DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.1.0

سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه *Dracocephalum kotschyi* و بررسی اثرات ضدباکتریایی آن

شبنم یعقوبی[۱]، امیر میرزایی[۲] و آرزو دست پاک[۱*]

[۱] **ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، گروه زیست شناسی**

[۲] **ایران، پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، گروه زیست شناسی**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۴

چکیده

عفونتهای بیمارستانی از جمله عفونتهایی هستند که امروزه در مراکز درمانی شیوع بالایی دارند. استفاده زیاد و نامناسب از آنتی بیوتیکهای وسیع الطیف، مقاومتهای آنتی بیوتیکی را افزایش داده است. هدف از این مطالعه سنتز زیستی نانوذره نقره با استفاده از عصاره زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) و بررسی اثرات ضدباکتریایی آن می باشد. در این مطالعه تجربی، نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه *D. kotschyi* سنتز گردید و ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی آن با استفاده از طیف سنجی مرئی فرابنفش (UV-Vis)، پراش اشعه ایکس (XRD)، طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و میکروسکوپ الکترونی نگاره (TEM) بررسی شد. در نهایت اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات نقره سنتز شده بر روی سویه‌های استاندارد باکتریایی به دو روش انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) انجام گرفت. نتایج نشان داد که قطر اندازه نانو ذرات نقره سنتز شده ۱۴/۵۷ نانومتر بود و نتایج طیف سنجی مرئی، XRD و FTIR ساختار کریستالی نانوذره نقره را تأیید کردند. همچنین نتایج تست ضدباکتریایی نشان داد که باکتریهای *استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا پنومونیه و لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر حساس بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانو ذره نقره سنتز شده توسط گیاه *D. kotschyi* دارای پتانسیل ضد باکتریایی معناداری علیه پاتوژنهای بیمارستانی است و می تواند به عنوان یکی از دستاوردهای نانو در درمان عفونتهای بیمارستانی عمل کند.

واژه های کلیدی: سنتز زیستی، نانوذره نقره، *Dracocephalum kotschyi*، فعالیت ضدباکتریایی

* نویسنده مسئول، تلفن : ۴۴۶۰۰۱۳۰، ایمیل: Arezoo.dastpak@iauctb.ac.ir

مقدمه

عفونتهای باکتریایی یکی از عوامل اصلی مرگ و میر میلیونها انسان در سراسر دنیا هستند که یکی از دلایل اصلی آن، ایجاد عوامل بیماریزای جدید و تکامل سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک است. عوامل بیماریزا، روشهای مؤثری را برای خنثی کردن اثر عوامل ضد باکتریایی ایجاد می کنند. به همین دلیل، گرچه آنتی بیوتیکهای بسیاری ابداع شده اند ولی تعداد بسیار کمی از آنها در مقابل سویه های مقاوم باکتریایی مؤثر بوده اند. بنابراین، طراحی و تکامل آنتی بیوتیکهای جدیدی که بر این محدودیتها غلبه کنند، از اهمیت زیادی برخوردار است (۱۴ و ۲۸).

اخیراً نانوذرات به طور موفقیت آمیزی برای رهایش عوامل دارویی، شناسایی بیماریهای مزمن، درمان عفونتهای باکتریایی و نیز در صنایع غذایی به عنوان عوامل ضدباکتریایی قوی استفاده شده اند (۱۸). در میان نانوذرات مختلف، نانوذرات نقره به دلیل فعالیت ضدباکتریایی قوی و مکانیسم عمل خاص، گزینه ای مناسب برای تهیه نسل

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.1.0

جدیدی از عوامل آنتی باکتریال هستند. هرچند برای قرنها از نقره به عنوان یک ماده ضدباکتریایی استفاده شده است ولی به تازگی دانشمندان توجه زیادی به این عنصر برای حل مشکل مقاومت دارویی در اثر استفاده نادرست از آنتی بیوتیکها نشان داده اند (۲۳-۴). به نظر می رسد که نانوذرات نقره از طریق اتصال به دیواره سلولی باکتری، باعث اختلال در نفوذپذیری دیواره سلولی و آثار سمی بر سلول می شوند (۱۸). نانوذرات نقره احتمالاً به سلول هم نفوذ می کنند و با گروههای تیول در اسید آمینه سیستئین کمپلکس تشکیل می دهند و از این طریق آنزیمهای حیاتی را غیرفعال می کنند. همچنین نانوذرات باعث تشکیل رادیکالهای آزاد سمی مثل سوپراکسید، پراکسیدهیدروژن و یونهای هیدروکسیل می شوند و بر تنفس سلولی اثر می گذارند (۲۵). مطالعات نشان داده است که نانوذرات نقره، تشکیل بیوفیلم را هم مختل می کنند (۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳).

برای مدتهای طولانی از روشهای مختلف شیمیایی و فیزیکی برای سنتز نانوذرات استفاده شده است اما به تازگی توجه زیادی به روشهای زی۴ستی برای تولید نانوذرات فلزی شده است. روشهای زیستی، علاوه بر سهولت در اجرا، با محیط زیست نیز سازگار هستند و خطر کاربرد موادشیمیایی خطرناک، سمی و گران را رفع می کنند (۱۲، ۲۲). در میان روشهای زیستی، گیاهان بهترین انتخاب هستند، زیرا به راحتی در دسترس هستند و برای سنتز نانوذرات در مقیاس وسیع مناسب ترند. مولکولهای زیستی مختلفی در عصاره های گیاهی وجود دارند که قابلیت احیای یونهای فلزی و سنتز نانوذرات را دارند و نیز می توانند به عنوان عوامل پوشش دهنده و پایدارکننده نانوذرات استفاده شوند (۱۷ و ۱۹).

گیاه زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) از گیاهان دارویی و معطر است که در رویشگاههای طبیعی در نواحی کوهستانی و مرتفع کشور یافت می‌شود. این گیاه به علت اسانس زیاد آن مورد توجه می‌باشد (۳). در طب سنتی از این گیاه به عنوان ضددرد و ضدالتهاب استفاده می شود و جوشانده آن موجب رفع دردهای روماتیسمی و التیام زخم می شود (۳). همچنین این گیاه برای احتقان، سردرد، معده، اختلالات کبدی، ضد اسپاسم نیز استفاده می شود. ترکیبی به نام spinal-z در برگهای گیاه *D. kotschyi* وجود دارد که از سالها پیش در درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفته است. این گیاه دارای ویژگیهای ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و اثرات سمیت سلولی نیز می باشد (۳). هدف از این پژوهش، سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه *D. kotschyi* و بررسی اثرات ضدمیکروبی آن بر روی سویه‌های استاندارد باکتریایی بود.

مواد و روشها

جمع آوری گیاه و عصاره گیری: گیاه *D. kotschyi* از مرکز ملی ذخایر زیستی با کد هرباریومی IBRC P1009737 تهیه شد. برای تهیه عصاره اتانولی، میزان ۴۰ گرم از اندام هوایی گیاه را به ۱۰۰ میلی لیتر از اتانول مطلق ۹۹ درصد (مرک، آلمان) اضافه نموده و به مدت ۳ ساعت در اکوباتور متحرک قرار داده شد. عصاره به دست آمده توسط کاغذ صافی فیلتر شده و وارد دستگاه تبخیر (روتاری) شد و در پایان، حلال به وسیله دستگاه روتاری (دمای ۴۵ درجه سانتی گراد، Steroglass، ایتالیا) حذف گردید. پودر جامد به دست آمده توسط آب مقطر دو بار تقطیر به حجم رسانیده شد و عصاره تهیه شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا زمان استفاده برای سنتز نانوذرات نقره نگهداری شد (۸).

سنتز نانوذرات نقره: به منظور سنتز زیستی نانوذرات نقره با خلوص بالا از روش رسوب گذاری با یونهای نقره توسط عصاره الکلی گیاه *D. kotschyi* استفاده شد. نانوذرات نقره با افزودن ۲ میلی لیتر از عصاره گیاه به نیترات نقره با غلظت ۰/۰۰۱ میلی مولار (مرک، آلمان) تحت شرایط دمایی ۶۰ درجه سانتی گراد و همزدن سنتز

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.1.0

شد. عصاره گیاهی به دلیل فراوانی ترکیباتی مانند آلدهید، کتون و ترپن موجب احیای نمک نیترات نقره به نانوذرات نقره می شوند. احیای کامل یونهای نقره به نانوذرات نقره با تغییر رنگ محیط و طیف سنجی صورت گرفت. پس از مشاهده شدن تغییر رنگ و اطمینان از سنتز نانوذره، سه مرتبه شستشوی رسوب با آب مقطر انجام شد. تمامی مراحل شستشو با دور ۱۳۰۰۰rpm و به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت (۲۱).

بررسی ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی نانوذره نقره سنتز شده: جهت مشاهده تغییرات رنگ برروی میزان جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Uv-Vis) مدل schimadzu UV2550 ساخت ژاپن در محدوده ۳۰۰-۷۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برای تعیین اندازه، شکل ظاهری و ریخت شناسی، خواص ساختاری و خواص نوری، به ترتیب با استفاده از دستگاههای پراش میکروسکوپ الکترونی نگاره میدان گسیلی (FESEM) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)و طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) استفاده شد. برای تعیین فازهای کریستالی نانوذرات نقره سنتز شده، همچنین اندازی گیری ثابتهای کریستالی نانوذرات نقره و محاسبه اندازه بلورکها از الگوی پراش اشعه ایکس، XRD نمونه ها استفاده شد. برای تهیه الگوی پراش اشعه ایکس از دستگاه پراش سنجش پودری اشعه ایکس مدل Philips X'pert pro ساخت کشور هلند با منبع لامپ آند مسی Cu Kα با طول موج λ=1.5406A° استفاده شد. برای تعیین اندازه و توزیع پراکندگی نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره گیاه *D. kotschyi*، میکروسکوپ الکترونی عبوری مدل Zeiss-EM10C (آلمان) با ولتاژ اعمالی ۱۰۰ KV برای گسیل اشعه الکترونی استفاده شد.

بررسی خواص ضد میکروبی: اثرات ضدمیکروبی نانوذرات نقره بر روی باکتریهای *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)، *Escherichia coli* (ATCC 25922)، *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442)، *Klebsiella pneumoniae* (ATCC43816)، *Listeria monocytogenes* (ATCC 19424) با کمک روشهای انتشار دیسک و کمترین غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) بررسی شد. لازم به ذکر است که باکتریهای مورد مطالعه از بانک میکروبی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید.

در روش انتشار دیسک، ابتدا دیسکهای بلانک ۶ میلی متری به مدت ۱۰ دقیقه در محلول حاوی غلظتهای ۰ تا ۲۵۰۰ میکروگرم/میلی لیتر از نانوذره سنتز شده غوطه ور شدند. به دنبال آن، باکتریهای مورد ارزیابی با غلظت ۰/۵ مک فارلند کدورت سنجی شدند و بر روی محیط مولر هینتون آگار، کشت چمنی داده شدند. سپس دیسکهای آغشته شده به نانوذرات نقره روی محیط کشت قرار داده شد. هاله عدم رشد پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد اندازی گیری شدند.

همچنین تست کمترین غلظت مهار کنندگی (MIC) به صورت سه بار تکرار با استفاده از روش رقت سازی متوالی در پلیتهای ۹۶ خانه ای انجام شد. به طور خلاصه، پلیتهای ۹۶ چاهکی به کمک توزیع ۹۵ میکرولیتر از محیط کشت مولرهینتون براث (Mueller-Hinton Broth) و ۵ میکرولیتر از تلقیح میکروبی با غلظت ۰/۵ مک فارلند به داخل هر یک از چاهکها فراهم گردید . ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذره سنتز شده با غلظتهای ۱۵/۶، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر به چاهکهای حاوی میکروارگانیسم اضافه شد. چاهک آخر شامل ۹۵ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث با ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO ۵۰ درصد و ۵ میکرولیتر از تلقیح میکروبی در هر ردیف به منزله کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. حجم نهایی در تمامی چاهکها ۲۰۰ میکرولیتر بود. میکروپلیت پلیت ۹۶ خانه ای با درپوش استریل پوشانده شد. محتویات همه چاهکها بر روی شیکر به مدت ۶۰ ثانیه با دور ۱۰۰ rpm

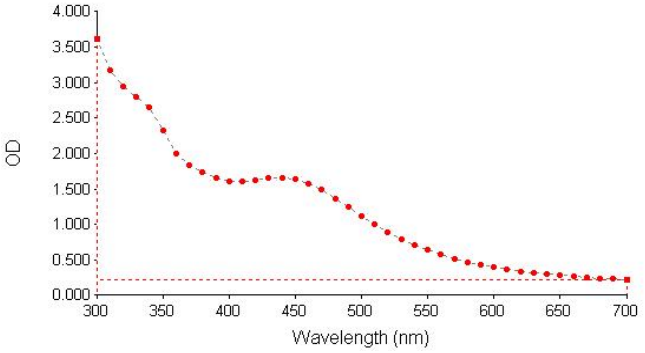
DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.1.0

مخلوط گردید و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. رشد میکروبی با میزان جذب در طول موج nm ۶۲۰ خوانده شد. همچنین به منظور بررسی حداقل غلظت کشندگی (MBC) از چاهکهایی که رشد در آنها مهار شده بود در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. قابل ذکر است که آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۳۰µg) به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: در این مطالعه تمامی تستها به صورت ۳ بار تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین سه تکرار ± انحراف استاندارد بیان شدند. از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) برای بررسی آماری نتایج استفاده شد. نتایج توسط نرم افزار SPSS 20 آنالیز گردید و P <۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

سنتز و طیف سنجی ماوراءبنفش-مرئی نانوذرات نقره: روش سنتز زیستی نانو ذرات نقره با استفاده از احیای یونهای نقره به وسیله عصاره گیاه زرین گیاه (*D. kotschyi*) انجام شد. اولین نشانه تولید نانوذرات نقره تغییر رنگ محلول بود به طوری که رنگ قهوه ای تیره حاصل بعد از ۲۴ ساعت نشان دهنده تولید نانو ذرات نقره در محلول است. نتایج طیف سنجی ماوراءبنفش- مرئی نانو ذرات نقره در شکل ۱ آورده شده است. پیک جذبی حداکثری در منحنی به دست آمده از طیف سنجی مرئی پس از سنتز نانو ذرات نقره در محدوده ۴۰۰ الی ۴۵۰ نانومتر نشان دهنده سنتز نانو ذرات نقره می باشد.

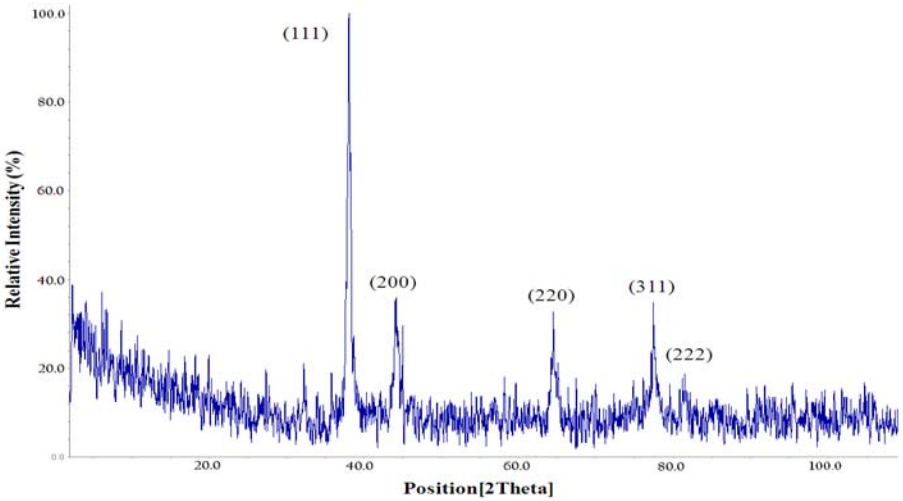


شکل ۱- طیف سنجی UV-vis تشکیل نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی. همان طور که در شکل مشاهده می شود ماکزیمم جذب در طول موج ۴۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر می باشد.

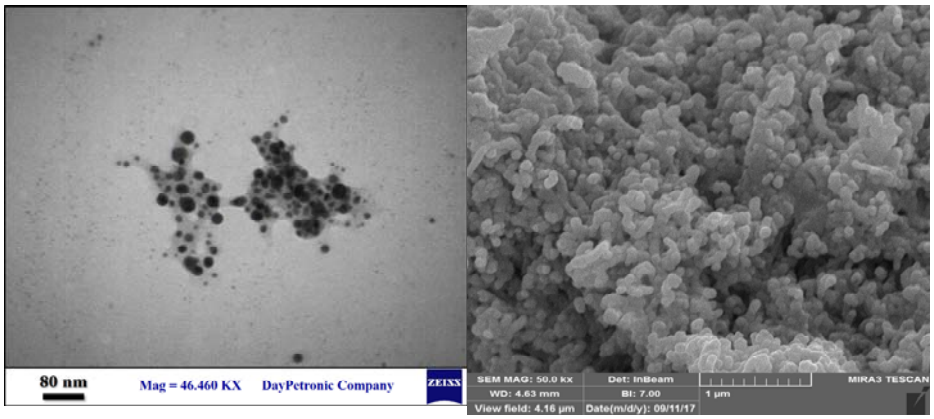
تعیین ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی نانوذرات نقره سنتز شده: شکل ۲ الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گیاه *D. kotschyi* را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود پیکهای (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱) در°38 =2θ ، °44.26، °64.43 و °77.35 مربوط به ساختار FCC نانوذرات نقره می باشد که با الگوی استاندارد پراش اشعه ایکس نقره تطابق کامل دارد (۶).

بررسی ریخت شناسی نانوذره نقره سنتز شده: اندازه و ریخت شناسی نانوذرات نقره زیستی از طریق میکروگراف میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و با ولتاژ زیر ۳۰ کیلو ولت و تحت فشار خلاء (Torr ۵-۱۰) مورد ارزیابی قرار گرفت. همان گونه که در شکل ۳a مشخص است، ساختار نانوذرات کروی بوده اما در برخی نقاط تجمع و آگلومره شدن رخ داده است که می توان با سونیکاسیون پخش نمود و سپس با دستگاه SEM مشاهده کرد. تصاویر میکروگراف میکروسکوپ الکترونی گذاره TEM (شکل ۳b) نشان می‌دهد که توزیع میانگین اندازه نانوذرات سنتز شده به روش زیستی ۱۴/۵۷ نانومتر و شکل آن کروی است (شکل ۳c).

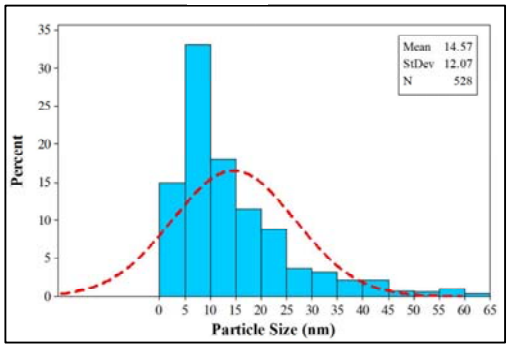
DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.1.0



شکل ۲- الگوی تفرق اشعه ایکس نانوذرات نقره در شرایط بهینه سنتز. الگوی پیکهای XRD مربوط به ساختار مکعبی مراکز سطحی(fcc) (Face-centered cubic) (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) ، (۳۱۱) و (۲۲۲) در طیف نمونه نقره دیده می شود. زوایای θ۲ مربوط به الگوی نقره در ۳۸/۰۴، ۴۴/۵، ۶۴، ۷۷/۷، ۸۱/۷ دیده می شود.



(B) (A)

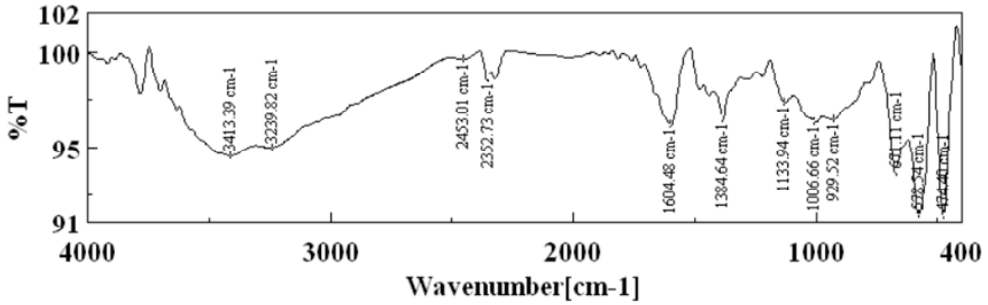


شکل ۳- میکروگراف نانوذرات نقره زیستی تهیه شده از میکروسکوپ الکترونی SEM (A)، میکروسکوپ الکترونی TEM (B) و نمودار توزیع سایز نانوذرات نقره (C). همان طور که مشاهده می شود نانوذرات سنتز شده دارای ساختار کروی و دارای اندازه میانگین ۱۴/۵۷ نانومتر هستند

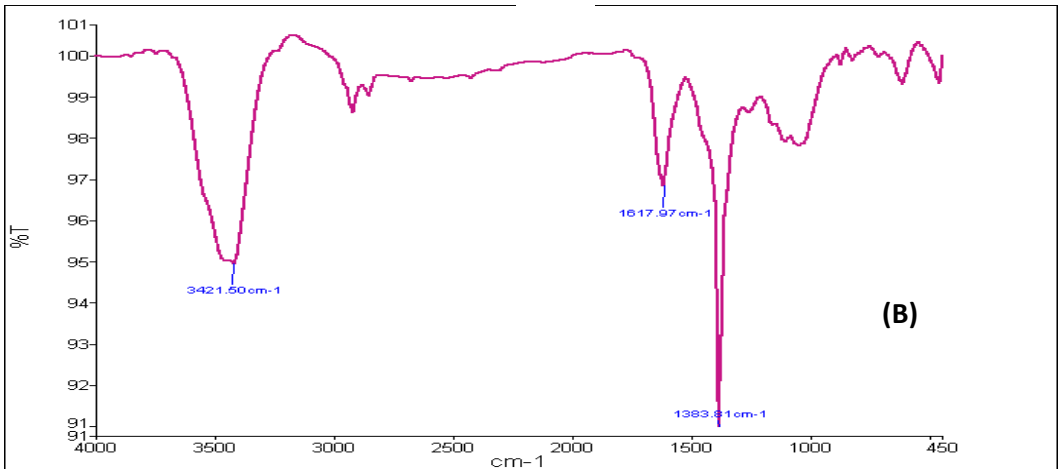
C

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.1.0

نتایج حاصل از طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR): در طیف سنجی نانوذرات نقره، باندهای جذبی در نواحی $۱۹۱۷cm^{-1}$ و $۱۳۸۳ cm^{-1}$ مربوط به ترکیبات اتری (C-O-C) است که می تواند بر اثر واکنش با عصاره گیاهی ایجاد شده باشد. باند جذبی $۳۴۲۱ cm^{-1}$ در طیف سنجی نانوذرات نقره مربوط به واکنش عصاره گیاهی با نیترات نقره بوده است. باند $۱۶۱۷cm^{-1}$ مربوط به آمید I پروتئینها و یا نوسانات کششی C-O آمینواسیدها باشد که موجود در عصاره است. پیک پهن و جذب شدید در محدوده cm^{-1} ۳۴۰۰ مربوط به نوسانات کششی گروه عاملی هیدروکسیل (OH) در الکلها، فنلها و اسید کربوکسیلیک است. باند cm^{-1} ۱۳۸۳ مربوط به پیوند CH-CH موجود در قندها یا لیپیدها ی عصاره است (شکل ۴).



(A)



شکل ۴- طیف سنجی مادون قرمز(FTIR) عصاره گیاه *D. kotschyi* (A) و نانوذرات نقره سنتز شده زیستی (B)

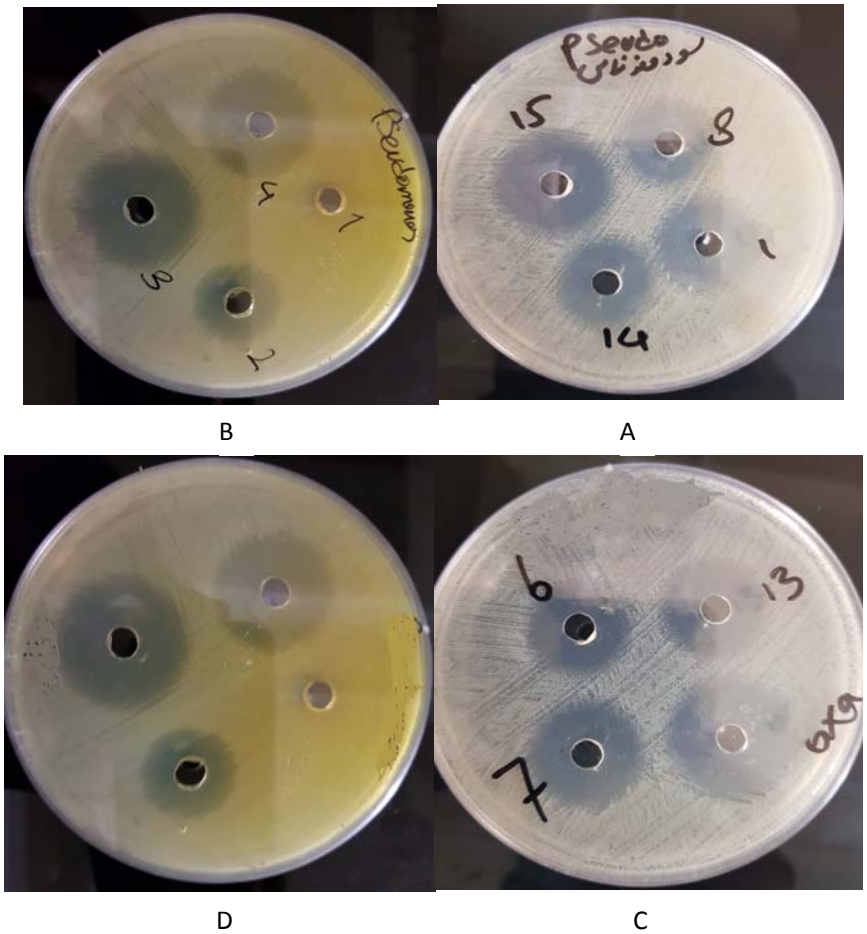
اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره: در پژوهش حاضر، نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه *D. kotschyi* پس از سانتریفیوژ و توزیع در آب مقطر برای مطالعه فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره استفاده شدند. بررسی اثرات ضدمیکروبی به کمک روش انتشار دیسک نشان داد که نانوذرات برروی باکتریهای *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)، *Escherichia coli* (ATCC 25922)، *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442)، *Klebsiella pneumoniae* (ATCC43816)، *Listeria monocytogenes* (ATCC 19424) فعالیت ضدباکتریایی چشم گیری دارند. نتایج حاصل از اندازه گیری هاله عدم رشد در جدول ۱ نشان داده شده است. براساس این نتایج

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.1.0

بیشترین خاصیت ضدمیکروبی نانوذره نقره بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* با قطر هاله عدم رشد ۰/۶۶ ±۱۳/۷ میلی متر با غلظت نانوذره ۲۵۰۰ میکروگرم/میلی لیتر و همچنین کمترین میزان خاصیت ضد میکروبی نانوذره نقره با غلظت مشابه در مورد باکتری اشرشیا کلی و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۰/۶۵ ±۱۰/۴ و ۰/۶۵ ±۱۰/۴ میلی متر اندازه گیری شد (جدول ۱ و شکل ۵).

جدول ۱- بررسی نتایج انتشار دیسک نانوذره نقره بر روی باکتریهای مورد مطالعه

غلظت نانوذره (میکروگرم در میلی لیتر)	اندازه قطر هاله عدم رشد (میلی متر)				
	سودوموناس آئروژینوزا	*اشرشیا کلی*	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*کلبسیلا پنومونیه*	*لیستریا مونوسیتوژنز*
۰	۰	۰	۰	۰	۰
۲۰	۴/۸±۰/۲۸	۴/۲ ± ۰/۲۲	۳/۵ ±۰/۸۹	۳±۰/۵۶	۳/۹±۰/۵۶
۱۰۰	۵/۴±۰/۷۶	۴/۹ ± ۰/۶۴	۴/۵ ±۰/۷۲	۴/۱±۰/۲۸	۴/۳ ±۰/۲۸
۵۰۰	۹/۸± ۰/۵۶	۶/۳±۰/۳۸	۵/۸±۰/۷۹	۴/۸±۰/۷۵	۷/۲±۰/۲۸
۲۵۰۰	۱۳/۷±۰/۶۶	۱۰/۴±۰/۶۵	۱۰/۴±۰/۶۵	۱۱/۲±۰/۶۴	۱۲/۵±۰/۲۸
آمپی سیلین(۳۰µg)	۱۵/۶±۰/۳۲	۱۵/۳±۰/۶۵	۱۴/۲±۰/۹۸	۱۰/۵±۰/۹۸	۱۲/۱±۰/۲۸



شکل ۵- نتایج اثرات ضدمیکروبی نانوذرات نقره سنتز شده به روش انتشار دیسک. همان طور که در تصاویر قابل ملاحظه است قطر هاله های عدم رشد در غلظتهای مختلف متفاوت است

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.1.0

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC): به منظور بررسی حداقل غلظت مهار کنندگی رشد نانوذره نقره سنتز شده، غلظتهای مختلف نانوذره شامل ۱۵/۶، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر مورد بررسی قرار گرفت. کمترین غلظت MIC نانوذرات زیستی نقره برای باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به دست آمد، به طوری که مقدار آن ۱۵/۶ میکروگرم/میلی لیتر بود و بیشترین غلظت MIC در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمد که مقدار آن برابر ۲۵۰ میکروگرم/میلی لیتر بود (جدول ۲).

جدول۲- نتایج مربوط به تست MIC نانوذره نقره در باکتریهای مورد مطالعه

نام باکتری	کمترین غلظت مهارکنندگی نانوذره نقره (میکروگرم در میلی لیتر)	کمترین غلظت مهارکنندگی آمپی سیلین (میکروگرم در میلی لیتر)
سودوموناس آئروژینوزا	۱۵/۶	۷/۸
اشرشیا کلی	۱۲۵	۱۲۵
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۵۰	۱۲۵
کلبسیلا پنومونیه	۶۲/۵	۵۰۰
لیستریا مونوسیتوژنز	۱۲۵	۱۲۵

نتایج تعیین MBC نانوذره زیستی سنتز شده: پس از تعیین میزان MIC از چاهکهای فاقد کدورت بر محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و نتایج پس از گذشت ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. کمترین غلظتی که باعث مرگ باکتریها گردد، به عنوان حداقل غلظت کشنده (MBC) در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار MBC مربوط به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با غلظت ۲۵۰ میکروگرم و کمترین مقدار مربوط *سودوموناس آئروژینوزا* و *کلبسیلا پنومونیه* با غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بود (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج MBC نانوذره نقره برای باکتریهای مورد مطالعه

باکتریهای مورد مطالعه	میزان MBC نانوذره نقره (میکروگرم در میلی لیتر)	میزان MBC آمپی سیلین
سودوموناس آئروژینوزا	۶۲/۵	۱۵/۶
اشرشیا کلی	۱۲۵	۲۵۰
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۵۰	۱۲۵
کلبسیلا پنومونیه	۶۲/۵	۵۰۰
لیستریا مونوسیتوژنز	۱۲۵	۱۲۵

بحث

در سالهای اخیر یکی از اولویتهای تحقیقاتی دارویی، ساخت داروی جدید جهت درمان عفونتهای باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک می باشد. همچنین یکی از نگرانیها در این زمینه، هزینه اقتصادی تولید داروهای جدید و طولانی بودن زمان درمان عفونتهای باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک نسبت به باکتریهای حساس است. این امر اهمیت یافتن راهی جدید برای درمان را دو چندان می کند. مطالعات اخیر، استفاده از نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی در درمان عفونتهای باکتریایی را در الویت کار قرار داده اند (۷). در این مطالعه با استفاده از عصاره گیاه *D. kotschyi* نانو ذره نقره سنتز شد. همان طور که ذکر شد، میانگین قطر نانو ذره سنتز شده ۱۴/۵۷ نانومتر گزارش شد. همچنین ساختار فیزیک و شیمیایی نانوذره نقره سنتز شده با استفاده از روشهای SEM، TEM، UV-Vis و XRD مورد تأیید قرار گرفت.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.1.0

به طور کلی ارتباطی بین نوع گیاه، نوع عصاره گیری و اندازه نانوذرات نقره تولید شده وجود دارد، به طوری که برخی از گیاهان به دلیل میزان برخی از ترکیبات خاص مانند فنلها، فلاونوئیدها، ترپنها و...، خاصیت احیا کنندگی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بیشتری داشته و روی اندازه نانوذره سنتز شده تأثیر می گذارند. همچنین میزان اثربخشی نانوذرات نقره به نوع محلول عصاره و اندازه آنها بستگی دارد، به طوری که نانوذرات نقره زیر اندازه ۵۰ نانومتر دارای قدرت نفوذ بیشتر بوده و بنابراین تأثیرگزاری آنها بیشتر است (۱۳و۲۶).

در ارتباط با سنتز زیستی نانوذرات و بررسی ویژگیهای ضد باکتریایی آن با استفاده از عصاره جنس *Dracocephalum*، مطالعات محدودی انجام شده است. Haghighi و همکارانش درسال ۲۰۱۶ با استفاده از عصاره گیاه *Dracocepluaim moldavica* نانوذرات نقره سنتز کردند. نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از روشهای UV-Vis، SEM، XRD و TEM مورد تأیید قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات سنتز شده کروی و دارای خاصیت ضدمیکروبی معناداری علیه باکتریهای *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد (۹). Halimi و همکارانش در سال ۲۰۱۸، نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره گیاه *Dracocephalum lindbergii* سنتز کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات سنتز شده دارای ساختار کروی بوده و گزارش کردند که سنتز زیستی نانوذره نقره با استفاده از این عصاره ساده و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می باشد (۱۱).

به طور کلی نانو ذرات نقره موجب از هم گسستن اجزای ممانعت کننده موجود در غشای خارجی باکتری می شود که باعث آزاد شدن تصاعدی مولکولهایی نظیر لیپو پلی ساکارید (LPS) و پورینها از غشای سیتو پلاسمی می شود. همچنین نانو نقره فقط به سطح غشای سلولی نمی چسبد بلکه به درون سلولها هم نفوذ می کند. نانو نقره پس از نفوذ به داخل سلول باکتری آنزیمهای آن را غیر فعال کرده و با تولید هیدروژن پراکسید باعث مرگ باکتری می شود و نیز نانو ذرات نقره بعد از چسبیدن به سطح غشای سلولی سیستم تنفسی را به صورت برهمکنش آنزیم با زنجیره تنفسی باکتری با Ag^+ تخریب می کنند (۲۰).

Rasheed و همکارانش در سال ۲۰۱۷ با استفاده از عصاره گیاه *آرتمیزیا ولگاریس* (*Artemisia vulgaris*) سنتز نانو ذره نقره را گزارش دادند نتایج مطالعه آنها نشان داد که این نانونقره تولید شده دارای خواص ضد باکتریایی است (۲۴). سنتز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گیاهی *آرتمیزیا آنوآ* (*Artemisia annua*) توسط Xia و همکاران در سال ۲۰۱۷ گزارش شد. در مطالعه آنها اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات نقره مورد مطالعه قرار گرفت. این محققان بیان کردند که نانو ذره نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاهی به عنوان احیاء کننده قوی، مقرون به صرفه بوده و دارای خاصیت ضدمیکروبی قوی می باشد (۲۷).

سنتز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه مرزنجوش (*majorana Origanum*)توسط کاوسی و همکاران در سال ۱۳۹۶ گزارش شد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانو ذرات نقره زیستی دارای فعالیت ضد میکروبی بر علیه باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی بودند (۲).

دهقان و همکاران در سال ۱۳۹۷ اثرات ضد باکتری و ضد قارچی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره آبی گیاه کنجد (*Sesamum indicum*) را بررسی نمودند. براساس نتایج حاصل از این تحقیق، نانوذرات نقره تولید شده بوسیله عصاره آبی گیاه کنجد فعالیت ضد میکروبی مؤثری را نشان داد (۱).

در مطالعه حاضر خاصیت ضدمیکروبی نانوذره نقره سنتز شده در دامنه ۱۵/۶ تا ۵۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر انجام شد و در این میان باکتریهای *P. aeruginosa* و *K. pneumoniae* حساسیت بالاتری نسبت به نانو ذره نشان دادند. Krishnaraj و همکاران در سال ۲۰۱۰ از عصاره

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.1.0

برگ *Acalypha india*، سنتز نانو ذره نقره را انجام دادند و فعالیت ضد باکتریایی آن را علیه پاتوژنهای مضر آب بررسی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که اندازه نانو ذره سنتز شده بین ۳۰-۲۰ نانومتر بود و نانو ذره در غلظت ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر دارای حداقل مهار کنندگی رشد علیه باکتریهای *E. coli* و *Vibrio cholera* بود (۱۶).

با توجه به مطالعات فوق می توان نتیجه گرفت گیاه *D. kotschyi* می تواند به عنوان گزینه ای مناسب در تولید نانوذرات به روش زیستی مطرح باشد. در میان روشهای تولید نانوذرات، روش تولید زیستی با استفاده از عصاره گیاه روشی ارزان، کم خطر و سازگار با محیط زیست محسوب می شود. نانوذرات نقره که با این روش تولید می شود به علت عدم به کارگیری مواد شیمیایی خطرناک پتانسیل این را دارند تا در صنایع مرتبط با سلامت انسان مانند بهداشت و درمان مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان دادند که نانو ذره نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه *D. kotschyi* دارای پتانسیل ضد باکتریایی معناداری علیه پاتوژنهای بیمارستانی است و می تواند به عنوان یکی از دستاوردهای نانو در کمک به درمان عفونتهای بیمارستانی عمل کند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از تمامی کسانی که در اجرای این پژوهش به ما کمک کرده اند، تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱- دهقان نیری ف، میرحسینی م، مفاخری س، ضرابی م. ۱۳۹۷. بررسی اثرات ضد باکتری و ضد قارچی نانوذرات نقره حاصل از عصاره آبی گیاه کنجد (*Sesamum indicum* L.). جلد ۳۱ ، شماره ۱، ۱۵۵-۱۶۵.

۲- کاوسی س، هاشم یعقوبی ه. ۱۳۹۶ ،سنتز نانو ذرات نقره به روش سبز با استفاده از عصاره گیاه مرزنجوش اروپایی (*Origanum majorana* L.) بررسی اثرات ضد میکروبی آن .مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۳۰، شماره ۲، ۲۹۹-۳۱۱.

۳- مظفریان و. شناخت گیاهان دارویی و معطر ایران.۱۳۹۱. انتشارات فرهنگ معاصر.

4- Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. (2013). Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver. Nanoscale, 5(16): 7328-7340.

5- Bagheri Farahani Z, Mirzaie A, Ashrafi F, Rahimpour Hesari M. (2017). Phytochemical composition and biological activities of *Artemisia quettensis* Podlech ethanolic extract. Nat Prod Res; 31(21): 2554-2558.

6- Begum NA, Mondal S, Basu S, Laskar RA, Mandal D. (2009). Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. Colloids. surfaces B. Biointerfaces; 71(1): 113-118.

7- Fayaz, A.M, Balaji K, Girilal M. (2010). Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Nanomedicine: Nano. Biol. Med; 6(1): 103-109.

8- Ghanbar F, Mirzaie A, Ashrafi F, Noorbazargan H, et al. (2016). Antioxidant, antibacterial and anticancer properties of phyto-synthesised *Artemisia quttensis* Podlech extract mediated AgNPs. IET. Nanobiotechnol; 11(4): 485-492.

9- Haghighi ZH, Abbaspour H, Karimi N, Fattahi A. (2016). Eco-friendly synthesis and antimicrobial activity of silver nanoparticles using *Dracocephalum moldavica* seed extract. Appl. Sci; 6(3), 69-75.

10- Hajmohammadi F. (2018). Biosynthesis of silver nanoparticles and the comparison of their antibacterial activity against Bacillus cereus and Serratia marcescens. J. cell. Mol. Res. 32(1): 16-32.

11- Halimi M, Naserabadi M, Soleamani N, Rouhani N. (2018). Green synthesis of nanosilver particles from extract of *Dracocephalum Lindbergii*. Asian. J. Nano. Mat; 1(1):19-24.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.1.0

12- Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. Green. Chemistry; 13(10): 2638-2650.

13- Jaiswal S, Mishra P. (2018). Antimicrobial and antibiofilm activity of curcumin-silver nanoparticles with improved stability and selective toxicity to bacteria over mammalian cells. Med Microbiol Immunol; 207(1):39-53.

14- Jena P, Mohanty S, Mallick R, Jacob B, Sonawane A. (2012). Toxicity and antibacterial assessment of chitosancoated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells. Int. J. Nano; 7: 1805-1818.

15- Krishnaraj C, Jagan EG, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan PT, Mohan N. (2010). Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activityagainst water borne pathogens. Colloids. Surf B. Biointerfaces; 76(1):50-6.

16- Masum M, Siddiqa M, Ali K, Zhang Y, Abdallah Y, Ibrahim E, Qiu W, Yan C, Li B. 2019. Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Phyllanthus emblica* Fruit Extract and Its Inhibitory Action Against the Pathogen Acidovorax oryzae Strain RS-2 of Rice Bacterial Brown Stripe. Frontiers microbiology; 10: 2-18

17- Marambio-Jones, C, Hoek EM. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. J. Nano. Res; 12(5): 1531-1551.

18- Mirzaie A, Bagheri AA, Noorbazargan H, Sadat Shandiz SA. (2017). The inhibitory effect of Artemisa quttensis extract on norA efflux pump in ciprofloxacin resistant Staphylococcus aureus strains using ethidium bromide and Real-Time PCR methods. Majallahi. Dānishgāhi. ʿUlūmi. Pizishkīi. Qum; 11(10): 51-63.

19- Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. Biotechnol Adv; 31(2): 346-356.

20- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology; 16(10): 2346-53.

21- Peñalver P, Huerta B, Borge C, Astorga R, et al. (2005). Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. APMIS; 113(1): 1-6.

22- Philip, D. and C. (2011). Unni, Extracellular biosynthesis of gold and silver nanoparticles using *Krishna tulsi* (Ocimum sanctum) leaf. Physica E: Low-dimensional systems and Nanostructures; 43(7): 1318-1322.

23- Rai MK, Deshmukh SD, Ingle AP, Gade AK. (2012). Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. J. Appl. Microbiol; 112(5): 841-852.

24- Rasheed T, Bilal M, Iqbal HMN, Li C. (2017). Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaves extract of Artemisia vulgaris and their potential biomedical applications. Colloids. Surf B. Biointerfaces;158:408-415.

25- Reidy B, Haase A, Luch A, Dawson KA, Lynch I. (2013). Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: a critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. Materials; 6(6): 2295-2350.

26- Salehi S, Mirzaie A, Sadat Shandiz SA, Noorbazargan H, et al. (2017). Chemical composition, antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of *Artemisia marschalliana* Sprengel extract. Nat. Prod. Res; 31(4): 469-472.

27- Xia QH, Zheng LP, Zhao PF, Wang JW. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Artemisia annua* callus for inhibiting stem-end bacteria in cut carnation flowers. IET. Nanobiotechnol; 11(2):185-192. \

28- Penchovsky R, Traykovska M. Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do? Expert Opin Drug Discov . 2015;10(6):631-50 .

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.1.0

Biological synthesis of silver nanoparticles using *Dracocephalum kotschyi* extract and evaluation of its antibacterial activity

Yaghoubi Sh.[1], Mirzaie A.[2] and Dastpak A.[1]

[1] Dept. of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, I.R. of Iran.

Abstract

Nosocomial infections are one of the most common infections in health centers. The high and inadequate use of broad-spectrum antibiotics has increased the number of nosocomial infections. The aim of this study was to synthesis silver nanoparticles using *Dracocephalum kotschyi* extract and analysis of its antibacterial activities. In this experimental study, biological synthesis of silver nanoparticles was performed using *D. kotschyi* extract. Physical and chemical properties of synthesized silver nanoparticle were determined using UV-Vis spectroscopy, XED, FTIR, SEM (scanning electron microscopy) and transmission electron microscopy (TEM). Finally, the antibacterial activity of silver nanoparticles was assessed using two methods including disk diffusion and minimum growth inhibitory concentration (MIC). The results showed that the size of the synthesized nanoparticle was 14.57 nm. The physical and chemical properties of silver nanoparticles was confirmed by XRD, TEM, and SEM. The antibacterial results also showed that *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Listeria monocytogenes* were sensitive to 500 µg/ml of silver nanoparticles. The results of this study showed that the silver nanoparticles synthesized by *D. kotschyi* have an appropriate antibacterial potential against nosocomial pathogens and can act as one of the nano-achievements in helping to management of infectious diseases.

Key words: Biological synthesis, silver nanoparticle, *Dracocephalum kotschyi* Antibacterial activity