

سنتز نانوذرات نقره کلوئیدی پایدار با خاصیت ضدباکتریایی با استفاده از عصاره گیاه سرخدار (*Taxus baccata* L.)

ابوالقاسم عباسی کجانی: دکترای نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، a.abbasi@chem.ui.ac.ir
سید حمید زرکش اصفهانی*: دانشیار ایمنی‌شناسی، دانشگاه اصفهان، ایران، s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk
عبدالخالق بردبار: استادیوشیمی فیزیک، دانشگاه اصفهان، ایران، bordbar@chem.ui.ac.ir

چکیده

مقدمه: مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها، اهمیت توسعه عوامل ضدباکتریایی جدید را افزایش داده است. نانوذرات نقره می‌توانند به‌عنوان یکی از عوامل ضدباکتریایی مهم مطرح باشند. با توجه به نگرانی‌های زیست‌محیطی درباره گسترش کاربرد نانوذرات نقره، استفاده از روش‌های سبز برای سنتز این نانوذرات، ضمن کاهش نگرانی‌ها می‌تواند به تکامل نانوذراتی با خصوصیات برتر نیز منجر شود.

مواد و روش‌ها: عصاره اتانلی برگ گیاه سرخدار تهیه شد و در غلظت‌های مختلف برای احیای نیترات نقره و سنتز نانوذرات نقره استفاده شد. نانوذرات حاصل با روش‌های مختلف شامل طیف‌سنجی مرئی-ماوراء بنفش، میکروسکوپ الکترونی عبوری، طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز، سنجش پراکندگی دینامیکی نور و پتانسیل زتا مشخصه‌یابی شدند. در نهایت خصوصیات ضدباکتریایی نانوذرات با روش‌های انتشار دیسک و کمینه‌غلظت بازدارندگی بررسی شد.

نتایج: عصاره گیاه سرخدار قابلیت بالایی در سنتز نانوذرات نقره پایدار و با کیفیت بالا با اندازه کمتر از ۵۰ نانومتر داشتند. نانوذرات بر روی هر سه سویه باکتری بررسی شده شامل *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Streptococcus pyogenes*، اثر ضدباکتریایی قابل توجهی نشان دادند. کمینه‌غلظت بازدارندگی برای باکتری *S. pyogenes* در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* در غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر حاصل شد.

بحث و نتیجه‌گیری: استفاده از ترکیبات زیستی به‌ویژه عصاره‌های گیاهی به جای استفاده از مواد شیمیایی سمی و خطرناک برای سنتز نانوذرات نقره می‌تواند راهکاری برای کاهش نگرانی‌های زیست‌محیطی این نانوذرات باشد. با توجه به خصوصیات ضدباکتریایی قابل توجه نانوذرات سنتز شده با این روش، می‌توان از آن‌ها برای کاربردهای مختلف پزشکی، دارویی، غذایی و صنعتی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌باکتریال، انتشار دیسک، سرخدار ایرانی، سنتز سبز، کمینه‌غلظت بازدارندگی، نانوذرات نقره.

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

عفونت‌های باکتریایی یکی از عوامل اصلی مرگ میلیون‌ها انسان در سراسر جهان هستند که یکی از دلایل اصلی آن، ایجاد عوامل بیماری‌زای جدید و تکامل سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است. عوامل بیماری‌زا، روش‌های مؤثری را برای خنثی کردن اثر عوامل ضدباکتریایی ایجاد می‌کنند. به‌همین دلیل، گرچه آنتی‌بیوتیک‌های بسیاری ابداع شده‌اند ولی تعداد بسیار کمی از آن‌ها در مقابل سویه‌های مقاوم باکتریایی مؤثر بوده‌اند. بنابراین، طراحی و تکامل آنتی‌بیوتیک‌های جدیدی که بر این محدودیت‌ها غلبه کنند، از اهمیت زیادی برخوردار است (۱). نانوذرات به‌تازگی به‌طور موفقیت‌آمیزی برای ره‌ایش عوامل دارویی (۲)، شناسایی بیماری‌های مزمن (۳)، کاهش عفونت‌های باکتریایی (۴)، و نیز در صنایع غذایی و پوشاک (۵) به‌عنوان عوامل ضدباکتریایی قوی استفاده شده‌اند. در میان نانوذرات مختلف، نانوذرات نقره به‌دلیل فعالیت ضدباکتریایی قوی و مکانیسم عمل خاص، گزینه‌ای مناسب برای تهیه نسل جدیدی از عوامل آنتی‌باکتریال هستند (۵). هرچند برای قرن‌ها از نقره به‌عنوان یک ماده ضدباکتریایی استفاده شده است ولی به‌تازگی دانشمندان توجه زیادی به این عنصر برای حل مشکل مقاومت دارویی در اثر استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده‌اند (۶). به نظر می‌رسد که نانوذرات نقره از طریق اتصال به دیواره سلولی باکتری، باعث اختلال در نفوذپذیری دیواره سلولی و آثار سمی بر سلول می‌شوند. نانوذرات نقره احتمالاً به سلول هم نفوذ می‌کنند و با سولفور کاتالیتیک گروه‌های تیول در اسیدهای آمینه سیستمین کمپلکس تشکیل می‌دهند و از این طریق آنزیم‌های حیاتی را غیرفعال می‌کنند. همچنین این

نانوذرات باعث تشکیل رادیکال‌های آزاد سمی مثل سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و یون‌های هیدروکسیل می‌شوند و بر تنفس سلولی اثر می‌گذارند (۴، ۶ و ۷)، مشخص شده است که نانوذرات نقره، تشکیل بیوفیلم را هم مختل می‌کنند (۸).

برای مدت‌های طولانی از روش‌های مختلف شیمیایی و فیزیکی برای سنتز نانوذرات استفاده شده است؛ اما به‌تازگی توجه زیادی به موجودات زنده برای تولید نانوذرات فلزی شده است. روش‌های مبتنی بر موجودات زنده، ضمن سهولت در اجرا، با محیط زیست نیز سازگار هستند و خطر کاربرد مواد شیمیایی خطرناک، سمی و گران را رفع می‌کنند. سنتز زیستی نانوذرات فلزی به‌ویژه نانوذرات طلا و نقره با استفاده از گیاهان (بافت گیاهی غیرفعال‌شده، عصاره‌های گیاهی و یا گیاه زنده) بسیار مورد توجه است (۹). در میان موجودات، گیاهان بهترین انتخاب هستند؛ زیرا به‌راحتی در دسترس هستند و برای سنتز نانوذرات در مقیاس وسیع مناسب‌ترند. مولکول‌های زیستی مختلفی در عصاره‌های گیاهی وجود دارند که قابلیت احیای یون‌های فلزی و سنتز نانوذرات را دارند و نیز می‌توانند به‌عنوان عوامل پوشش‌دهنده و پایدارکننده نانوذرات استفاده شوند. روش زیستی مبتنی بر گیاهان بسیار سریع است و می‌تواند به آسانی در دما و فشار اتاق انجام شود. به‌علاوه، نانوذرات سنتز شده به‌وسیله گیاهان، پایدارترند و از لحاظ شکل و اندازه متنوع‌تر هستند (۱۰). در میان گیاهان مختلف، به گیاهان دارویی به‌ویژه گیاهان حاوی ترکیبات با خصوصیات ضد میکروبی برای سنتز نانوذرات نقره بیشتر توجه شده است. گیاه سرخدار (*Taxus sp.*)، گروه خاصی از ترکیبات دی‌ترپنوئیدی به نام تاکسان‌ها را سنتز می‌کند که خصوصیات

Escherichia coli (ATCC 25922) و *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) و *Streptococcus pyogenes* (ATCC 1447) ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

مواد: نیترات نقره از شرکت سیگما (کشور آلمان) خریداری شد. حلال‌های استفاده شده در استخراج عصاره گیاهی از شرکت مرک (کشور آلمان) خریداری شد. مواد و محیط‌های کشت استفاده شده در آزمایشات ضدباکتریایی نیز از شرکت مرک (کشور آلمان) تهیه شد. در تمامی آزمایشات برای تهیه محلول‌ها و محیط‌های کشت از آب دوبار تقطیر استفاده شد. نمونه‌های تازه و سالم برگ گیاه سرخدار ایرانی از درختچه موجود در باغ گل‌های شهر اصفهان جمع‌آوری شد.

استخراج عصاره گیاهی و سنتز نانوذرات نقره: قبل از عصاره‌گیری، نمونه‌های برگ سرخدار به‌طور کامل شستشو و خشک شدند. از محلول اتانل ۸۰ درصد برای استخراج ترکیبات آلی از پودر آسیاب‌شده برگ گیاه استفاده شد. بدین منظور ۲ گرم از پودر برگ گیاه با ۵۰ میلی‌لیتر محلول اتانل ۸۰ درصد درون یک ارلن ۱۰۰ سی‌سی مخلوط شد و به مدت یک ساعت تحت امواج اولتراسونیک قرار گرفت. سپس ارلن به مدت ۲۴ ساعت با سرعت ۱۵۰ rpm به هم زده شد و در نهایت عصاره گیاهی با استفاده از کاغذ واتمن (شماره ۱) فیلتر شد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

به منظور سنتز نانوذرات نقره، غلظت‌های مختلفی از عصاره گیاهی طبق جدول ۱ با حجم مناسب آب دوبار

ضدسرطانی بارزی دارند و در تولید یکی از مهم‌ترین داروهای ضدسرطان به نام تاکسول استفاده می‌شوند؛ به همین دلیل از دهه‌های قبل، به گیاه سرخدار توجه زیادی شده است. سرخدار ایرانی (*Taxus baccata*)، یکی از گونه‌های مهم سرخدار است که در مناطق وسیعی از جنگل‌های شمال ایران تا رشته‌کوه‌های هیمالیا گسترش یافته است. برگ‌های تازه سرخدار ایرانی در طب باستان به‌عنوان داروی سقط جنین، ضد مالاریا، ضد رماتیسم و درمان برونشیت، و برگ‌ها و ساقه‌های خشک آن برای درمان آسم استفاده شده است (۱۱). ترکیبات تاکسانی و لیگنانی خارج شده از سرخدار ایرانی، آثار ضدالتهابی، ضد درد و ضدباکتریایی از خود بروز داده‌اند (۱۲). ترکیبات فلاونسی جدا شده از برگ‌های سرخدار ایرانی، آثار ضدقارچی بارزی در غلظت ۱۰۰ میکرومولار روی سویه‌های *Fusarium* و *Cladosporium oxysporum* نشان داده‌اند (۱۳). آثار ضدباکتریایی عصاره‌های برگ سرخدار نیز گزارش شده است (۱۴) و (۱۵). سنتز و پوشش‌دهی نانوذرات نقره با کمک ترکیبات آلی این گیاه، ممکن است به سنتز نانوذراتی با خاصیت ضدباکتریایی بالاتر کمک کند. ضمن اینکه پوشش‌دهی نانوذرات نقره با ترکیبات آلی گیاهی می‌تواند تراوش یون‌های سمی نقره به محیط پیرامونی را کم کند و برخی نگرانی‌های زیست‌محیطی مرتبط با کاربرد گسترده این نانوذرات را کاهش دهد. در این پژوهش، قابلیت ترکیبات آلی موجود در عصاره گیاه سرخدار ایرانی برای سنتز نانوذرات نقره کلونیدی پایدار با توزیع اندازه باریک و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مناسب بررسی شد و خصوصیات ضدباکتریایی نانوذرات حاصل بر روی سه سویه استاندارد باکتری‌های

مشاهده میزان رسوب‌دهی نانوذرات با گذشت زمان انجام شد و برای بررسی دقیق‌تر، پتانسیل زتای پایدارترین نمونه‌ها با کمک دستگاه ZEN 3600 Zetasizer اندازه‌گیری شد. برای تعیین شکل و اندازه نانوذرات، از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری (CM30, Philips) استفاده شد. در نهایت برای بررسی اتصال ترکیبات آلی به سطح نانوذرات، ابتدا نانوذرات با استفاده از سانتیفریوژ رسوب داده شدند و به‌دقت خشک شدند و سپس گروه‌های عاملی سطح نانوذرات به کمک طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT/IR-6300 spectrometer, Jasco) بررسی شد.

بررسی خواص ضدباکتریایی: آثار ضدباکتریایی نانوذرات نقره بر روی باکتری گرم‌منفی *Escherichia coli* (ATCC 25922) و باکتری‌های گرم‌مثبت *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) و *Streptococcus pyogenes* (ATCC 1447) با کمک روش‌های انتشار دیسک و کمینه‌غلظت بازدارندگی بررسی شد.

در روش انتشار دیسک، ابتدا دیسک‌های بلانک ۶ میلی‌متری به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول کلونیدی نانوذرات نقره با غلظت ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر غوطه‌ور شدند و سپس درون آون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌طور کامل خشک شدند. باکتری‌های موردارزیابی با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند کدورت‌سنجی شدند و بر روی محیط مولر هیتون آگار، کشت چمنی داده شدند. سپس دیسک‌های آغشته‌شده به نانوذرات نقره که کاملاً خشک شده بودند، روی محیط کشت قرار داده شد. هاله‌ی عدم رشد پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد.

تقطیر مخلوط شد و به هر محلول، ۰/۵ یا ۱ میلی‌لیتر محلول استوک نیترات نقره ۲۰ میلی‌مولار به‌صورت قطره‌قطره در شرایطی که محلول تحت امواج اولتراسونیک قرار داشت اضافه شد. بدین ترتیب غلظت نهایی نیترات نقره در محلول واکنش به ترتیب ۰/۵ یا ۱ میلی‌مولار و حجم کلی واکنش‌ها ۲۰ میلی‌لیتر بود. سپس محلول‌های واکنش در شرایط اتاق با سرعت ۱۵۰ rpm به هم زده شدند و پیشرفت هر واکنش به‌طور متناوب با مشاهده تغییر رنگ آن‌ها و نیز طیف‌سنجی مرئی - ماوراء بنفش بررسی شد.

جدول ۱- ترکیب واکنش‌های مختلف استفاده‌شده در سنتز

نانوذرات نقره (بر حسب میلی‌لیتر)

عصاره گیاهی	نیترات نقره ۲۰ mM	آب دوبار تقطیر
۱	۰/۵	۱۸/۵
۱	۱	۱۸
۲	۰/۵	۱۷/۵
۲	۱	۱۷
۳	۰/۵	۱۶/۵
۳	۱	۱۶
۴	۰/۵	۱۵/۵
۴	۱	۱۵

مشخصه‌یابی نانوذرات نقره: از طیف‌سنجی مرئی -

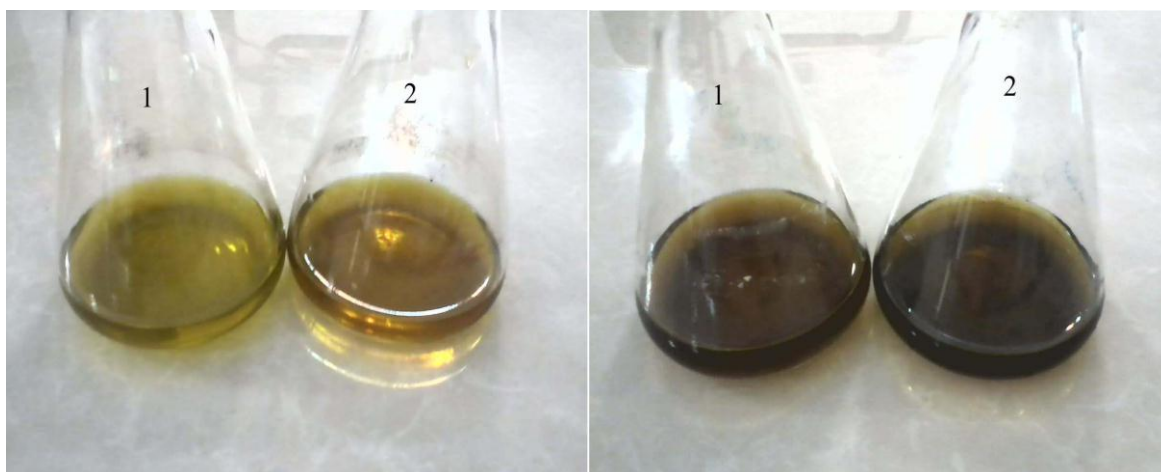
ماوراء بنفش برای ارزیابی اولیه خصوصیات نوری نانوذرات نقره پس از ۶ ماه نگهداری در شرایط اتاق استفاده شد. بدین منظور طیف جذب محلول کلونیدی نانوذرات (۱ میلی‌لیتر) در ناحیه ۳۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه Biochrom WPA اندازه‌گیری شد. از پراکندگی دینامیکی نور (DLS) برای تعیین قطر هیدرودینامیکی نانوذرات و توزیع اندازه آن‌ها استفاده شد. بررسی اولیه میزان پایداری نانوذرات از طریق

نتایج

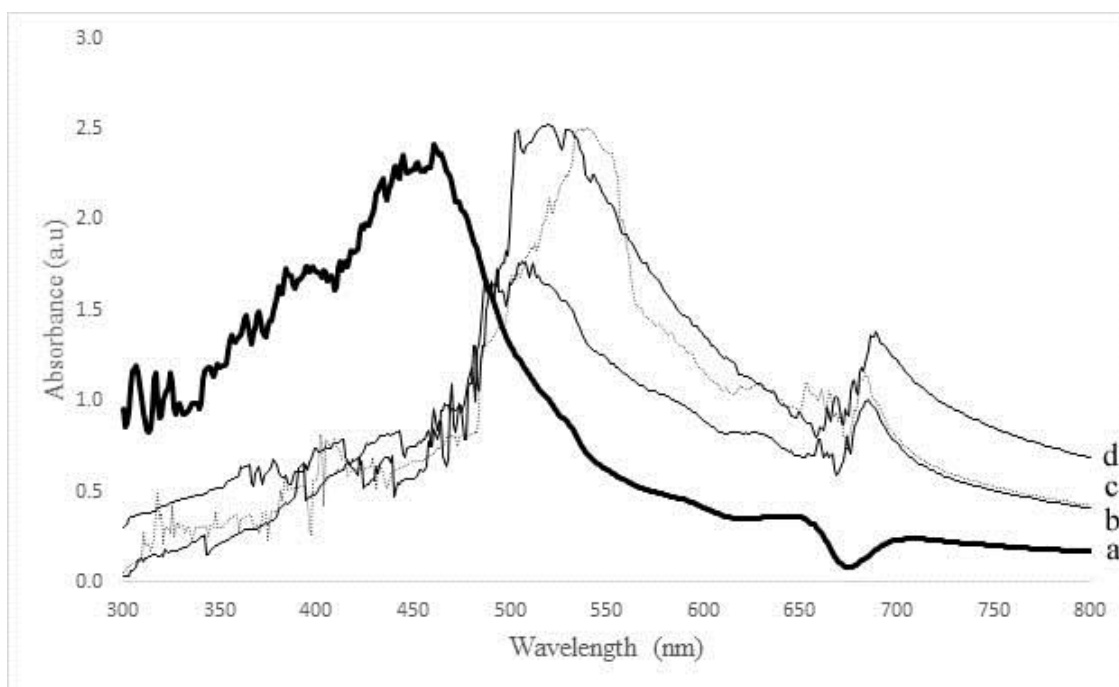
سنتز نانوذرات نقره و مشخصه‌یابی آن‌ها: از آنجاکه در پژوهش‌های قبلی (۱۷)، محلول ۸۰ درصد اتانل به‌عنوان کارآمدترین حلال برای جداسازی ترکیبات تاکسانی با بیشترین بازده از بافت گیاه سرخدار معرفی شده بود، در این پژوهش نیز از حلال مشابه استفاده شد. بدین ترتیب سعی شد تا احتمال شرکت ترکیبات تاکسانی در واکنش احیا یا در پوشش‌دهی نانوذرات افزایش یابد. پس از افزودن محلول نیترات نقره به محلول عصاره، رنگ واکنش به آرامی از زرد به سبز تغییر کرد. با توجه به گزارش‌های مختلف (۱۸ و ۱۹)، این تغییر رنگ به دلیل سنتز نانوذرات نقره است که خصوصیات تشدید پلاسمون سطح بروز می‌دهند و در نتیجه باعث تغییر رنگ محلول واکنش می‌شوند (شکل ۱)؛ بنابراین می‌توان انجام واکنش و سینتیک آن را از طریق بررسی تغییر رنگ محلول واکنش و طیف‌سنجی مرئی - ماوراء بنفش مطالعه کرد. از طرف دیگر، با توجه به ارتباط طول موج جذب نانوذرات با شکل و اندازه آن‌ها، می‌توان از طیف جذب محلول کلونیدی برای پیش‌بینی این خصوصیات استفاده کرد (۲۰). بررسی مخلوط واکنش‌ها با روش طیف‌سنجی مرئی - ماوراء بنفش این مطلب را تأیید کرد و نشان داد که طیف جذب نانوذرات در محدوده ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر قرار دارد و با افزایش غلظت عصاره به سمت ناحیه قرمز متمایل می‌شود (۱۹) (شکل ۲). سرعت واکنش نیز تحت تأثیر غلظت عصاره قرار داشت چنان‌که با افزایش غلظت عصاره، سرعت واکنش کاهش یافت و زمان بیشتری برای تغییر رنگ و تکمیل واکنش نیاز بود. نانوذرات حاصل بسیار پایدار بودند و حتی پس از ۶ ماه همچنان پایدار باقی ماندند و رسوب در خور ملاحظه‌ای در هیچ‌یک از واکنش‌ها دیده نشد.

کمینه‌غلظت بازدارندگی به‌روش برات میکرودیلوژن براساس گزارش‌های قبلی (۱۶) تعیین شد. بدین منظور یک کلنی از هر باکتری در محیط کشت تریپتیک سوی برات تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی همزن مدور با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به‌صورت شبانه‌گرم‌گذاری شد و روز بعد با استفاده از محلول ۰/۹ درصد کلرید سدیم تا غلظت ۰/۵ مک‌فارلند رقیق شد. رقت‌های مختلف از نانوذرات نقره (۰/۷۸ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) با ضریب رقت ۲ تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق‌شده نانوذرات و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی باکتریایی به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌گذاری شد. برای هر نانوذره مورد آزمایش، دو نمونه کنترل شامل نانوذرات نقره به همراه محیط کشت فاقد باکتری (کنترل مثبت) و محیط کشت تلقیح‌شده با باکتری ولی فاقد نانوذرات (کنترل منفی) نیز استفاده شد. با مقایسه میزان جذب نمونه‌ها با نمونه کنترل، کمینه‌غلظت بازدارندگی تعیین شد. کمترین غلظت نانوذرات که باعث توقف رشد سلول‌های باکتری شود یا به عبارتی مقدار جذب نوری چاهک مربوطه کمتر از چاهک کنترل باشد، به‌عنوان کمینه‌غلظت بازدارندگی در نظر گرفته می‌شود.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج: تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شد و نتایج به‌صورت میانگین سه تکرار \pm انحراف استاندارد بیان شدند. از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) برای بررسی آماری نتایج استفاده شد و فاصله اطمینان ۹۹ درصد برای معنی‌دار بودن اختلافات در نظر گرفته شد.



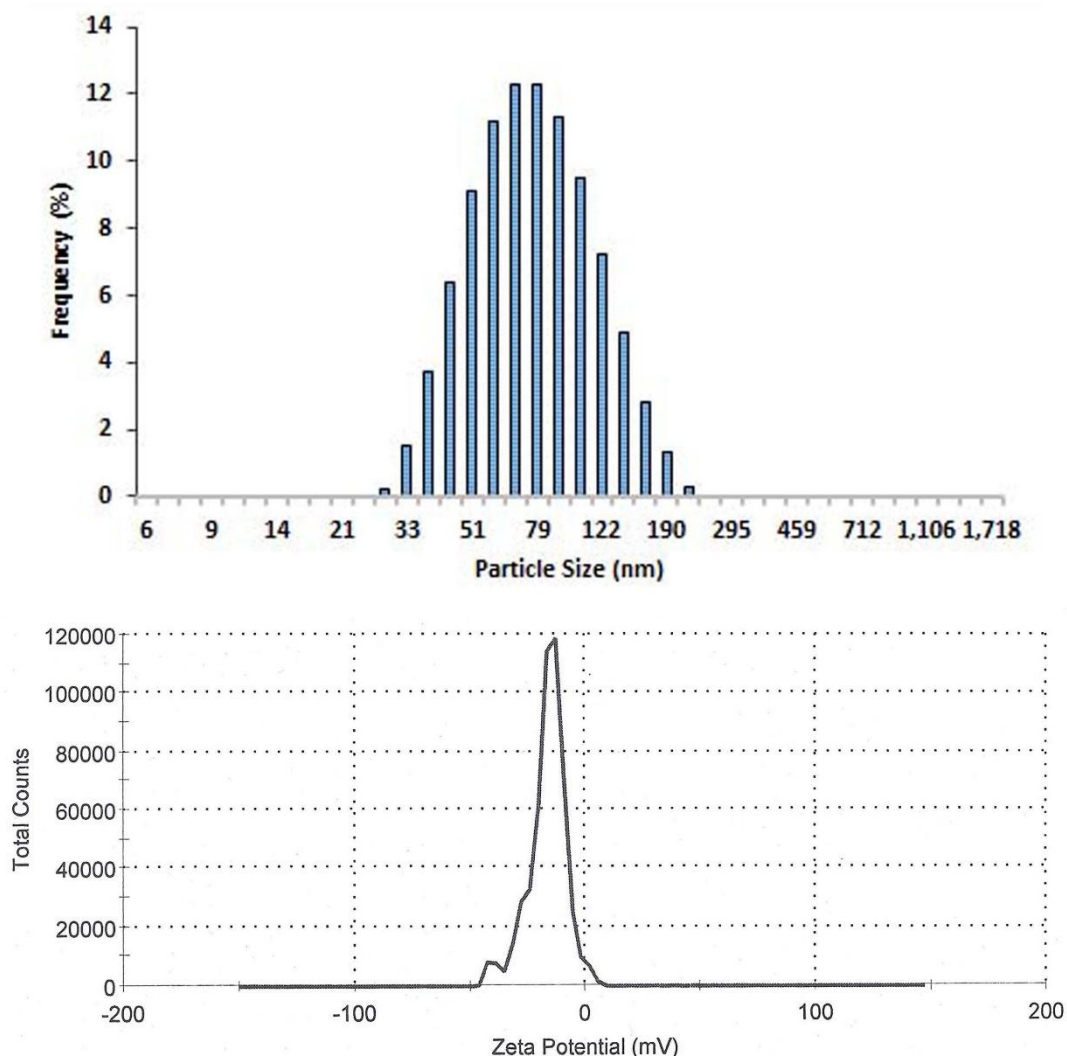
شکل ۱- محلول عصاره (سمت چپ) و محلول حاوی نانوذرات نقره پس از افزودن نیترات نقره و انجام واکنش احیا (سمت راست). در شکل سمت راست، محلول شماره ۱ حاوی ۰/۵ میلی‌مولار نیترات نقره و محلول شماره ۲ حاوی ۱ میلی‌مولار نیترات نقره است.



شکل ۲- طیف جذبی نانوذرات نقره سنتز شده در حضور ۱ (a)، ۲ (b)، ۳ (c) و ۴ (d) میلی‌لیتر عصاره اتانلی سرخدار.

۱۶/۴- و میانگین قطر هیدرودینامیکی نانوذرات آن ۷۵/۱ نانومتر بود (شکل ۳). افزایش غلظت نیترات نقره تنها باعث افزایش سرعت واکنش و ناپایداری و رسوب نانوذرات در محلول کلئیدی شد.

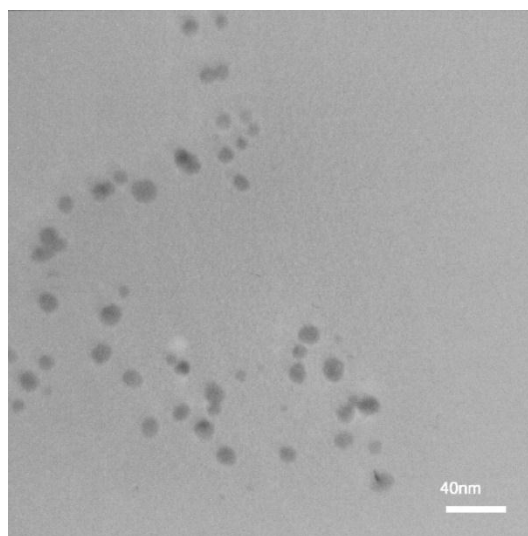
مشاهده میزان رسوب نانوذرات در طول زمان نشان داد که افزایش غلظت عصاره باعث افزایش پایداری نانوذرات در محلول کلئیدی می‌شود و بیشترین پایداری مربوط به واکنش حاوی ۴ میلی‌لیتر عصاره و ۰/۵ میلی‌مولار نیترات نقره بود که پتانسیل زتای آن



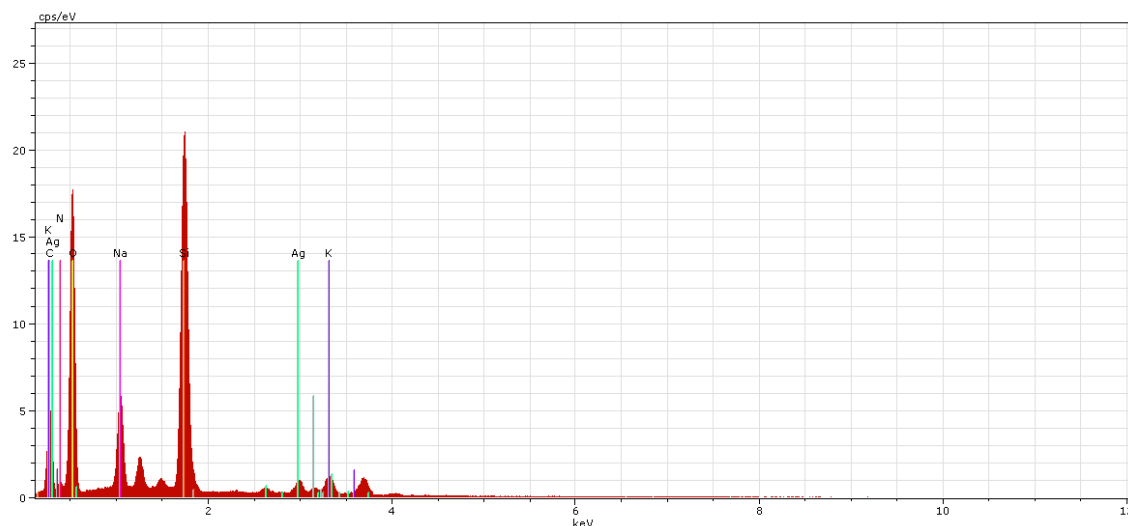
شکل ۳- منحنی توزیع اندازه (بالا) و پتانسیل زتا (پایین) نانوذرات نقره سنتز شده در شرایط بهینه در حضور عصاره اتانلی سرخدار.

آن‌ها اندازه‌ای در حدود ۵ تا ۲۰ نانومتر با توزیع اندازه محدود دارند. این نتایج بر قابلیت بالای ترکیبات آلی گیاه سرخدار در پوشش‌دهی نانوذرات و پایدارسازی آن‌ها در محلول کلونیدی دلالت دارند. برای تأیید اینکه نانوذرات مشاهده شده در میکروسکوپ الکترونی از جنس نقره هستند، نمونه مزبور با روش EDS نیز بررسی شد که نتایج آن در شکل ۵ نشان داده شده است.

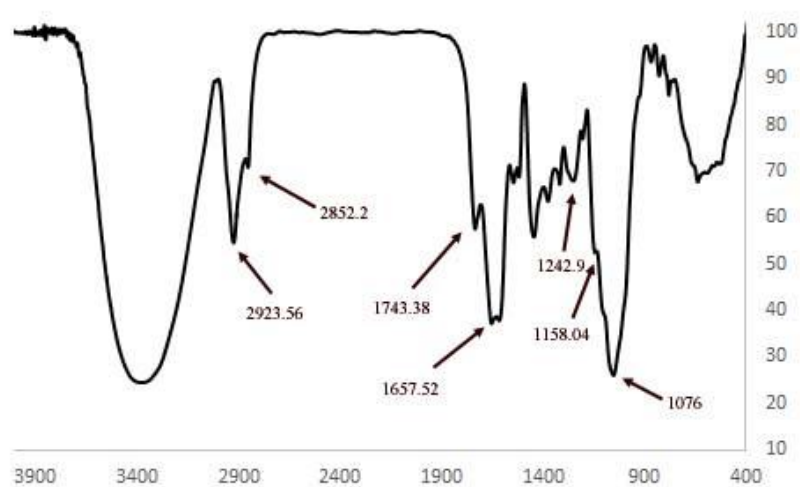
بررسی شکل نانوذرات با تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی نشان داد که نانوذرات به شکل‌های ناهمسان و بیشتر شش ضلعی یا مثلثی شکل با گوشه‌های بریده هستند (شکل ۴) که با طیف جذبی حاصل از طیف سنجی مرئی- ماوراء بنفش نیز همخوانی دارد. همچنین تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که نانوذرات به صورت تک‌دانه است و بیشتر



شکل ۴- تصویر گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوذرات نقره سنتز شده در حضور عصاره گیاه سرخدار.



شکل ۵- طیف EDS نانوذرات نقره



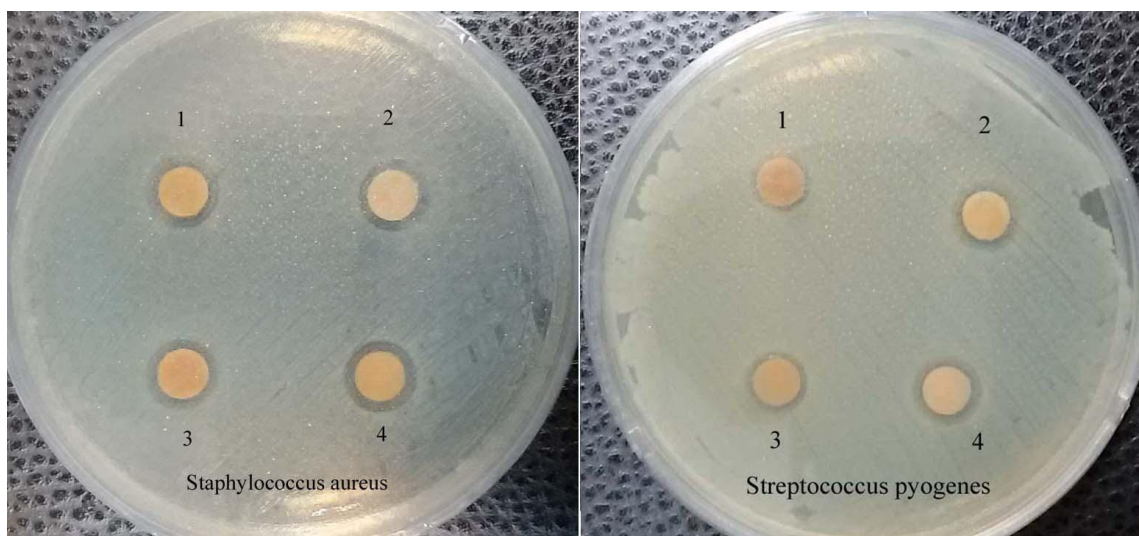
شکل ۶- نتایج طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز نانوذرات نقره سنتز شده در حضور عصاره گیاه سرخدار

طیف‌نگاری مرئی - ماوراء بنفش محلول رویی نیز هیچ طیف جذبی را نشان نداد که بر حذف کامل ترکیبات آلی از محلول و اتصال آن‌ها به سطح نانوذرات دلالت داشت.

در کل براساس نتایج می‌توان بیان کرد که ترکیبات آلی موجود در عصاره اتانلی سرخدار، علاوه بر اینکه قابلیت احیای نمک‌های فلزی و سنتز نانوذرات فلزی با کیفیت بالا را دارند، در پوشش‌دهی و پایدارسازی نانوذرات نیز نقش بارزی ایفا می‌کنند.

اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره: در پژوهش حاضر، نانوذرات نقره سنتز شده در حضور عصاره گیاه سرخدار پس از سانتریفیوژ و توزیع در آب مقطر برای مطالعه فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات استفاده شدند. بررسی ما به کمک روش انتشار دیسک نشان داد که نانوذرات بر روی هر سه باکتری‌های *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pyogenes* فعالیت ضدباکتریایی دارند (شکل ۷).

نتایج حاصل از طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز، وجود گروه‌های عاملی مختلفی از جمله هیدروکسیل، کربوکسیل و کربونیل را در سطح نانوذرات نشان داد (شکل ۶) که باعث بار منفی سطح نانوذرات شده‌اند. باندهای ۱۰۷۶ و ۱۱۵۸/۰۴ مربوط به پیوندهای ارتعاشی کششی C-O در گروه‌های استری و اسیدی، باند ۱۶۵۷/۵۲ مربوط به گروه آمیدی پروتئین‌ها، و باند ۱۷۴۳/۳۸ مربوط به پیوند ارتعاشی کششی گروه‌های آلدئیدی، کتونی و استری است که به فراوانی در ترکیبات ترپنوئیدی مشاهده می‌شوند. باندهای ۲۸۵۲/۲ و ۲۹۲۳/۵۶ نیز مربوط به پیوند کششی C-H در ترکیبات آلکانی است. نتایج بر جذب کارآمد ترکیبات آلی همچون ترکیبات آلیفاتیک، آروماتیک و پروتئین‌ها در سطح نانوذرات دلالت دارد. همچنین هنگامی که نانوذرات با استفاده از سانتریفیوژ رسوب‌گیری شدند، محلول رویی کاملاً شفاف و بی‌رنگ بود که نشان‌دهنده شرکت تمامی ترکیبات آلی و نمک نقره در واکنش سنتز نانوذرات نقره بود.



شکل ۷- نتایج آزمایش انتشار دیسک مربوط به نانوذرات نقره سنتز شده در حضور عصاره گیاه سرخدار.

شد درحالی که برای باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* در غلظت ۲۵ میکروگرم تعیین شد.

جدول ۳- کمیته‌غلظت بازدارندگی نانوذرات نقره بر روی باکتری‌های مختلف (بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر)

ردیف	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>
۱	۲۵	۲۵	۵۰
۲	۲۵	۲۵	۵۰
۳	۲۵	۲۵	۵۰
۴	۲۵	۲۵	۵۰

بحث و نتیجه‌گیری

وجود مقادیر بالایی از ترکیبات ترپنوئیدی و فنولی در بافت گیاه سرخدار (۲۱)، قابلیت عصاره سلولی این گیاه برای احیای نمک نقره و سنتز نانوذرات نقره پایدار را افزایش می‌دهد. این ترکیبات می‌توانند به سطح نانوذرات نیز متصل شوند و نقش پایدارکننده را ایفا کنند (۲۲). بدین ترتیب نانوذرات پایدارتر است و می‌تواند نقش حامل ترکیبات سطحی خود را نیز ایفا کنند که از این خصوصیت به‌طور ویژه برای انتقال داروها به بافت‌های خاص بدن بیماران استفاده شده است. همچنین خصوصیات زیستی مختلف ترکیبات آلی می‌تواند خصوصیات نانوذره را تحت‌تأثیر قرار دهد و در مواردی از طریق آثار هم‌افزایی، به تکامل نانوذراتی با خصوصیات برتر منجر شود که از آن جمله می‌توان به خصوصیات ضدسرطانی و ضدباکتریایی بالاتر اشاره کرد.

در این رابطه، مقاوم‌شدن باکتری‌ها در طول زمان به آنتی‌بیوتیک‌ها، تکامل عوامل ضدباکتریایی جدید را ضروری کرده است. از آنجاکه نقره و ترکیبات مبتنی بر این عنصر از دیرباز برای کاربردهای گندزدایی و مبارزه

نتایج حاصل از اندازه‌گیری هاله عدم رشد در جدول ۲ نشان داده شده است. به‌منظور تعیین اثر غلظت عصاره گیاهی بر خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات، از چهار غلظت مختلف شامل ۱، ۲، ۳، و ۴ میلی‌لیتر عصاره اتانلی (به‌ترتیب شماره‌های ۱ تا ۴) در واکنش‌های سنتزی جداگانه استفاده و نانوذرات حاصل در آزمایشات استفاده شدند. نتایج نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین چهار دسته نانوذرات از نظر اثر ضدباکتریایی بر سویه‌های مورد مطالعه وجود ندارد. به عبارت دیگر، افزایش غلظت عصاره تأثیر معنی‌داری بر فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نداشت. اثر ضدباکتریایی نانوذرات بر روی باکتری‌های مختلف متفاوت بود. هرچند اثر ضدباکتریایی نانوذرات روی سویه *S. pyogenes* کمتر از دو سویه دیگر بود ولی بین دو سویه *E. coli* و *S. aureus* اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۲- نتایج حاصل از اندازه‌گیری هاله عدم رشد نانوذرات نقره بر روی باکتری‌های مختلف

ردیف	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>
۱	۹/۷ ± ۰/۵۶	۹/۷۷ ± ۰/۶۱	۸/۶۷ ± ۰/۵۵
۲	۹/۵۶ ± ۰/۵	۹/۵ ± ۰/۵	۸/۶۳ ± ۰/۴۲
۳	۹/۷۳ ± ۰/۵۷	۹/۹۷ ± ۰/۲۵	۸/۸۳ ± ۰/۶
۴	۹/۶۳ ± ۰/۵۷	۹/۷ ± ۰/۷۲	۸/۵۷ ± ۰/۵۵

کمیته‌غلظت بازدارندگی نانوذرات نقره بر روی سه گونه مورد آزمایش در جدول ۳ بیان شده است. نتایج نشان می‌دهد که غلظت عصاره مورد استفاده در سنتز نانوذرات اثری روی کمیته‌غلظت بازدارندگی نانوذرات ندارد که با نتایج حاصل از آزمایشات انتشار دیسک مطابقت دارد. کمیته‌غلظت بازدارندگی برای باکتری *S. pyogenes* در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حاصل

قابلیت سنتر نانوذرات نقره بسیار پایدار با اندازه کمتر از ۲۰ نانومتر و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مناسب را دارد. همچنین نانوذرات خصوصیات ضدباکتریایی قابل قبولی روی باکتری‌های مطالعه شده نشان دادند. کمینه غلظت بازدارندگی به دست آمده در این پژوهش، به مراتب کمتر از مقادیر به دست آمده در پژوهش‌های قبلی بود (۲۰-۲۲). با توجه به اینکه روش استفاده شده در این پژوهش بر پایه ترکیبات آلی گیاهی است و از مواد شیمیایی سمی و خطرناک استفاده نشد، نانوذرات حاصل، نگرانی‌های زیست‌محیطی کمتری را باعث می‌شوند و می‌توانند برای کاربردهای مختلف پزشکی، دارویی، غذایی، منسوجات و صنعت مناسب‌تر باشند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان در راستای انجام این پژوهش تقدیر و تشکر می‌شود.

References

- (1) Jena P, Mohanty S, Mallick R, Jacob B, Sonawane A. Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells. *International Journal of Nanomedicine* 2012; 7:1805-18.
- (2) Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang a Z, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2008; 83(5): 761-9.

با عوامل میکروبی استفاده شده‌اند، می‌توانند گزینه‌ای مناسب برای تکامل نسل جدیدی از عوامل ضد میکروبی باشند. در این زمینه نانوذرات نقره به‌ویژه نانوذرات سنتز شده با روش‌های زیستی در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه دانشمندان قرار گرفته‌اند (۲۳).

در گزارش‌های قبلی، آثار ضدباکتریایی عصاره‌های مختلف برگ سرخدار ایرانی تهیه شده با استفاده از حلال‌های مختلف شامل n-هگزان، دی‌کلرو متان، اتیل استات، اتانل و آب، بر روی ۹ گونه باکتری گرم منفی و ۴ گونه گرم مثبت بررسی شده است (۱۴). در پژوهش مزبور، از روش‌های انتشار دیسک و کمینه غلظت بازدارندگی برای بررسی آثار ضدباکتریایی عصاره‌ها استفاده شده است. نویسندگان گزارش کردند که عصاره اتانلی قابلیت بازدارندگی رشد تمامی ۱۳ گونه بررسی شده را دارد در حالی که عصاره‌های دیگر فعالیت ضدباکتریایی انتخابی نشان دادند. کمترین غلظت بازدارندگی به میزان ۳۹/۰۶ میکروگرم در میلی‌لیتر مربوط به عصاره اتانلی (بر روی پنج گونه) و عصاره آبی (برای یک گونه) بود. نویسندگان در پایان عصاره‌های اتانلی و آبی سرخدار ایرانی را بهترین عصاره‌ها از نظر قدرت ضدباکتریایی معرفی کردند. با توجه به نتایج قبلی، پیش‌بینی می‌شد که استفاده از عصاره‌های گیاه سرخدار در سنتر زیستی نانوذرات نقره باعث دستیابی به نانوذراتی با خصوصیات ضدباکتریایی بالاتر شود. نانوذرات نقره استفاده شده در این پژوهش، به دلیل استفاده از روش‌های سبز در سنتر آن‌ها، نگرانی‌های زیست‌محیطی کمتری دارند و از طرف دیگر، ترکیبات ضد میکروبی موجود در عصاره گیاه سرخدار می‌توانند بر آثار ضد میکروبی نانوذرات بیفزایند. نتایج نشان داد که عصاره اتانلی گیاه سرخدار

- (3) Hong B, Kai J, Ren Y, Han J, Zou Z, Ahn CH. Highly Sensitive Rapid, Reliable, and Automatic Cardiovascular Disease Diagnosis with Nanoparticle Fluorescence Enhancer and Mems. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2008; 614: 265-73.
- (4) Marambio-Jones C, Hoek EM V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research* 2010; 12(5): 1531-51.
- (5) Rai MK, Deshmukh SD, Ingle a P, Gade K. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 2012; 112(5): 841-52.
- (6) Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver. *Nanoscale* 2013; 5(16): 7328-40.
- (7) Prabhu S, Poulouse EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters* 2012; 2(1): 32.
- (8) Reidy B, Haase A, Luch A, Dawson K, Lynch I. Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. *Materials* 2013; 6(6): 2295-350.
- (9) Iravani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry* 2011; 13(10): 2638.
- (10) Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances* 2013; 31(2): 346-56.
- (11) Patel P, Patel K, Gandhi T. Evaluation of Effect of *Taxus baccata* Leaves Extract on Bronchoconstriction and Bronchial Hyperreactivity in Experimental Animals. *Journal of Young Pharmacists* 2011; 3(1): 41-7.
- (12) Bilge S. Biological activities of lignans from *Taxus baccata* L. growing in Turkey. *Journal of medicinal plant research* 2010; 4(12): 1136-40.
- (13) Krauze-Baranowska M, Wiwart M. Antifungal activity of biflavones from *Taxus baccata* and *Ginkgo biloba*. *Zeitschrift fur Naturforschung C* 2003; 58(1-2): 65-9.
- (14) Paras K, Manish A, Bharat S. Antimicrobial activity of various extracts from the leaves of *Taxus baccata* L. *Pharmacologyonline* 2009; 2: 217-224.
- (15) Erdemoglu N, Sener B, Palittapongarnpim P. Antimycobacterial Activity of *Taxus baccata*. *Pharmaceutical Biology* 2003; 41(8): 614-615.
- (16) Cheng F, Betts JW, Kelly SM, Schaller J, Heinze T. Synthesis and antibacterial effects of aqueous colloidal solutions of silver nanoparticles using aminocellulose as a combined reducing and capping reagent. *Green Chemistry* 2013; 15(4): 989.
- (17) Li S, Fu Y, Zu Y, Sun R, Wang Y, Zhang L. Determination of paclitaxel and other six taxoids in *Taxus* species by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2009; 49(1): 81-9.
- (18) Mock JJ, Barbic M, Smith DR, Schultz D., Schultz S. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *The Journal of Chemical Physics* 2002; 116(15): 6755.
- (19) Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *The Journal of Physical Chemistry B* 2003; 107: 668-677.
- (20) Hao E, Hao E, Schatz GC, Schatz GC, Hupp JT, Hupp JT. Synthesis and Optical Properties of Anisotropic Metal Nanoparticles. *Journal of Fluorescence*,

2004; 14(4): 331-341.

- (21) Abbasi Kajani A, Mofid MR, Abolfazli K, Tafreshi SAH. Encapsulated activated charcoal as a potent agent for improving taxane synthesis and recovery from cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2010; 56(2): 71-6.
- (22) Shankar SS, Rai A, Ankamwar B, Singh A, Ahmad A, Sastry M. Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. *Nature Materials* 2004; 3(7): 482-8.
- (23) Prakash P, Gnanaprakasam P, Emmanuel R, Arokiyaraj S, Saravanan M. Green synthesis of silver nanoparticles from leaf extract of *Mimusops elengi L.* for enhanced antibacterial activity against multi drug resistant clinical isolates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013; 108: 255-9.
- (24) Lee H, Ryu D, Choi S, Lee D. Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* 2011; 39(1): 77-85.

Synthesis of stable colloidal silver nanoparticles with antibacterial properties by using *Taxus baccata* extract

Abolghasem Abbasi Kajani

PhD in Nanobiotechnology, University of Isfahan, Iran, a.abbasi@chem.ui.ac.ir

Sayed Hamid Zarkesh-Esfahani*

Associate Professor of Immunology, University of Isfahan, Iran, s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk

Abdol-Khalegh Bordbar

Professor of Biochemical Physics, University of Isfahan, Isfahan, Iran, bordbar@chem.ui.ac.ir

Abstract

Introduction: Bacterial resistance to antibiotics increased the importance of developing novel antibacterial agents. Silver nanoparticles could be considered as one of the most important antibacterial agents. Regarding to the environmental concerns of widespread application of silver nanoparticles, the use of green methods for synthesis of the nanoparticles can lead to less concerns and to develop the nanoparticles with improved properties.

Materials and methods: The ethanolic extract of *Taxus baccata* leaves was prepared and used in different concentrations for reduction of silver nitrate and synthesis of silver nanoparticles. The resulted nanoparticles were characterized by different methods including UV-Vis spectroscopy, Transmission electron microscopy, FT-IR, DLS, and Zetasizer. The antibacterial activity of silver nanoparticles was finally investigated using disk diffusion assay and minimum inhibitory concentration assay.

Results: The ethanolic extract of *T. baccata* displayed high potential to synthesize high quality and stable silver nanoparticles with size below 50 nm. The nanoparticles displayed considerable antibacterial effect on all three tested bacteria. Minimum inhibitory concentration of 50 µg/ml obtained for *S. pyogenes* (ATCC 1447) and 25 µg/ml for *E. coli* (ATCC 25922) and *S. aureus* (ATCC 25923).

Discussion and conclusion: The use of biological compounds especially plant extracts instead of dangerous and toxic chemicals for synthesis of silver nanoparticles could be considered as alternatives to reduce the environmental concerns of these nanoparticles. With respect to the considerable antibacterial activity of the nanoparticles synthesized with the present method, the nanoparticles can be used for different medical, food, and industrial applications.

Key words: Silver nanoparticles, *Taxus baccata*, Antibacterial, Green synthesis, Disk diffusion, Minimum inhibitory concentration

* Corresponding author

Received: June 15, 2015 / **Accepted:** September 12, 2015