.

2. Zhou Y-X, Xin H-L, Rahman K, Wang S-J, Peng C, Zhang H. Portulaca oleracea L.: a review of phytochemistry and pharmacological effects. Biomed Res Int 2015;2015:925631.

3. Hashemi B, Taghiloo S, Allahmoradi E, Karami M, Rahdar HA. Assessment of antibacterial effect of hydro-alcoholic extract of Portulaca oleracea on the human pathogen bacteria. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences 2018;25:303-8. [In Persian]

4. Safaei M. Investigation of the use of nanoparticles in the treatment of cancer and their mechanisms of action. National Conference on Nanotechnology Development; Tehran, Iran; 2017.

5. Naserian F, Heshmati F, Mehdizadeh Omrani M, Salarian R. An overview of nanoparticles and their application to drug delivery in cancer: review article. Tehran Univ Med J 2018;76:221-30. [In Persian]

6. Dousti B, Nabipour F, Hajiamraei A. Green Synthesis of Silver Nanoparticle Using Aqueous Extract of Fumaria Parviflora and Study of its Antibacterial and Antioxidant Properties. RJMS 2019;26:105-17. [In Persian]

7. Karimi J, Mohsenzadeh S. Plant synthesis of silver nanoparticles by Achillea wilhelmsii Pharmaceutical plant. RJMS 2013;20:64-9.

8. Calderón-Jiménez B, Johnson ME, Montoro Bustos AR, Murphy KE, Winchester MR, Vega Baudrit JR. Silver Nanoparticles: Technological Advances, Societal Impacts, and Metrological Challenges. Front Chem 2017;5:6.

9. Gholami A, Arabestani M R, Ahmadi M. Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanol extracts of Allium Jesdianum plant on a number of pathogenic bacteria resistant to antibiotics. PSJ 2016; 14:18-26. [In Persian]

10. Goudarzi GH, Satari M, Aslanzadeh M, Goudarzi M, Bigdeli M. Effects of sub-inhibitory Concentrations OF German Chamomile (Matricaria Recotita) Extracts on The Activity of Catalase Enzyme of S. aureus. YAFTEH 2006;7: 49-55. [In Persian]

11. Mollania N, Gharibnia F, Rostami R, Dizaj T, Kheyrabadi M. Study on the antibacterial effects of silver nanoparticles produced by α-amylase enzyme. J Sabzevar Univ Medi Sci 2016;23:214-21.

12. Farrokhi Z, Kanvisi M, Ayati A. Silver Nanoparticles: A Survey on Chemical and Biological Synthesis Methods and their Antibacterial Behavior. J Biosaf 2018;1141-58.

13. Kakaei K, Ghadimi G. Synthesis of silver nanoparticles based on reduced graphene oxide as anelectrocatalyst for cathod side of fuel cells. J Appl Chem 2019;14:51-64.

14. Ghaderi RS, Kazemi M, Soleimanpour S. Nanoparticles are More Successful Competitor than Antibiotics in Treating Bacterial Infections: A Review of the Literature. IJMM 2021;15:18-45. [In Persian]

15. Ghandehari S, Homayounitabrizi M, Ardalan P. Antioxidant And Cytotoxic Properties of Green Synthesized Silver Nanoparticles from Rubia tinctorum. JIUMS 2017:26:57-67. [In Persian]

16. Shali R, Neamati A, Ardalan P. Investigating the Cytotoxic Effect and Antioxidant Properties of Green Synthesized Silver Nanoparticles from the Root of Persicaria Bistorta on Human Liver Cancer Cell Line (Hep G2). IJMM 2018; 26:133-142. [In Persian]

17. Mohtashami M, Sepehriseresht S, Asli E, Boroumand MA, Ghasemi A. Synthesis of silver nanoparticles through chemical reduction and biosynthesis methods and evaluation of their antibacterial effects. RJMS 2012;19:65-74. [In Persian]

18. Rajan R, Chandran K, Harper SL, Yun S-I, Kalaichelvan PT. Plant extract synthesized silver nanoparticles: an ongoing source of novel biocompatible materials. Ind Crops Prod 2015;70:356-73 ..

19. Nikparast Y, Ghorbani R, Ahmadzadeh H, Asadi G. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Amarantus retroflexus and Its Antibacterial Effect. J Plant Prot Res 2018;32:139-46. [In Persian]

20. Azizian Shermeh O, Valizadeh M, Valizadeh J, Taherizadeh M, Beigomi M. Phytochemical investigation and phytosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of Capparis spinosa L. Modares J Biotech 2017;8:80-90.

21. Khatami M, Azizi Z, Pourseyedi S, Najarion O. Antibacterial effect of silver nanoparticles synthesized by green method against the standard strains Escherichia coli k12 and Escherichia coli 25922. Gorgan J Univ Med Sci 2016;17:119-24. [In Persian]

22. Shams S, Pourseyedi S. Green synthesis of silver nanoparticles in Melia azedarach fruit extract and screening its antimicrobial activity. Plant Prod Sci 2016;38:55-63.

23. Etemadi M, Mohebbi-Kalhori D, Shermeh OA, Qasemi A. Phytosynthesis of Silver Nanoparticles using aqueous extract of Camellia sinensis L. and study of their antibacterial activities. Fasa J Univ Med Sci 2017;7:39-52. [In Persian]

24. Shaik MR, Khan M, Kuniyil M, Al-Warthan A, Alkhathlan HZ, Siddiqui MRH, et al. Plant-extract-assisted green synthesis of silver nanoparticles using Origanum vulgare L. extract and their microbicidal activities. Sustainability 2018;10:913.

25. Dolatabadi S, Emrani S, Mehrafruz E, Zhiani R. Green synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles using Eucalyptus camaldulensis. Neyshabur J Univ Med Sci 2017;5:74-85. [In Persian]

26. Jain D, Daima HK, Kachhwaha S, Kothari S. Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their anti microbial activities. Dig J Nanomater Biostructures 2009;4:557-63.

27. Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine 2012;8:37-45.