Journal of Police Medicine

Spring 2017; Vol. 6, No. 1: 57-66

Original Article

Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Aqueous extract of Saffron Corm and Evaluation of their Antibacterial and Mutagenesis Activity

Received: 17 September 2016 **Revised:** 23 February 2017 **Accepted:** 2 March 2017

ABSTRACT

Arefeh Taghva[1]
Maliheh Entezari[2*]

[1] M.Sc of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biology, Islamic Azad University, Farahan Branch, Farmahin, Iran.

[2] Developmental and Cell Biology of Plants, Department of Biology, Faculty of Modern Medical Science, Islamic Azad University, Tehran Branch, Tehran, Iran.

[*]**Corresponding Author:**
Maliheh Entezari
Tel: (+98) 21 22006660
Email: entezarimali@yahoo.com

Background: Nanoparticles are materials with 3D structures and sizes of 1-100 nanometers. Although there are several ways of nanoparticles production, but the biological method of nanoparticles production is under attention of researchers due to its ecofriendly and energy saving properties. In the present study, biosynthesis of silver nanoparticle by saffron corm extract was examined. Furthermore, antibacterial effect of the produced nanoparticles on three common pathogens was investigated. At the end, mutagenesis potential of Nanoparticles was investigated.

Materials and Methods: At first, corms of saffron purchased and the herbalist confirmed their genus and species. In order to nanoparticles production, the corms extracts were subjected to the silver nitrate aqueous solution at the final concentration of 1mM. After nanoparticles production, the color changed reaction mixture was used for characterization with spectrophotometry, X-ray diffraction analysis (XRD) and Transition electron microscopy (TEM). Then, the antibacterial effect of the produced nanoparticles was investigated by agar well diffusion method against three bacterial pathogenic strains. At the final mutagenesis effect of silver nanoparticles was investigated by Ames test.

Results: After nanoparticles production, the color of the mixture was converted to dark brown attributed to the surface Plasmon resonance band (SPR) of the silver nanoparticles. Visible expectra of the color changed mixture had maximum absorption peak around 420 nm. Furthermore, presence of the silver nanoparticles was confirmed by the XRD. TEM analysis revealed that the obtained silver nanoparticles were spherical in their shapes and their average sizes were around 5-25 nm. Antibacterial assays revealed that the produced nanoparticles had suitable effects against all of the three bacterial strains. Moreover, statistical analysis has demonstrated that the antibacterial effects of these nanoparticles against Gram positive and negative bacterial tested strains have showed similarity. No mutagenic effect of nanoparticles was observed.

Conclusion: It seems that the biological production of nanoparticles with usage of these plant extract is able to enhance their medicinal effects. In this study, it was indicated that the antibacterial property of the extracts containing nanoparticles was promoted considerably. Promoting of other effects of these nanoparticles can be prospective for the future studies.

Keywords: Biosynthesis, Silver Nanoparticles, Antibacterial, Ames test

بهار ۱۳۹۶- دوره ۶- شماره ۱- صفحات ۶۶-۵۷

مجله طب انتظامی

مقاله تحقیقی

بیوسنتز و بررسی تولید نانو ذرات نقره به‌وسیله عصاره آبی پیاز گیاه زعفران و بررسی اثر ضد باکتریایی و پتانسیل جهش‌زایی نانو ذرات تولید شده

تاریخ دریافت: ۲۷ شهریور ۱۳۹۵ **تاریخ اصلاح:** ۵ اسفند ۱۳۹۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۲ اسفند ۱۳۹۵

عارفه تقوی[۱]

ملیحه انتظاری[۲]*

[۱]کارشناسی ارشد میکروبیولوژی ، گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فراهان ، فرمهین ، ایران.

[۲] دکترای تخصصی ، گروه زیست‌شناسی ، دانشکده علوم نوین پزشکی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران ، تهران، ایران.

***نویسنده مسئول:**

ملیحه انتظاری

تلفن: ۲۱۲۲۰۰۶۶۶۰(۹۸+)

پست الکترونیک:

entezarimali@yahoo.com

چکیده

مقدمه: نانو ذرات موادی سه‌بعدی با اندازه ۱ الی ۱۰۰ نانومتر می‌باشند. اگرچه راه‌های متفاوتی برای سنتز نانو ذرات وجود دارد، اما تولید زیستی نانو ذرات به علت مزایایی مانند سازگاری با محیطزیست و مصرف کم انرژی موردتوجه می‌باشد. در مطالعه حاضر سنتز زیستی نانو ذرات نقره به‌وسیله پیاز گیاه زعفران مورد بررسی قرار گرفت. همچنین خواص ضد باکتریایی نانو ذرات بر روی سه باکتری بیماری‌زای رایج بررسی و در آخر نیز پتانسیل جهش‌زایی نانو ذرات تولیدی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در ابتدا پیاز زعفران خریداری شد و جنس و گونه توسط گیاه‌شناس تأیید گردید. به‌منظور تولید نانو ذرات، عصاره پیاز زعفران با محلول نیترات نقره در غلظت نهایی ۱ میلی مولار مجاور شد. پس از تغییر رنگ، محلول واکنش حاوی نانو ذرات نقره به‌وسیله روش‌های اسپکتروفتومتری، پراش پرتوی ایکس و میکروسکوپ الکترونی عبوری مورد بررسی قرار گرفت. سپس اثر ضد باکتریایی نانو ذرات تولید شده در برابر سه سویه باکتری بیماری‌زا به‌وسیله روش‌های ایجاد چاهک در آگار و تعیین حداقل غلظت مهاری بررسی شد و در پایان پتانسیل جهش‌زایی نانو ذرات تولیدی به‌وسیله آزمون ایمز مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: رنگ محلول پس از تولید نانو ذرات به علت رزونانس پلاسمون سطحی مربوط به نانو ذرات نقره به قهوه‌ای تیره تغییر کرد. محلول نانو ذرات دارای بیشینه پیک جذب در حدود طول موج ۴۲۰ نانومتر بود. همچنین وجود نانو ذرات نقره به‌وسیله پراش پرتوی ایکس تأیید شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد که نانو ذرات نقره به دست آمده به شکل کروی و با اندازه حدود ۵ الی ۲۵ نانومتر بودند. نتایج آزمون ضد باکتریایی نشان داد که نانو ذرات تولید شده اثر مناسبی را بر روی هر سه باکتری مورد آزمایش داشتند. همچنین هیچ‌گونه تأثیر جهش‌زایی از نانو ذرات در آزمون ایمز مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که تولید زیستی نانو ذرات با استفاده از عصاره گیاهان می‌تواند به افزایش خواص دارویی آن‌ها کمک کند. در تحقیق حاضر نشان داده شد که خواص ضد باکتریایی عصاره حاوی نانو ذرات به شکل محسوسی افزایش یافت. افزایش دیگر خواص این نانو ذرات می‌تواند در آینده مورد بررسی قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: بیوسنتز، نانو ذرات نقره، ضد باکتریایی، ایمز

مقدمه

نانو ذرات گروهی خاص از مواد با ویژگی‌های منحصربه‌فرد و برنامه‌های کاربردی گسترده در زمینه‌های مختلف می‌باشند [۱]. مطالعه این ویژگی‌های خاص همواره موردتوجه بسیاری از دانشمندان بوده است و درواقع مشخص‌شده که نانو ذرات خواص منحصربه‌فردی در مقایسه با همتایان خود در اندازه بزرگتر دارند [۲]. بسیاری از موادی که در اندازه بزرگ خاصیت سمیت ندارند، در اندازه نانو از خود خواص سمی نشان می‌دهند که این خواص عمدتاً به افزایش سطح و درنتیجه واکنش‌پذیری بالای نانو ذرات مرتبط می‌باشد [۳]. به‌صورت قطع سطح بیشتر، مانند حالتی که در نانو ذرات مشاهده می‌شود، باعث افزایش تعاملات احتمالی با موجود زیستی که سلول‌ها می‌باشند، می‌شود [۴]. فعالیت ضد میکروبی قابل‌توجه بسیاری از نانو ذرات اکسید فلزی معدنی مانند ZnO، MgO، TiO_2، SiO_2 و پتانسیل سمیت انتخابی که از خود نسبت به سیستم‌های بیولوژیکی نشان

Journal of Police Medicine
Spring 2017; Vol. 6, No. 1: 57-66

می‌دهند، آن‌ها را به‌عنوان گزینه‌ای مناسب در درمان، تشخیص، دستگاه‌های جراحی و عوامل ضد میکروبی در نانو پزشکی معرفی می‌نماید [۵]. رایج‌ترین روش‌ها جهت تولید نانو ذرات شامل انواع روش‌های تولید شیمیایی و تولید فیزیکی می‌باشند اما استفاده از این روش‌ها دارای معایبی مانند استفاده از مواد شیمیایی خطرناک، تولید پسماندهای آلوده‌کننده محیط‌زیست، مصرف انرژی بالا و بازده پایین می‌باشد و به همین جهت دانشمندان به دنبال روش‌های جدید جهت تولید نانو ذرات می‌باشند. به‌تازگی روش تولید زیستی به دلایلی مانند عدم نیاز به مصرف انرژی، عدم استفاده از مواد شیمیایی خطرناک و سازگاری با محیط‌زیست موردتوجه دانشمندان قرارگرفته است [۶]. در مطالعه حاضر تولید نانو ذرات نقره به‌وسیله عصاره آبی پیاز گیاه زعفران مورد بررسی قرار گرفت. زعفران گیاهی علفی، پایا و از تیره زنبقیان با نام علمی *Crocus sativus* می‌باشد. این گیاه از طریق پیاز تکثیر می‌یابد و دارای ساقه زیرزمینی مدور و توپر می‌باشد که در اصطلاح کشاورزان به پیاز و در گیاه‌شناسی به بنه یا corm موسوم است و از پوسته‌های فیبری قهوه‌ای رنگ پوشیده شده است. در سطح خارجی پیازهای بدون پوشش دوایر افقی به تعداد حدود ۸-۷ عدد مشاهده می‌شود که گره‌های ساقه زیرزمینی می‌باشند. مطالعات کمی از ترکیبات شیمیایی و بیوشیمیایی زعفران منتشر شده است. یکی از این گونه مطالعات بر روی تجزیه و تحلیلی که بر متابولیک‌های ثانویه به‌ویژه ترکیبات فنلی تمرکز دارد انجام شده است. این مولکول‌ها نقش‌های متعددی در فرآیند فیزیولوژی گیاهی از جمله محافظت از اشعه ماورای بنفش، دفاع در برابر پاتوژن‌ها، گیاه‌خواری و دوره کمون واکنش‌های آللوپاتی دارند. در پیاز زعفران ۳ ایزو آنزیم L-لاکتات دهیدروژناز شناسایی شدند که در آن‌ها از پتاسیم فری سیانید به‌عنوان گیرنده الکترون استفاده می‌شود [۷]. هدف از مطالعه حاضر بررسی تولید زیستی نانو ذرات نقره به‌وسیله عصاره پیاز زعفران بود. در ادامه اثر ضد باکتریایی نانو ذرات نقره با دو روش کیفی و کمی بررسی و درنهایت نیز پتانسیل جهش‌زایی نانو ذرات نقره به‌وسیله آزمون ایمز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه و عصاره آبی: در مطالعه حاضر پیاز گیاه زعفران از استان خراسان جنوبی تهیه شد. بدین منظور از پیازهایی استفاده شد که قابلیت کشت مجدد ندارند و به‌عنوان پسماند استفاده می‌شوند. پس از جداسازی پوست، مغز پیاز به قطعاتی در اندازه ۵ میلی‌متر خرد شد. سپس ۵۰ گرم از مغز پیاز در یک بشر ریخته و به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر اضافه شد. محلول تهیه شده روی شعله قرار گرفت و پس از رسیدن به دمای جوش ۳ دقیقه حرارت داده شد. پس از آن محلول به‌وسیله کاغذ صافی صاف‌شده و جهت نگهداری در یخچال و دمای ۴ درجه قرار گرفت.

بیوسنتز نانو ذرات نقره: به‌منظور تولید نانو ذرات نقره، ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره به ۹۰ میلی‌لیتر نیترات نقره ۱ میلی مولار اضافه شد و مخلوط در دمای اتاق و شرایط تاریکی قرار گرفت. تغییر رنگ محلول به قهوه‌ای تیره نشان دهنده تولید نانو ذرات نقره می‌باشد [۸].

بررسی تولید نانو ذرات: پس از تغییر رنگ محلول، تولید نانو ذرات نقره به‌وسیله روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۳۰۰ الی ۷۰۰ نانومتر و با رزولوشن ۲۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. همچنین نمونه حاوی نانو ذرات نقره به‌وسیله روش‌های XRD و TEM بررسی شد. جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی عبوری، ۲۵ میکرولیتر از محلول بر روی یک گرید مسی چکانده شد و عکس‌برداری در بزرگنمایی‌های مختلف به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی عبوری (Philips, Model EM-280) انجام شد. جهت انجام آزمون XRD نانو ذرات بر روی گرید مخصوص آزمون XRD قرارگرفته و آزمون به‌وسیله دستگاه (X'Pert Pro MPD) با زاویه اسکن 2θ و محدوده اسکن ۵ تا ۸۵ درجه انجام شد. همچنین ولتاژ استفاده شده ۴۰KV و جریان ۳۰ mA و جنس آند از مس بود. نرخ اسکن بر روی min-1/°2 تنظیم شد [۹ و ۱۰].

آزمون‌های ضد باکتریایی

آزمون Agar Well Diffusion: در مطالعه حاضر اثر ضد باکتریایی نانو ذرات نقره بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 66538)، اسنیتوباکتر بائومانی (ATCC 19606)، سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853) مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور انجام این آزمون ابتدا در هر پلیت از سوسپانسیون باکتری با غلظت معادل نیم مک فارلند و با استفاده از سواپ در سه جهت کشت انبوه داده شد. سپس با استفاده از ژل پانچر بر روی ژل، سه چاهک به شعاع ۵ میلی‌متر با فاصله ۱,۵ سانتی‌متر ایجاد شد. درون چاهک‌ها مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر یک از محلول‌های عصاره پیاز زعفران،

مجله طب انتظامی
بهار ۱۳۹۶- دوره ۶- شماره ۱- صفحات ۶۶-۵۷

نیترات نقره و نانو ذرات نقره تولید شده با استفاده از سمپلر ریخته شد. سپس پلیت ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد به‌وسیله کولیس اندازه‌گیری شد [۱۱].

بررسی حداقل غلظت مهاری: به این منظور از سویه‌های مورد آزمایش یک کشت ۱۸ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در محیط مولر هینتون براث تهیه شد. رقت‌های سریالی از نانو ذرات نقره و عصاره آبی پیاز زعفران با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد و ۷۰ میکرولیتر از هر یک به میکروتیتر بلیت‌های ۹۶ خانه‌ای که قبلاً حاوی ۷۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) بودند، اضافه گردید. سپس ۷۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل استاندارد ۰٫۵ مک فارلند به هر پلیت اضافه شد. درمجموع این آزمایش با حجم ۲۱۰ میکرولیتر در هر چاهک انجام شد. آزمایش‌ها مشابه برای کنترل مثبت (شامل محیط MHB و باکتری تحت تیمار) و کنترل منفی (شامل MHB و آب مقطر) بود. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه نگهداری شدند. اولین چاهک بدون کدورت به‌عنوان حداقل غلظت بازدارنده، به‌صورت µl/ml گزارش شد. تمام آزمایش‌ها حداقل برای سه بار تکرار شد و میانگین داده‌های به دست آمده، به‌عنوان نتایج MIC ارائه گردید. در آخر نیز نتایج به‌وسیله آزمون ANOVA یک طرفه مورد بررسی قرار گرفت [۱۲].

بررسی پتانسیل جهش‌زایی نانو ذرات نقره تولیدی

باکتری آزمون: در مطالعه حاضر از باکتری سالمونلا تیفی موریوم TA100 استفاده شد.

تأیید سویه باکتری: بدین منظور از کشت نوترینت براث شبانه استفاده شد. سویه‌های سالمونلا TA100 دارای یک جهش در ژن uvrB هستند و قادر به سنتز پروتئین سنتز دیواره سلولی (rfa) نمی‌باشند. همچنین سویه‌ها از لحاظ حضور فاکتور مقاومت به آمپی‌سیلین بررسی شدند. این آزمون یک نشانه جهت بررسی حضور پلاسمید R می‌باشد.

آزمون بررسی پتانسیل جهش‌زایی:

تهیه محیط آگار حداقل: به محلول آگار (۱٫۵ گرم آگار در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر) ۵ میلی‌لیتر محلول گلوکز و ۲ میلی‌لیتر نمک Vogel-Bonner افزوده شد. پس از همگن‌سازی به مدت ۹۰ دقیقه اتوکلاو شد. سپس به میزان کافی درون پلیت‌های کشت باکتری ریخته شد و زمان داده شد تا محیط کاملاً بسته شود.

آماده‌سازی محیط تاپ آگار: در هر لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری، به میزان ۱۰ میلی‌لیتر از محیط تاپ آگار تهیه شده افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. سپس لوله‌ها به بن ماری ۴۵ درجه منتقل شدند تا منعقد نشوند. نمونه‌های آزمایش به‌صورت زیر تهیه شدند:

نمونه شاهد مثبت شامل ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری، ۱۰۰ میکرولیتر محلول هیستیدین-بیوتین و ۱۰۰ میکرولیتر محلول سدیم آزید.

نمونه شاهد منفی شامل ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری، ۱۰۰ میکرولیتر محلول هیستیدتین- بیوتین و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر.

نمونه‌های مورد آزمایش در این آزمون شامل دوزهای ۳۱، ۱۵ و ۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانو ذرات بود. هر آزمون شامل ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری، ۱۰۰ میکرولیتر محلول هیستیدین-بیوتین و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های نانو ذرات نقره بود.

هر یک از لوله‌های تاپ آگار از بن ماری خارج و به روش بالا نمونه‌ها مخلوط و توسط دستگاه ورتکس همگن شدند و روی آگار حداقل موجود در پلیت‌های کشت افزوده شده و زمان داده شد تا منعقد شوند. سپس پلیت ها به انکوباتور منتقل شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. تعداد کلنی‌های باکتری‌های رشد یافته با استفاده از ابزار شمارنده کلنی شمارش و یادداشت شد [۱۳]. نرخ جهش‌زایی به‌وسیله فرمول زیر محاسبه شد:

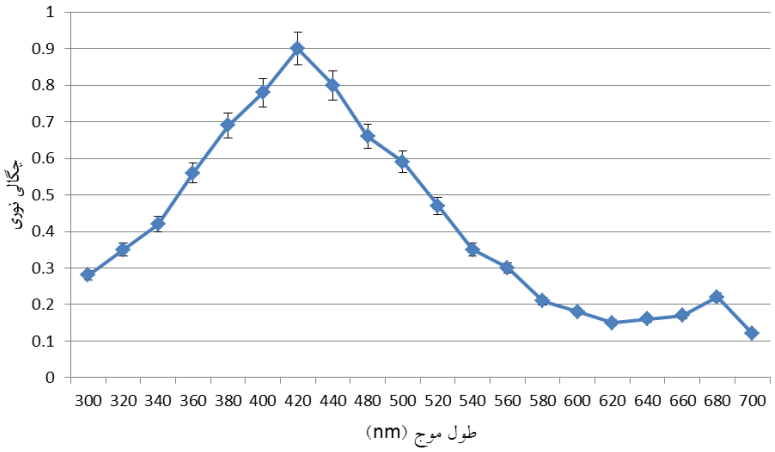
$$\text{نرخ جهش‌زایی} = \frac{\text{تعداد کلنی برگشتی‌های نمونه}}{\text{تعداد کلنی کنترل‌های منفی}}$$

اگر این نسبت بیش از ۲ باشد نشان دهنده جهش‌زا بودن نمونه است.

یافته‌ها

تغییر رنگ به قهوه‌ای پس از ۴۵ دقیقه در محلول مشاهده شد. تغییر رنگ محلول به قهوه‌ای تیره یکی از علائم تولید نانو ذرات نقره می‌باشد. شکل ۱ رنگ محلول را قبل و پس از تولید نانو ذرات نشان می‌دهد. پس از مشاهده تغییر رنگ، تولید نانو ذرات به‌وسیله روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حداکثر میزان جذب برای نانو ذرات تولیدی توسط عصاره پیاز زعفران در حدود ۴۲۰ نانومتر بود. نمودار ۱ میزان چگالی نوری نانو ذرات تولیدی توسط عصاره پیاز زعفران را در طول موج‌های بین ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر نشان می‌دهد.

Journal of Police Medicine
Spring 2017; Vol. 6, No. 1: 57-66

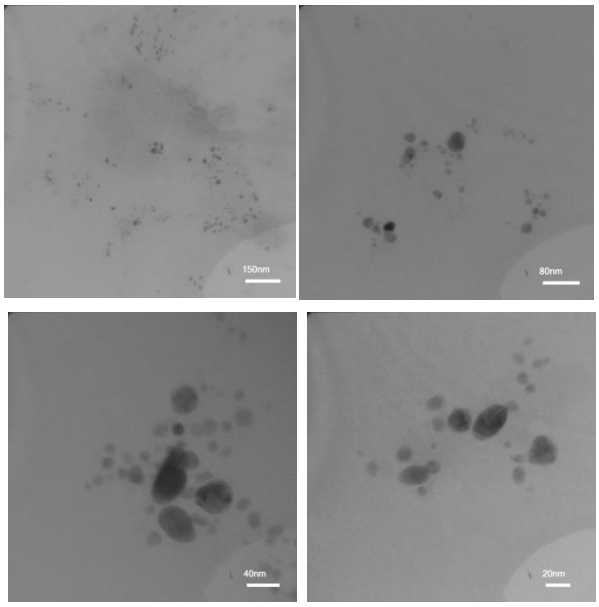


نمودار ۱: الگوی چگالی نوری نانو ذرات نقره تولیدی در طول موج‌های ۳۰۰ الی ۷۰۰ نانومتر



(ب) (الف)

شکل ۱: تصویر محلول واکنش عصاره آبی پیاز زعفران و نیترات نقره قبل از تولید شدن نانو ذرات نقره (الف) و پس از تولید شدن نانو ذرات (ب)



شکل ۲: تصویر گرفته شده از نانو ذرات با میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM

بررسی نتایج به‌وسیله تکنیک پراش پرتوی ایکس پنج پیک را در زوایای ۳۸,۱۲۶، ۴۴,۳۱۳، ۶۴,۴۶۴، ۷۷,۴۲۴ و ۸۱,۵۶۹ در 2θ نشان داد. زاویه پیک‌های به دست آمده، شدت آن‌ها و بررسی نمودار به دست توسط نرم‌افزار X'Pert Highscore plus وجود نانو ذرات نقره را در محلول تأیید کرد. همچنین نتایج پس از انطباق با پایگاه داده ICSD تأیید گردید. عکس‌های میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد که نانو ذرات تولید شده کروی و با اندازه‌ای در حدود ۵ الی ۲۵ نانومتر می‌باشند (شکل ۲). نتایج آزمون ایجاد چاهک در آگار تأثیر مناسب نانو ذرات تولید را بر روی هر سه باکتری نشان دادند در حالی که هیچ اثر ضد باکتری در مورد عصاره آبی پیاز زعفران مشاهده نشد (جدول ۱ و شکل ۳). در آزمون‌های آماری میان اثر نانو ذرات نقره بر روی سه باکتری مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

حداقل غلظت مهاری نانو ذرات بر روی استافیلوکوکوس اورئوس ۱۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر و برای سودوموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتر بائومانی ۶۳ میکرولیتر بر میلی‌لیتر تعیین شد .در بررسی نتایج آزمون ایمز، در تمامی غلظت‌های نانو ذرات مورد آزمایش هیچ‌گونه اثر جهش‌زایی مشاهده نشد (شکل ۴). نتایج این آزمون در جدول ۲ نشان داده شده است.

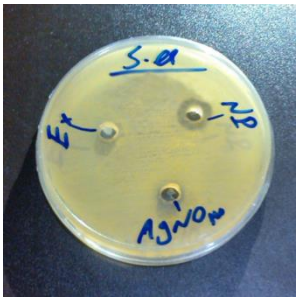
بحث و نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر زمان تولید نانو ذرات نقره توسط عصاره آبی پیاز زعفران ۴۵ دقیقه بود. این زمان در تحقیقاتی که بر روی تولید نانو ذرات نقره به‌وسیله گیاهان توسط سایر دانشمندان مورد بررسی قرارگرفته بود متفاوت است که احتمالاً به دلیل شرایط آزمایشگاهی مختلف موجود در زمان تولید نانو ذرات می‌باشد. برای مثال در مورد

مجله طب انتظامی
بهار ۱۳۹۶- دوره ۶- شماره ۱- صفحات ۶۶-۵۷

جدول ۱: نتایج آزمون ایجاد چاهک در آگار بر روی سه باکتری مورد آزمایش

نوع محلول مورد آزمایش	نام باکتری	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)			میانگین و انحراف معیار میانگین (Mean ± S.E.M)
		تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	
نانو ذرات نقره	استافیلوکوکوس اورئوس	۹	۸	۹	۸٫۶ ± ۰٫۵۷
عصاره پیاز زعفران	استافیلوکوکوس اورئوس	۵	۵	۵	۵ ± ۰۰
نیترات نقره	استافیلوکوکوس اورئوس	۵	۶	۵	۵٫۳ ± ۰٫۵۷
نانو ذرات نقره	اسنیتوباکتر	۹	۱۰	۹	۹٫۳ ± ۰٫۵۷
عصاره پیاز زعفران	اسنیتوباکتر	۵	۵	۵	۵ ± ۰۰
نیترات نقره	اسنیتوباکتر	۵	۵	۵	۵ ± ۰۰
نانو ذرات نقره	سودوموناس آئروژینوزا	۹	۹	۹	۹ ± ۰۰
عصاره پیاز زعفران	سودوموناس آئروژینوزا	۵	۵	۶	۵ ± ۰۰
نیترات نقره	سودوموناس آئروژینوزا	۶	۶	۵	۵٫۶ ± ۰٫۵۷



(الف)



(ج)



(ب)

شکل ۳: تصاویر آزمون ضد باکتریایی بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (الف)، سودوموناس آئروژینوزا (ب) و اسینتوباکتر بائومانی (ج)

تولید نانو ذرات نقره توسط گیاه آلوئه وِرا این زمان ۲۴ ساعت بود که بسیار بیشتر از زمان مشاهده شده در مطالعه حاضر می‌باشد [۱۴]. در مطالعه کریشناراج و همکارانش پس از ۳۰ دقیقه مجاورت عصاره آبی گیاه *آکالیپتا ایندیکا* با محلول نیترات نقره تغییر رنگ مشاهده شد. نتایج این تحقیق به نتیجه مطالعه حاضر نزدیک بود [۱۵]. همچنین کاویا و همکارانش در مطالعه خود زمان تولید نانو ذرات نقره را ۲۰ دقیقه اعلام کردند [۱۱].

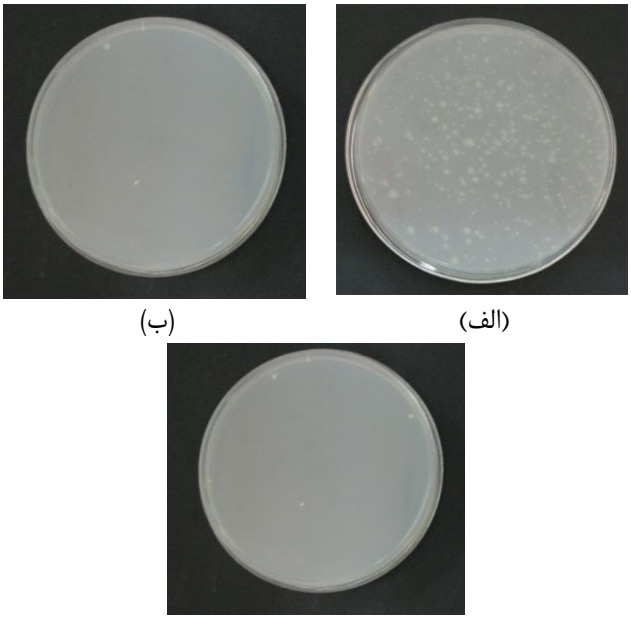
نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره آبی پیاز زعفران سرعت بالایی در کاهش یون‌های نقره و تولید نانو ذرات نقره داشت. سرعت بالا در تولید نانو ذرات نقره توسط عصاره آبی پیاز زعفران را می‌توان نتیجه وجود مولکول‌های بسیار مختلف با گروه‌های عاملی فعال در پیاز زعفران دانست.

همچنین با توجه به فراوانی پیاز زعفران به علت کشت بومی زعفران و استفاده از آن به‌عنوان محصول جانبی و بلااستفاده فراوری زعفران، می‌تواند به‌عنوان یک گزینه مناسب در تولید نانو ذرات به روش زیستی مطرح باشد. اما باید توجه داشت که این آزمایش در شرایطی مانند مطالعات قبلی انجام گرفته است و شاید توانست با تغییر شرایط واکنش موجب تسریع در سرعت و کیفت نانو ذرات تولیدی شد.

با استفاده از روش اسپکتروفتومتری به دلیل رزونانس پلاسمون سطحی ذرات، می‌توان تولید نانو ذرات نقره را در محیط پیگیری نمود. به دلیل وجود این خاصیت، نانو ذرات فلزی بسته به اندازه و شکل خود می‌توانند رنگ‌های متفاوتی را ساطع نمایند. این رنگ‌ها برای نانو ذرات نقره در محدوده زرد، نارنجی تا قهوه‌ای متفاوت است. به این ترتیب تغییر در رنگ محلول حاوی نانوذره نشان دهنده ایجاد تغییرات در رزونانس سطحی ذرات بوده و چنانچه محلول حاوی نانو ذرات یک فلز بتواند به مدت طولانی‌تری به‌صورت ثابت در همان دامنه رنگی اولیه خود باقی بماند، نشان دهنده یکنواخت بودن پراکندگی نانو ذرات و عدم ایجاد توده نانو ذرات در آن محلول است [۱۶ و ۱۷].

بنابراین در این تحقیق پس از ایجاد تغییر رنگ در محیط واکنش، بررسی اسپکتروفتومتری انجام شد که نانو ذرات نقره در طول موج ۴۲۰ نانومتر دارای حداکثر میزان جذب بوده‌اند. علاوه بر این، شدت

Journal of Police Medicine
Spring 2017; Vol. 6, No. 1: 57-66



(الف) (ب)

(ج)

شکل ۴: نتایج آزمون ایمز، شاهد مثبت (الف)، شاهد منفی (ب)، نمونه مورد آزمایش (ج)

جدول ۲: نتایج آزمون ایمز و نرخ جهش‌زایی نانو ذرات در غلظت‌های متفاوت

رقت‌ها	تعداد کلنی‌ها			میانگین	نرخ جهش‌زایی
	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم		
۳۱ µg/ml	۱	۱	۱	۱	۰٫۶۶
۱۵ µg/ml	۱	۰	۲	۱	۰٫۶۶
۷ µg/ml	۳	۱	۲	۲	۱٫۳۳
کنترل مثبت	۱۴۶	۱۲۱	۱۱۷	۱۲۸	–
کنترل منفی	۲	۰	۱	۱٫۵	–

جذب نیز معیاری مهم در میزان حضور نانو ذرات در محلول می‌باشد. شدت جذب بالاتر، نشان دهنده حضور نانو ذرات بیشتر در محلول است [۹]. بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی مشخص کرد اندازه نانو ذرات تولیدی بسیار متغیر بوده است. نانو ذرات تولید شده اندازه‌ای بین ۵ الی ۲۵ نانومتر داشتند. این نتیجه مطابق با نتیجه شانکار و همکارانش در تولید نانو ذرات نقره توسط گیاه *آزاریداکتا ایندیکا* بود. این گروه اندازه نانو ذرات را بین ۵ تا ۳۵ نانومتر و شکل آن‌ها را کروی گزارش کردند [۱۸].

شانکار و همکارانش در تحقیق دیگری اندازه نانو ذرات تولید شده با گیاه *پلارگونیوم گراوِلِنس* را ۱۶ تا ۴۰ نانومتر اعلام کردند [۱۸]. در تحقیقات کریشناراج و همکارانش اندازه نانو ذرات نقره تولید شده ۲۰ تا ۳۰ نانومتر بیان شد [۱۵]. چاندران در تحقیقات خود اندازه نانو ذرات نقره تولید شده را ۱۵ نانومتر بیان کرد [۱۴]. احمد و همکاران ابعاد نانو ذرات به دست آمده را حدود ۱۰ نانومتر بیان کردند [۹]. فیلیپ و اوونی نیز اندازه نانو ذرات تولید شده در تحقیقات خود را ۱۰ الی ۲۰ نانومتر بیان کردند [۱۹]. از سوی دیگر یونگ و کیم در تحقیقات خود به نتایجی متفاوت از یافته‌های فوق دست یافتند. آن‌ها که بر روی تولید نانو ذرات به‌وسیله پنج گیاه کار می‌کردند به نانو ذراتی با ابعاد ۱۵ تا ۵۰۰ نانومتر دست یافتند [۲۰]. در مطالعه حاضر مشخص شد نانو ذرات تولید شده توسط عصاره آبی پیاز گیاه زعفران اثر ضد میکروبی مناسبی بر روی هر سه باکتری مورد آزمایش داشت. نتایج در مورد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تقریباً یکسان بود و اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره در مورد هر سه باکتری مشهود بود. کاویا و همکارانش که اثر نانو ذرات تولید شده را بر روی باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* به روش آگار ول دیفیوژن بررسی نموده بودند به نتایج مشابهی دست یافتند اما نتایج این گروه نشان داد که هاله عدم رشد در استافیلوکوکوس اورئوس (۷٫۸ میلی‌متر) کوچک‌تر از اشرشیاکلی (۱۲٫۵ میلی‌متر) و سودوموناس آئروژینوزا (۱۱٫۷ میلی‌متر) است. کاویا و همکارانش بیان کردند که این فرضیه مطرح است که این مقاومت به علت دیواره پپتیدوگلیکان ضخیم‌تر در باکتری‌های گرم مثبت ایجاد می‌شود [۱۱]. همچنین ویراسمی و همکارانش در مطالعه خود اثر نانو ذرات تولید شده به‌وسیله گیاه جوز[1] را بر روی باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی کردند. قطر هاله عدم رشد در برای *اشرشیاکلی* ۱۵ میلی‌متر و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۰ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. نتایج این تحقیق کاملاً با نتایج کاویا و همکارانش متضاد بود [۲۱].

نتایج جاین و همکارانش در بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره تولید شده به‌وسیله گیاه پاپایا بر روی باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مشابه با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. آن‌ها

[1] Mangosteen

مجله طب انتظامی
بهار ۱۳۹۶- دوره ۶- شماره ۱- صفحات ۶۶-۵۷

اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره را بر روی هر دو باکتری یکسان ارزیابی کردند و این اثر را به تأثیر نانو ذرات نقره بر روی دیواره و غشای باکتری‌ها نسبت دادند [۲۲].

از فاکتورهای مهم برای یک ماده ضدباکتری آن است که بتواند در کمترین غلظت ممکن اثر مهاری یا کشندگی خود را بر باکتری‌ها اعمال نماید. به همین جهت در مطالعه حاضر این خصوصیت نانو ذرات تولیدی مورد آزمایش قرار گرفت و با اسانس گیاه مقایسه شد. در این مطالعه نانو ذرات نقره در رقت ۶۳ µl/ml مانع از رشد باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا واسینتو باکتر بائومانی و در رقت ۱۲۵ µl/ml مانع از رشد استافیلوکوکوس اورئوس شدند در حالی که عصاره پیاز زعفران در هیچ رقتی نتوانست مانع از رشد باکتری‌ها شود که این موضوع نشان از تأثیر نانو ذرات تولیدی در مواجهه با باکتری‌ها می‌باشد. گازمن و همکارانش در مطالعه‌ای که بر روی اثر ضد میکروبی نانو ذرات تولید شده به‌وسیله عوامل شیمیایی داشتند، حداقل غلظت مهارکننده برای نانو ذرات با اندازه حدود ۲۴ نانومتر را بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۵۸,۸۹ µg/ml اعلام نمودند که مقداری بالاتر از مطالعه حاضر می‌باشد [۲۳].

در مطالعه دیگری کاستنون و همکارانش حداقل غلظت مهارکننده برای نانو ذرات با اندازه حدود ۸۹ نانومتر را بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۳۳,۷۱ µg/ml اعلام نمودند که به میزان MIC به دست آمده در مطالعه حاضر نزدیک می‌باشد [۲۴].

سینگهال و همکارانش در مطالعه خود اثر ضدباکتری نانو ذرات تولیدی توسط عصاره گیاه *Ocimum sanctum* را بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی نمودند. این گروه حداقل غلظت مهاری این نانو ذرات را ۱,۲۵ µg/ml اعلام نمودند که نسبت به مطالعه حاضر میزان پایین‌تری می‌باشد [۲۵].

اختلاف در مقادیر MIC می‌تواند مربوط به قطر نانو ذرات، غلظت و نوع آن باشد. هر نوع از نانو ذرات با توجه به ویژگی‌هایی مانند اندازه، شکل، نوع ترکیب سورفکتانت، پایدارکننده و روش تهیه، منحصر به خود هستند و این ویژگی‌های نانو ذرات بر خاصیت ضدمیکروبی آن‌ها اثر می‌گذارد. در منابع مختلف اثر ضد باکتریایی نانو ذرات نقره به ناپایدار کردن پتانسیل غشایی (که نتیجه آن کاهش سطح آدنوزین تری فسفات درون‌سلولی است)، اتصال به گروه‌های عاملی پروتئین‌ها، (از بین رفتن خواص اصلی پروتئین‌ها و آنزیم‌ها) نفوذ به درون سلول‌ها، غیرفعال کردن آنزیم‌ها و تولید هیدروژن پراکسید و درنهایت مرگ باکتری نسبت داده شده است [۲۶ و ۲۷].

نکته دیگری که در مورد اکثر مطالعاتی که در مورد بررسی بیوسنتز نانو ذرات و اثر ضد باکتری آن‌ها وجود دارد این است که در این مطالعات غلظت نانو ذرات در واحد حجم اندازه‌گیری نشده است و این موضوع مقایسه اثر ضد میکروبی و میزان MIC را میان تحقیقات مختلف با مشکل مواجه می‌سازد. با این وجود نکته مهم و قابل‌توجه در تمامی مطالعات این است که نانو ذرات تولیدی در غلظت‌های بسیار پایین و حتی گاهی کمتر از آنتی‌بیوتیک‌ها قادر به مهار رشد باکتری‌ها می‌باشند و این موضوع استفاده از آن‌ها را در علم پزشکی در آینده امری محتمل می‌سازد.

در مطالعه حاضر هیچ‌گونه اثر جهش‌زایی از نانو ذرات نقره تولیدی مشاهده نشد. لی و همکارانش در مطالعه‌ای اثر جهش‌زایی نانو ذرات نقره را بر روی سویه‌های سالمونلا TA98، TA100، TA102، TA1537 و TA1535 مورد بررسی قرار دادند. این گروه اثر نانو ذرات نقره را همراه و بدون محلول میکروزوم کبد موش بر روی باکتری‌های فوق بررسی نمودند. نتایج این گروه به نتایج مطالعه حاضر شبیه بود و نانو ذرات نقره در هیچ رقتی اثر جهش‌زایی از خود نشان ندادند [۱۳].

کیم و همکارانش در مطالعه‌ای دیگر اثر جهش‌زایی نانو ذرات نقره با اندازه ۴۰ الی ۵۹ نانومتر را بر روی سویه‌های سالمونلا TA98، TA100، TA1537 و TA1535 بررسی نمودند. این گروه نیز در مشاهدات خود بیان نمودند که نانو ذرات نقره هیچ‌گونه اثر جهش‌زایی بر روی سویه‌های مورد آزمایش ندارند که این نتایج نیز به نتایج مطالعه حاضر شبیه می‌باشد [۲۸].

همچنین کیم و همکارانش در مطالعه‌ای دیگر بیان نمودند که نانو ذرات نقره در آزمون ایمز هیچ‌گونه اثر جهش‌زایی در هیچ‌یک از رقت‌ها از خود نشان نمی‌دهند که با نتایج آزمون حاضر مشابهت داشت [۲۹].

در مطالعه حاضر با تولید نانو ذرات نقره توسط عصاره آبی پیاز زعفران مشاهده شد که خاصیت ضد باکتریایی این عصاره به شکل چشمگیری افزایش یافت. با توجه به این موضوع، تحقیق حاضر منجر به افزایش اثر ضد باکتریایی و درنتیجه افزایش اثر عفونت‌زدایی این عصاره شد. از طرفی با توجه به کاربرد فراوان نانو ذرات نقره در بخش درمان چنانچه بتوان نتیجه حاصل از این تحقیق را به سایر خواص این گیاه

Journal of Police Medicine
Spring 2017; Vol. 6, No. 1: 57-66

افزود، می‌توان راهی را جهت ارتقاء طب سنتی ایجاد و پیوندی را میان طب سنتی و مدرن برقرار نمود.

منابع

1. Matei A, Cernica I, Cadar O, Roman C, Schiopu V. Synthesis and characterization of ZnO-polymer nanocomposites. The International Journal of Material Forming. 2008;1:767-70.
2. Gajjar P, Pettee B, Britt DW, Huang W, Johnson WP, Anderson AJ. Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe, Pseudomonas putida KT2440. Journal of Biological Engineering. 2009;3(1):9.
3. Padmavathy N, Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. Science and Technology of Advanced Materials. 2008;9(3):035004.
4. Wahab R, Kim YS, Mishra A, Yun SI, Shin HS. Formation of ZnO micro-flowers prepared via solution process and their antibacterial activity. Nanoscale research letters. 2010;5(10):1675.
5. Sobha K, Surendranath K, Meena V, Jwala KT, Swetha N, Latha KSM. Emerging trends in nanobiotechnology. Journal of Biotechnology and Molecular Biology Reviews. 2010;5:1-12.
6. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2010;6(2):257-62.
7. Caballero-Ortega H, Pereda-Miranda R, Abdullaev FI. HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (Crocus sativus L.) sources. Food Chemistry. 2007;100(3):1126-31.
8. Jacob SJ, Finub JS, Narayanan A. Synthesis of silver nanoparticles using Piper longum leaf extracts and its cytotoxic activity against Hep-2 cell line. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2012;91:212-4.
9. Ahmad N, Sharma S, Alam MK, Singh VN, Shamsi SF, Mehta BR, Fatma A. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2010;81(1):81-6.
10. Jha AK, Prasad K, Prasad K, Kulkarni AR. Plant system: nature's nanofactory. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2009 Oct 15;73(2):219-23.
11. Kaviya S, Santhanalakshmi J, Viswanathan B, Muthumary J, Srinivasan K. Biosynthesis of silver nanoparticles using Citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2011;79(3):594-8.
12. Marchiò C, Reis-Filho JS. Molecular diagnosis in breast cancer. Diagnostic histopathology. 2008;14(5):202-13.
13. Li Y, Chen DH, Yan J, Chen Y, Mittelstaedt RA, Zhang Y, Biris AS, Heflich RH, Chen T. Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2012;745(1):4-10.
14. Chandran SP, Chaudhary M, Pasricha R, Ahmad A, Sastry M. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloevera plant extract. Biotechnology progress. 2006;22(2):577-83.
15. Krishnaraj C, Jagan EG, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan PT, Mohan N. Synthesis of silver nanoparticles using Acalypha indica leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2010;76(1):50-6.
16. Böer KW. Survey of semiconductor physics. New York: Wiley; 2002.
17. Kittel C. Introduction to solid state physics. New York: John Wiley & Sons; 2005.
18. Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (Azadirachta indica) leaf broth. Journal of colloid and interface science. 2004;275(2):496-502.
19. Philip D, Unni C. Extracellular biosynthesis of gold and silver nanoparticles using Krishna tulsi (Ocimum sanctum) leaf. Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures. 2011;43(7):1318-22.
20. Song JY, Kim BS. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. Bioprocess and biosystems engineering. 2009;32(1):79.

مجله طب انتظامی
بهار ۱۳۹۶- دوره ۶- شماره ۱- صفحات ۶۶-۵۷

21. Veerasamy R, Xin TZ, Gunasagaran S, Xiang TFW, Yang EFC, Jeyakumar N, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. Journal of Saudi Chemical Society. 2011;15(2):113-20.

22. Jain D, Daima HK, Kachhwaha S, Kothari SL. Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their anti microbial activities. Digest journal of nanomaterials and biostructures. 2009;4(3):557-63.

23. Guzmán MG, Dille J, Godet S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. Int J Chem Biomol Eng. 2009;2(3):104-11.

24. Martinez-Castanon GA, Nino-Martinez N, Martinez-Gutierrez F, Martinez-Mendoza JR, Ruiz F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. Journal of Nanoparticle Research. 2008;10(8):1343-8.

25. Singhal G, Bhavesh R, Kasariya K, Sharma AR, Singh RP. Biosynthesis of silver nanoparticles using Ocimum sanctum (Tulsi) leaf extract and screening its antimicrobial activity. Journal of Nanoparticle Research. 2011;13(7):2981-8.

26. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Journal of biomedical materials research. 2000;52(4):662-8.

27. Mirjalili M, Yaghmaei N, Mirjalili M. Antibacterial properties of nano silver finish cellulose fabric. Journal of Nanostructure in Chemistry. 2013;3(1):43.

28. Mirjalili M, Yaghmaei N, Mirjalili M. Antibacterial properties of nano silver finish cellulose fabric. Journal of Nanostructure in Chemistry. 2013;3(1):43.

29. Kim JS, Song KS, Sung JH, Ryu HR, Choi BG, Cho HS, Lee JK, Yu IJ. Genotoxicity, acute oral and dermal toxicity, eye and dermal irritation and corrosion and skin sensitisation evaluation of silver nanoparticles. Nanotoxicology. 2013;7(5):953-60.