

سنتر زیستی نانوذرات نقره و مقایسه فعالیت ضدباکتریایی آنها علیه باسیلوس سرئوس و

سراشیا مارسسنس

فریبا حاج محمدی و جعفر همت*

ایران، تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۱

چکیده

سنتر زیستی خارج سلولی نانوذرات نقره، با استفاده از سیستم باکتریایی می‌تواند یک روش مناسب جهت عدم به کارگیری مواد شیمیایی باشد. بر این اساس، هدف این مطالعه سنتر زیستی نانوذرات نقره و مقایسه فعالیت ضدباکتریایی آنها علیه باسیلوس سرئوس و سراشیا مارسسنس بود. سنتر زیستی نانوذرات نقره با استفاده از سویه جدید قلیادوست /یزوپتریکولا واریابلیس و ضایعات سلولزی انجام شد. نانوذرات نقره بوسیله پراکندگی نوری پویا و میکروسکوپ الکترونی روبشی و DLS مشخصه‌یابی شدند. سپس نانوذرات تولیدی با طراحی آزمایش با استفاده از روش سطح پاسخ بهینه شدند. فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره با استفاده از روش انتشار دیسک (کربی-بائر) بر روی محیط مولر هیتون آگار بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره بهینه شده با متوسط اندازه ۷۷/۳ نانومتر و شاخص پراکندگی ۰/۴۵ بدست آمدند. خواص ضدباکتریایی نانوذرات با افزایش غلظت آن‌ها افزایش یافت، حداکثر قطر هاله عدم رشد در غلظت ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات نقره برای باسیلوس سرئوس و سراشیا مارسسنس به ترتیب ۹/۶۶ و ۱۰/۶۶ میلی‌متر تعیین شد. اما با کاهش تراکم نانوذرات نقره تا غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هم، فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های باسیلوس سرئوس و سراشیا مارسسنس همچنان قابل مشاهده است. نتایج بدست آمده بیان‌گر حساسیت بیش‌تر سراشیا مارسسنس در مقایسه با باسیلوس سرئوس نسبت به نانوذرات نقره بود. بنابراین، نانوذره سنتر شده دارای خاصیت ضد باکتریایی موثر است و سراشیا مارسسنس نسبت به باسیلوس سرئوس در مقابل آن تقریباً پنج برابر حساستر است.

واژه‌های کلیدی: اثرات ضد باکتریایی، /یزوپتریکولا واریابلیس، نانوذرات نقره

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۵۷۵۹۴۵۱، پست الکترونیکی: j.hemmat@gmail.com

مقدمه

قرون متمادی است که بشر به خاصیت ضد میکروبی نقره دست پیدا کرده است، در حال حاضر نقره دارای کاربردهای متنوعی برای کنترل رشد باکتری‌ها از جمله مصارف دندان پزشکی، کاترها، سوختگی، استئومیلیت و عفونت‌های دستگاه ادراری است. ظهور و افزایش ارگانسیم‌های میکروبی مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و تاکید مداوم بر هزینه‌های درمانی، منجر به استفاده مجدد از ترکیبات آنتی‌سپتیک نقره گردید، در مقایسه با آنتی‌بیوتیک-ها این ترکیبات دارای طیف وسیعتری از فعالیت هستند و قرون متمادی است که بشر به خاصیت ضد میکروبی نقره دست پیدا کرده است، در حال حاضر نقره دارای کاربردهای متنوعی برای کنترل رشد باکتری‌ها از جمله مصارف دندان پزشکی، کاترها، سوختگی، استئومیلیت و عفونت‌های دستگاه ادراری است. ظهور و افزایش ارگانسیم‌های میکروبی مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و تاکید مداوم بر هزینه‌های درمانی، منجر به استفاده مجدد از ترکیبات آنتی‌سپتیک نقره گردید، در مقایسه با آنتی‌بیوتیک-ها این ترکیبات دارای طیف وسیعتری از فعالیت هستند و

میل پایین‌تر به القاء مقاومت میکروبی دارند (۲۶ و ۱۱). از میان زمینه‌های مختلف نانو فناوری، سنتر نانوذرات بویژه نانوذرات فلزی در مرکز توجه بسیاری از محققین قرار دارد. برخلاف مواد توده‌ای، نانوذرات فلزی دارای خواص فیزیکی، شیمیایی، زیستی، الکتریکی، مکانیکی، مغناطیسی، حرارتی و دی‌الکترونیک منحصر به فردی است (۲۰). خواص منحصر بفرد نانوذرات فلزی نه تنها بدلیل ابعاد بسیار کوچک نانوذرات و افزایش نسبت سطح به حجم آنها بلکه بدلیل تغییر در شبکه کریستالی، انرژی پیوند بین اتمی و

ساختار الکترونیکی در ابعاد نانومتری رخ می‌دهد. در میان نانوذرات فلزی، نانو نقره بدلیل کاربردهای گسترده آن در زمینه‌های مختلف زیست فناوری و پزشکی از اهمیت بالایی برخوردار است (۵، ۷، ۲۵).

امروزه رویکرد ساخت نانوذرات تغییر کرده و تلاش‌های زیادی جهت سنتز زیستی آنها از جمله استفاده از توان باکتری‌ها در حال انجام است (۳، ۱). اساس این روش احیای یون‌های نقره توسط مولکول‌های زیستی موجود در محلول رویی باکتری است. هدف این تحقیقات دستیابی به روشی ساده، سریع، سازگار با محیط زیست و از لحاظ اقتصادی مقرون بصره در تولید نانوذرات است (۲۸).

در سال‌های اخیر گروه‌های تحقیقاتی اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره را مورد بررسی قرار دادند (۳۸). گزارش‌های متعددی در زمینه بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، *ویبریو کلرا* (*Vibrio cholera*) و *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) و *اشرشیاکلی* (*E. coli*) موجود است (۱۶، ۱۹، ۲۶). در مطالعه کیم و همکاران فعالیت ضدقارچی نانوذرات نقره بر علیه چهل و چهار سویه از شش گونه‌ی بالینی از قارچ تریکوفیتون متاگروفیتس (*Trichophyton mentagrophytes*) و گونه‌ی *کاندیدا آلبیکانس* (*Candida albicans*) بررسی شد که نتایج از اثرات ضد قارچی نانوذرات حکایت داشت (۱۷). تحقیقات معدودی در مورد اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره علیه ویروس‌ها انجام گرفته است، از جمله بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره علیه ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسان (HIV)، ویروس هپاتیت ب و ویروس آنفلوانزا A/H1N1 (۹، ۱۸، ۲۹). این مطالعات نشان داد برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها که معمولاً تنها دارای اثرات کشنده و مهاری علیه باکتری‌ها هستند، نانوذرات نقره علاوه بر اثر مهارکننده علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها، دارای اثر مهارکننده

علیه قارچ‌ها و حتی ویروس‌ها میباشد (۲۸).

هدف از این مطالعه، سنتز زیستی نانوذرات نقره بوسیله سویه قلیادوست *ایزوپتریکولا واریابلیس* IRSH1 و مقایسه اثرات ضدباکتریایی نوع بهینه شده آنها بر علیه باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) و *سراشیا مارسسنس* (*Serratia marcescens*) بود.

مواد شیمیایی و سویه‌های باکتریایی: نیترات نقره (۱/۰ مولار) و تمامی محیط‌های کشت مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک آلمان خریداری شد. دیسک‌های استاندارد از شرکت پادتن طب خریداری شد. جهت سنتز خارج سلولی نانوذرات نقره از محلول رویی کشت سویه‌ی جدید IRSH1 که قبلاً از چشمه آبگرم رامسر واقع در شمال ایران جدا سازی و به عنوان *ایزوپتریکولا واریابلیس* (*Isoptericola variabilis* sp. IRH1) (Genbank accession number KR856182) شناسایی شده بود، (۱) استفاده شد. سویه‌های *باسیلوس سرئوس* (PTCC1247) و *سراشیا مارسسنس* (PTTC1111) از مرکز کلکسیون میکروارگانسیم‌های صنعتی ایران تهیه شد. در تمامی مراحل آزمایش سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر انجام شد.

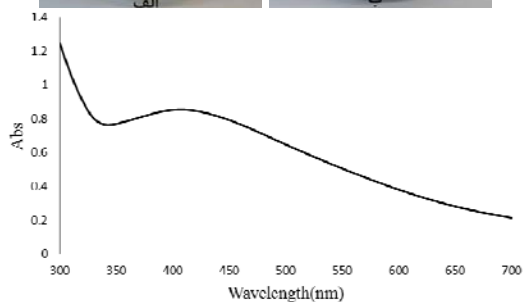
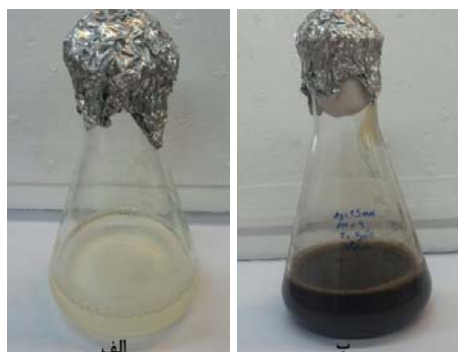
سنتز خارج سلولی نانوذرات نقره و تعیین خصوصیات آنها: سویه *ایزوپتریکولا واریابلیس* IRSH1 در ارلن مایر با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی محیط کشت مایع و ضایعات که پیش از این نحوه تهیه آن در مقاله عزیزی و همکاران توصیف شد (۶)، کشت داده شد. باکتری سپس با استفاده از محلول رویی کشت آن به عنوان عامل احیاء و به روش قبلاً شرح داده شده کلونید نانوذرات نقره ساخته شد. به طور خلاصه باکتری در محیط کشت ترکیبی و با استفاده از ضایعات سلولزی به عنوان منبع کربن در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و دور شیکر ۱۷۰ دور بر دقیقه بمدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. پس از سانتریفیوژ در دور ۶۰۰۰ دور بر دقیقه و بمدت ۱۵ دقیقه، به محلول رویی باکتری، محلول

بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده بر علیه میکروارگانیزم‌ها: فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره بهینه‌سازی شده با استفاده از روش انتشار دیسک (کربی-بائر) بر علیه سویه‌های باسیلوس سرئوس (PTCC1247) و *S. aureus* (PTCC1111) به ترتیب به عنوان نماینده باکتری‌های گرم مثبت و منفی و دو عامل آلودگی مواد غذایی، بر روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هیتون آگار مورد بررسی قرار گرفت. به منظور انجام مطالعه‌های میکروبی، سویه‌های باکتریایی بر روی محیط نوترینت آگار شیبدار کشت داده شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هنگام تهیه کشت مایع، یک لوپ پر از هر نمونه از باکتری در شرایط کاملاً سترون در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هیتون برات بصورت جداگانه کشت داده شد، سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. رقت مناسب از هر باکتری بر اساس استاندارد ۰/۵ مک فارلند که معادل ۱۰۵-۱۰۶ واحد تشکیل دهنده کلونی در هر میلی‌لیتر است؛ با استفاده از محلول سرم فیزیولوژی (۰.۹% NaCl) تهیه شد. برای افزایش دقت عمل، میزان جذب نوری ۰/۵ مک فارلند توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Lambda25, USA) تعیین شد. در نهایت هریک از باکتری‌های مورد بررسی بر روی پلیت‌های جداگانه با استفاده از روش کشت چمنی بصورت یکنواخت گسترش یافت. سپس بر روی هریک از دیسک‌ها ۲۵ میکرولیتر از محلول نانوذرات نقره بهینه‌سازی شده با رقت مناسب ریخته شد و در نقطه‌های مشخص شده بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار قرار گرفت. سپس بر روی یکی از دیسک‌های خام ۲۵ میکرولیتر از محلول نیترات نقره به عنوان کنترل ریخته شد؛ در نهایت پلیت‌ها بمدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور گرماگذاری شد. قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها با استفاده از کولیس ورنیه اندازه‌گیری و ثبت شد (۲۳، ۲۴، ۲۵). تمام

نیترات نقره ۰.۵ مولار افزوده شد تا عوامل احیاء موجود در آن (قند و پروتئین‌ها) با احیای یون‌های نقره، نانوذرات نقره را تولید نمایند (۱، ۱۳). میانگین اندازه و شاخص پراکندگی (Polydispersity index (PDI)) نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه تفرق نور پویا (Dynamic Light Scattering instrument (DLS)) (Malvern, UK) در محدوده ۰/۱ نانومتر تا ۱۰۴ نانومتر و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. به منظور بررسی شکل ظاهری نمونه‌های ساخته شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (VEGA3.Tescan, Czech) استفاده شد. نانوذرات نقره در دمای محیط با لایه نازکی از طلا پوشانده شد و در نهایت در ولتاژ ۲۰ کیلووات با میکروسکوپ الکترونی مطالعه شد (۱۴). برای تعیین ترکیبات عنصری نمونه کلوئیدی از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل VEGA3.Tescan مجهز به طیف‌سنج توزیع انرژی (EDX) استفاده شد. برای آماده‌سازی نمونه، نانوذرات کلوئیدی توسط خشک‌کن انجمادی به ذرات جامد تبدیل شد. سپس نمونه جامد نانوذرات نقره روی پایه آلومینیومی قرار داده شد. در نهایت برای ایجاد رسانایی با لایه‌ای از طلا پوشانده شد.

طراحی آزمایش به منظور بهینه‌سازی ساخت نانوذرات نقره انجام شد. ابتدا جهت شناسایی فاکتورهایی که اثر قابل توجهی در سنتز زیستی نانوذرات نقره دارند، پنج فاکتور شامل: غلظت نیترات نقره، نور، دما، pH محلول واکنش و منبع نیتروژن محیط کشت باکتریایی با استفاده از روش پلکت برمن (۱۰) مورد غربالگری قرار گرفت. پس از غربالگری فاکتورها و تعیین سه فاکتور موثر بر ساخت نانوذرات نقره، بهینه‌سازی سنتز نانوذرات با استفاده از روش سطح پاسخ انجام شد، به منظور انجام بهینه‌سازی با استفاده از طراحی پلکت برمن و روش سطح پاسخ به ترتیب از نرم‌افزارهای Minitab 17 و Design Expert7 استفاده شد (۱۰، ۲۱).

پس از آن که ساخت نانوذرات نقره بر اساس طیف جذب UV-Vis و تغییر رنگ محیط واکنش (شکل ۱) محرز شد، به منظور تعیین فاکتورهای موثر در سنتز نانوذرات نقره، برای غربالگری فاکتورها از طراحی آزمایش Plackett-Burman در دو سطح استفاده شد. پنج فاکتور شامل غلظت نقره نیترات، نور، دما، منبع نیتروژن محیط کشت باکتریایی و pH محلول واکنش مورد بررسی قرار گرفت. نرم افزار برای بررسی این پنج فاکتور دوازده Run را بصورت تصادفی طراحی کرد. پس از انجام آزمایش‌ها از طیف سنجی UV-Vis برای تعیین مساحت زیر سطح نمودار در محدوده ۴۰۰-۴۶۰ (غلظت نانوذرات سنتز شده) استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها از مقدار $\alpha=0.2$ استفاده شد. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز به ترتیب سه فاکتور نور، غلظت نقره نیترات، pH محلول واکنش بیشترین تاثیر را در سنتز نانوذرات نقره داشته (شکل ۲) و به عنوان فاکتورهای موثر برای انجام طرح آزمایش RSM به کار گرفته شد. سنتز زیستی نانوذرات نقره در شرایط بهینه بدست آمده از طرح آزمایشی انجام شد (۱۲).



ج

شکل ۱- ارنل حاوی محلول روی محیط کشت باکتری / ایزوپتريکولا

آزمایش‌های مربوط به تعیین قطر هاله عدم رشد با سه بار تکرار انجام شدند. تمامی نتایج این پژوهش بصورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار Minitab17 و آزمون‌های آماری واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و توکی (Tukey) تحلیل شدند.

نتایج و بحث

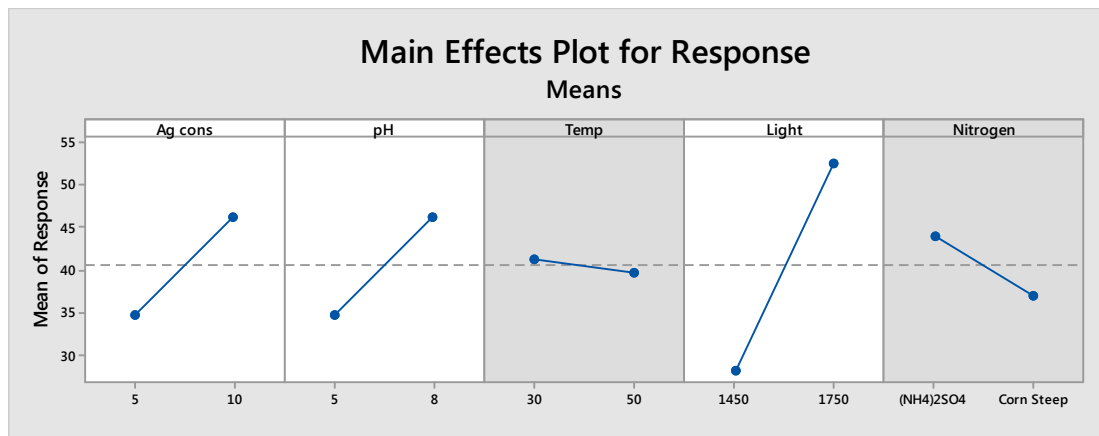
مواد و ترکیبات فعال زیستی موجود در محلول رویی باکتریها همچنین ترکیبات موجود در عصاره‌های گیاهان از جمله فلاونوئیدها میتوانند برای احیا یون‌های فلزی به نانوذرات مورد استفاده قرارگیرند (۱،۲،۳). از این رو در این تحقیق سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از محلول رویی سویه قلیادوست / ایزوپتريکولا و اریابلیس IRSH1 انجام شد و اثرات ضدباکتریایی آن مورد بررسی قرار گرفت.

حضور رنگ قهوه‌ای در محلول نیترات نقره تیمار شده با محلول رویی باکتری نشان دهنده ساخت نانوذرات نقره است. تغییر رنگ مخلوط واکنش به رنگ قهوه‌ای از ویژگی‌های رزونانس پلاسمون سطح نانوذرات نقره و شاهدهی بر ساخت خارج سلولی نانوذرات نقره است (۳،۱۳). این نتایج نشان داد که محلول رویی باکتری ایزوپتريکولا واری ابلیس توانایی ساخت خارج سلولی نانوذرات نقره را دارد (شکل ۱-ب).

برای تأیید تشکیل نانوذرات نقره توسط محلول رویی باکتری، کلونید نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در محدوده ۳۰۰-۷۰۰ nm اسکن شد. پیک جذب قوی در ۴۱۱ nm با جذب ۰/۸۵ نیز نشان دهنده تولید نانوذرات نقره با استفاده از محلول رویی باکتری ایزوپتريکولا واری ابلیس می‌باشد (شکل ۱-ج). بیشینه جذب نانوذرات نقره معمولاً در محدوده ۳۹۰ nm تا ۴۶۰ nm است، این قابلیت جذب بعلت رزونانس پلاسمون سطح نانوذرات نقره است.

نانوذرات نقره حاصل از واکنش محلول ۵mM نیترات نقره با محلول رویی باکتری پس از ۴۸ ساعت

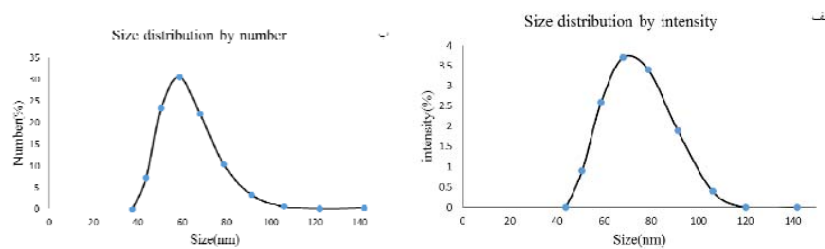
واریبالیس الف) قبل از انجام واکنش ب) ۴۸ ساعت پس از اینکه در معرض محلول نقره نیترات قرار گرفت. ج) طیف جذب کلونید



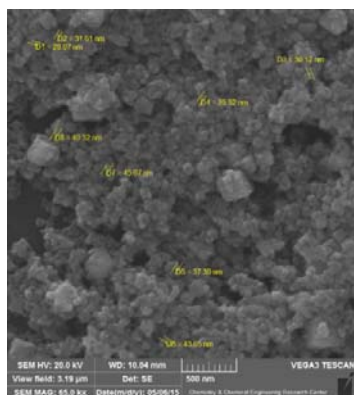
شکل ۲ - نمودار اثرات اصلی ۵ فاکتور دخیل در فرآیند ساخت نانوذرات نقره، خروجی برنامه Plackett-Burman

تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، سنتز نانوذرات نقره بهینه شده با ابعاد کمتر از ۱۰۰ نانومتر و بصورت کروی شکل را نشان داد (شکل ۴).

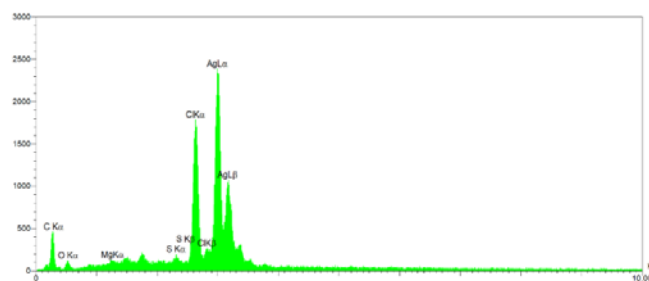
جهت بررسی میانگین اندازه و شاخص پراکندگی نانوذرات نقره بهینه شده آنالیز DLS انجام شد. بر اساس نتایج بدست آمده میانگین اندازه نانوذرات سنتز شده ۷۷/۳ نانومتر و شاخص پراکندگی آنها ۰/۴۵ تعیین شد (شکل ۳).



شکل ۳- آنالیز DLS کلونید نانوذرات نقره حاصل از مخلوط واکنش در شرایط بهینه الف) توزیع اندازه نانوذرات بر اساس شدت پراکندگی ب) توزیع اندازه نانوذرات بر اساس تعداد.



الف)



ب)

شکل ۴- تصویر SEM نانوذرات نقره بهینه شده به روش سطح پاسخ الف) و آنالیز EDX حاصل از کلونید نانوذرات نقره ساخته شده از محلول رویی محیط کشت باکتری ب).

جهت ارزیابی اثرات ضدباکتریایی نانوذرات نقره ساخته شده تحت شرایط بهینه، رقت‌های $100 \mu\text{g/mL}$ ، $2000 \mu\text{g/mL}$ ، $500 \mu\text{g/mL}$ ، $1000 \mu\text{g/mL}$ و $3000 \mu\text{g/mL}$ تهیه شد. نتایج (جدول ۱) نشان داد که نانوذرات نقره بهینه‌سازی شده دارای اثر بازدارندگی و مهارکنندگی معنی داری بر روی باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* و باکتری‌های گرم منفی *سراسیا مارسنس* است ($p < 0.05$). در این مطالعه خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره بهینه شده با افزایش غلظت این ذرات افزایش یافت، بعلاوه در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بهینه شده قطر هاله عدم رشد بزرگتری برای *سراسیا مارسنس* در مقایسه با *باسیلوس سرئوس* بدست آمد ($p < 0.05$) (شکل ۵). مقایسه نسبی نتایج بدست آمده، بیانگر حساسیت بیش‌تر *سراسیا مارسنس* در مقایسه با *باسیلوس سرئوس* نسبت به نانوذرات نقره بود (جدول ۱).

در آنالیز EDX پیک مربوط به فلز نقره به وضوح دیده شد، این پیک نشان‌دهنده آن است که نانوذرات مشاهده شده در تصاویر SEM از جنس نقره است (شکل ۴). مشاهده باند جذب نوری در 3KeV نشان‌دهنده وجود نانوذرات فلزی از جنس نقره است (۲۳). البته وجود پیک عناصر S, Cl, C, O در طیف EDX مربوط به بقایای ناشی از مواد موجود در سوپرناتانت باکتری از قبیل بقایای آنزیمی یا پروتئینی است.

ارزیابی اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره بهینه‌سازی شده با استفاده از روش انتشار دیسک (کربی-بائر) انجام شد. به عنوان کنترل مثبت، برای باکتری گرم منفی (*سراسیا مارسنس*) و برای باکتری گرم مثبت (*باسیلوس سرئوس*) به ترتیب دو آنتی بیوتیک استاندارد آزیترومایسین و ونکومایسین همزمان مورد ارزیابی قرار گرفت. از دیسک آغشته به محلول نقره نیترات با غلظت 10 mM نیز به عنوان کنترل استفاده شد.



(الف)

(ب)

شکل ۵- اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره بهینه‌شده علیه (الف) باکتری *سراسیا مارسنس*. در غلظت‌های 100 ، 500 ، 1000 ، 2000 و $3000 \mu\text{g/mL}$ کنترل مثبت آزیترومایسین و (ب) باکتری *باسیلوس سرئوس*. در غلظت‌های 100 ، 500 ، 1000 ، 2000 و $3000 \mu\text{g/mL}$ ، کنترل مثبت ونکومایسین.

جدول ۱- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره

| باکتری‌ها | نیترات نقره | $100 \mu\text{g/ml}$ | $500 \mu\text{g/ml}$ | $1000 \mu\text{g/ml}$ | $2000 \mu\text{g/ml}$ | $3000 \mu\text{g/ml}$ |
|----------------------------|-----------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Bacillus cereus</i> | ۸ | ۰ | ۸ | 8.33 ± 0.5 | 9 ± 1 | 9.66 ± 0.5 |
| <i>Serratia marcescens</i> | 8.33 ± 0.57 | ۸ | ۹ | 9.33 ± 0.57 | 10.33 ± 0.57 | 10.66 ± 0.57 |

نتایج این پژوهش ضمن تایید کارآمدی نانوذرات نقره ساخته شده به روش زیستی، نشان‌دهنده تأثیر قوی‌تر نانوذرات نقره در مهار رشد باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت بود. گزارش‌های متعددی مبنی بر خاصیت ضد میکروبی قوی‌تر نانو ذرات نقره علیه باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت وجود دارد (۲۷، ۱۵). بر اساس مطالعه لین (Lin) و همکاران با توجه به اینکه بار منفی بیشتری در لایه لیپوپلی ساکاریدی باکتری‌های گرم منفی وجود دارد، یون‌های نقره آزاد شده از نانو ذرات نقره به بار منفی موجود در دیواره سلولی متصل می‌شود که منجر به دناتورده شدن پروتئین‌های موجود در دیواره سلولی، از هم گسیختگی دیواره و در نهایت منجر به مرگ سلول باکتری می‌شود (۳۰).

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد نانوذرات نقره سنتز شده، بر علیه سویه‌های *باسیلوس سرئوس* و *سراشیا مارسینس* دارای فعالیت ضد میکروبی است. نتایج بدست آمده بیان‌گر حساسیت بیش‌تر *سراشیا مارسینس* در مقایسه با *باسیلوس سرئوس* نسبت به نانوذرات نقره بود. و *سراشیا مارسینس* نسبت به *باسیلوس سرئوس* در مقابل نانوذره سنتز شده پنج برابر حساستر است.

با توجه به استفاده از روش زیستی همچنین استفاده از محیط کشت مبتنی بر ضایعات کشاورزی جهت سنتز نانو ذرات و عدم استفاده از مواد شیمیایی و حلال‌های سمی در این روش، نانو ذرات نقره دارای پتانسیل کاربرد در حوزه های زیستی، بهداشت و درمان است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی جهت مساعدت در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

در سال‌های اخیر اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره توسط گروه‌های تحقیقاتی مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه اوتاری و همکاران (۲۲) نانوذرات نقره به روش سنتز زیستی از محلول رویی باکتری *اکتینوباکتر رودوکوکوس (Actinobacteria Rhodococcus)* با میانگین اندازه ۳۰ نانومتر تولید شد، نانوذرات مذکور دارای اثر مهارکنندگی بر روی رشد باکتری‌های *اشرشیاکلی، استفیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* بود، قطر هاله عدم رشد برای این باکتری‌ها به ترتیب ۲۱، ۲۰ و ۱۹ میلی‌متر بود (۲۲). در مطالعه حاضر حداکثر هاله عدم رشد برای باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *سراشیا مارسینس* به ترتیب ۹،۶۶ و ۱۰،۶۶ میلی‌متر تعیین شد. اما با کاهش تراکم نانوذرات نقره تا غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به ترتیب فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *سراشیا مارسینس* قابل مشاهده است. تا به امروز مطالعات زیادی در مورد اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره علیه جدایه‌های مختلف باکتریایی گزارش شده است. اگرچه مقالات متعدد روش‌های مختلفی را برای توضیح عملکرد ضد باکتریایی نانوذرات نقره پیشنهاد داده‌اند اما مکانیسم دقیق این فرآیند بطور کامل درک نشده است. بطور خلاصه رایج‌ترین مکانیسم برای اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره عبارت از این است که نانوذرات نقره از طریق آزاد کردن نقره بصورت یونی و غیرفعال کردن گروه‌های تیول موجود در آنزیم‌ها که باعث غیرفعال کردن آنزیم‌های باکتریایی می‌شوند. یون‌های نقره آزاد شده همانندسازی DNA باکتری را مهار می‌کنند، منجر به آسیب سیتوپلاسم سلولی می‌شوند، باعث کاهش سطح آدنوزین تری فسفات (ATP) و در نهایت مرگ سلول باکتریایی را به همراه دارند. افزایش نسبت سطح به حجم نانوذرات باعث افزایش سطح اتصال نانوذرات به سلول باکتری می‌شود و افزایش میزان انتشار یون‌های نقره به باکتری و در نتیجه بهبود اثر ضدباکتریایی نقره می‌شود (۱۱).

منابع

۱. حاج محمدی ف، سلیمانی ز، همت ج، ۱۳۹۶، بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده توسط سویه جدید مقاوم حرارت ایزوپتریکولا واربابلیس IRSH1 علیه باکتری‌های استفایلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، شماره ۳، ۳۰-۲۳.
۲. رضایی آ، پورعلی پ، یحیایی ب، ۱۳۹۵، بررسی اثرات سمیت سلولی نانوذرات طلائی تولیدی توسط *Bacillus cereus* بر روی رده های سلولی هپاتوسیت و فیبروبلاست. مجله *coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of biomedical materials research*, 52(4), 662-668.
۳. کاوسی س، هاشم یعقوبی ه. ۱۳۹۶، سنتز نانو ذرات نقره به روش سبز با استفاده از عصاره گیاه مرزنجوش اروپایی (*majorana Origanum*) بررسی اثرات ضد میکروبی آن. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، شماره ۲، ۳۱۱-۲۹۹.
۴. Abd-Elnaby, H. M., Abo-Elala, G. M., Abdel-Raouf, U. M., & Hamed, M. M. (2016). Antibacterial and anticancer activity of extracellular synthesized silver nanoparticles from marine *Streptomyces rochei* MHM13. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42(3), 301-312.
۵. Anthony, K. J. P., Murugan, M., & Gurunathan, S. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles from the culture supernatant of *Bacillus marisflavi* and their potential antibacterial activity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(4), 1505-1510.
۶. Azizi, M., Hemmat, J., Seifati, S. M., Torktaz, I., & Karimi, S. (2015). Characterization of a thermostable endoglucanase produced by *Isopericla variabilis* sp. IDAH9. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 1225-1234.
۷. Cao, G. (2004). Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, properties and Application. *London, Imperial College*, 7-1132-69.
۸. Devi, L. S., & Joshi, S. (2012). Antimicrobial and synergistic effects of silver nanoparticles synthesized using soil fungi of high altitudes of Eastern Himalaya. *Mycobiology*, 40(1), 27-34.
۹. Elechiguerra, J. L., Burt, J. L., Morones, J. R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H. H., & Yacaman, M. J. (2005). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J nanobiotechnol*, 3(6), 1-10.
۱۰. Fathima, B. S., & Balakrishnan, R. M. (2014). Biosynthesis and optimization of silver nanoparticles by endophytic fungus *Fusarium solani*. *Materials Letters*, 132, 428-431.
۱۱. Feng, Q., Wu, J., Chen, G., Cui, F., Kim, T., & Kim, J. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of biomedical materials research*, 52(4), 662-668.
۱۲. Fowlkes, W. Y., & Creveling, C. M. (1995). *Engineering methods for robust product design*: Addison-Wesley.
۱۳. Gurunathan, S., Kalishwaralal, K., Vaidyanathan, R., Venkataraman, D., Pandian, S. R. K., Muniyandi, J., . . . Eom, S. H. (2009). Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1), 328-335.
۱۴. Hamedi, S., Shojaosadati, S. A., Shokrollahzadeh, S., & Hashemi-Najafabadi, S. (2014). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using a novel and non-pathogenic fungus, *Neurospora intermedia*: controlled synthesis and antibacterial activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(2), 693-704.
۱۵. Kalpana, D., & Lee, Y. S. (2013). Synthesis and characterization of bactericidal silver nanoparticles using cultural filtrate of simulated microgravity grown *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme and microbial technology*, 52(3), 151-156.
۱۶. Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., . . . Hwang, C.-Y. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95-101.
۱۷. Kim, K.-J., Sung, W. S., Moon, S.-K., Choi, J.-S., Kim, J. G., & Lee, D. G. (2008). Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J Microbiol Biotechnol*, 18(8), 1482-1484.
۱۸. Lu, L., Sun, R., Chen, R., Hui, C.-K., Ho, C.-M., Luk, J. M., . . . Che, C.-M. (2008). Silver

- nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antiviral therapy*, 13(2), 253.
19. Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346.
 20. Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in colloid and interface science*, 156(1), 1-13.
 21. Nyakundi, E. O., & Padmanabhan, M. N. (2015). Green chemistry focus on optimization of silver nanoparticles using response surface methodology (RSM) and mosquitocidal activity: *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 149, 978-984.
 22. Otari, S., Patil, R., Nadaf, N., Ghosh, S., & Pawar, S. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles by microorganism using organic pollutant: its antimicrobial and catalytic application. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(2), 1503-1513.
 23. Priyadarshini, S., Gopinath, V., Meera Priyadharshini, N., MubarakAli, D., & Velusamy, P. (2013). Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using novel strain, *Bacillus flexus* and its biomedical application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 232-237.
 24. Reller, L. B., Weinstein, M., Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases*, 49(11), 1749-1755.
 25. Shahverdi, A. R., Fakhimi, A., Shahverdi, H. R., & Minaian, S. (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(2), 168-171.
 26. Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., & Dash, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 18(22), 225103.
 27. Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science*, 275(1), 177-182.
 28. Tran, Q. H., & Le, A.-T. (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3), 033001.
 29. Xiang, D.-x., Chen, Q., Pang, L., & Zheng, C.-l. (2011). Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro. *Journal of virological methods*, 178(1), 137-142.
 30. Yu-sen, E. L., Vidic, R. D., Stout, J. E., McCartney, C. A., & Victor, L. Y. (1998). Inactivation of *Mycobacterium avium* by copper and silver ions. *Water Research*, 32(7), 1997-2000.

Biosynthesis of silver nanoparticles and the comparison of their antibacterial activity against *Bacillus cereus* and *Serratia marcescens*

Hajmohammadi F. and Hemmat J.

Dept. of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

The extracellular biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using a bacterial system could be a probable approach, avoiding using destructive chemicals. The aim of this study was the biosynthesis of silver nanoparticles and comparison of their antibacterial activity against *Bacillus cereus* and *Serratia marcescens*. Biosynthesis of AgNPs was done using novel strains of alkalophile *Isoptericola variabilis* sp. IRSH1 and waste agriculture. AgNPs were characterized by dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (SEM). Their synthesis were optimized by experimental design using response surface methodology (RSM). The antibacterial activities of the silver nanoparticles were examined by the standard Kirby–Bauer disc diffusion method on Muller–Hinton agar plates. The results showed the optimized silver nanoparticles were formed with an average size of 77.30 nm and 0.45 polydispersity index (PDI). The antibacterial property of the nanoparticles increased with their increasing concentrations and the maximum inhibition zones against *B. cereus* and *S. marcescens* were found 9.66 mm and 10.66 mm in 3000 µg/ml concentration of silver nanoparticles, respectively. In despite of reducing the density of AgNPs from 3000 µg/ml concentration to 500 and 100 µg/ml concentrations, antibacterial activity against *Bacillus cereus* and *S. marcescens* were still visible. Consequently, the biosynthesized AgNPs has efficient antibacterial activity against *B. cereus* and *S. marcescens*. The results indicate that *S. marcescens* is approximately five times sensitive more than *B. cereus* to silver nanoparticles.

Key words: Ag nanoparticle, antibacterial activity, *Isoptericola variabilis*,