Journal of Medicinal Plants Biotechnology

JMPB

Original Article

Bioformulation of silver nanoparticles using *Nigella arvensis* leaf extract with Potential Bioactivity against *Klebsiella pneumonia*

Azam Chahardoli*

1.Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran

ARTICLEINFO

Article history

Submitted: 2021-06-16
Revised: 2021-08-03
Accepted: 2021-09-29

KEYWORDS

Antibacterial activity; Antibiotic resistance; bioformulation; Klebsiella pneumonia

ABSTRACT

The formulation of nanoparticles mediated medicinal plant extract is cost-effective, eco-friendly, stable and quicker than conventional methods. These nanoparticles particularly bioformulated silver nanoparticles (AgNPs) using plant extracts are the most effective against bacteria. Therefore, in the present study, we determined the antibacterial activity of *Nigella arvensis*-derived AgNPs (Na-AgNPs) against an antibiotic resistance *Klebsiella pneumonia* using agar well diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC). According to results, the bioformulated Na-AgNPs showed a maximum inhibition zone of 14 mm and MIC value of 15.62 µg/mL against *K. pneumonia*. Therefore, bioformulated Na-AgNPs as an alternative to chemical antibacterial agents can be used to manage of infections in medicine and other industries.

* Corresponding author: ***Azam Chahardoli***

✉ E-mail: : *a.chahardoli@razi.ac.*ir

Journal homepage:

مجله زیست فناوری گیاهان دارویی

JMPB

مقاله پژوهشی

فرمولاسیون زیستی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره برگ گیاه سیاه‌دانه دشتی با قابلیت زیست فعالی در برابر کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumonia*)

اعظم چهاردولی*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

چکیده

فرمولاسیون نانوذرات با واسطه عصاره گیاهان دارویی نسبت به روش های مرسوم، روشی مقرون به صرفه، سازگار با محیط زیست، پایدار و سریعتر می باشد. این نانوذرات، به‌ویژه نانوذرات نقره تشکیل شده از عصاره‌های گیاهی، مؤثرترین نانوذرات در برابر باکتری‌ها هستند. بنابراین، در مطالعه حاضر، فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره مشتق شده از گیاه سیاه‌دانه دشتی (*Nigella arvensis*) در برابر یک باکتری مقام به آنتی‌بیوتیک یعنی کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumonia*) با استفاده از روش انتشار چاهک و حداقل غلظت مهاری (MIC) تعیین گردید. با توجه به نتایج، نانوذرات نقره فرموله شده حداکثر منطقه بازدارندگی رشد برابر با ۱۴ میلی‌متر و حداقل غلظت مهاری برابر با ۱۵/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر را در برابر باکتری *کلبسیلا پنومونیه* نشان دادند. بنابراین، این نانوذرات نقره زیست فرموله به عنوان یک جایگزین مناسب در برابر عوامل ضد باکتریایی شیمیایی می‌توانند برای مدیریت عفونت‌ها در پزشکی و سایر صنایع مورد استفاده قرار گیرند.

اطلاعات مقاله

تاریخ

دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۶
بازنگری: ۱۴۰۰/۰۴/۰۸
پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۵

کلید واژه

فعالیت ضد باکتریایی، مقاومت آنتی بیوتیکی، فرمولاسیون زیستی، باکتری کلبسیلا پنومونیه.

* *نویسنده مسئول:* **اعظم چهاردولی**

ایمیل: a.chahardoli@razi.ac.ir

آدرس اینترنتی: *mpb.znu.ac.ir*

مقدمه

افزایش عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی در اثر پاتوژن‌های باکتریایی مقاوم به چند دارو[1] که درمان آنتی بیوتیکی فعلی بر آنها بی‌اثر است، نشان دهنده یک مشکل درحال رشد اساسی است. بنابراین، مقاومت ضد میکروبی یکی از تهدیدهای اصلی برای سلامت انسان می‌باشد، زیرا تعیین کننده افزایش عوارض و مرگ و میر ناشی از شایع‌ترین بیماری‌های باکتریایی است (Franci et al., 2015). کلبسیلا پنومونیه یک باکتری گرم منفی از خانواده انترباکتریاسه است که باعث پنومونی، بیماری شدید و مرگ و میر ناشی از نفوذ شدید نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها و آسیب شدید ریه‌ها است. مقاومت این باکتری به آنتی بیوتیک‌ها سلامت انسان را تهدید می‌کند (Naseer et al., 2021). بنابراین برای جلوگیری از این مشکل، نیازمند به عوامل ضد میکروبی جدیدی است که قادر به مهار رشد طیف وسیعی از این باکتری های مقاوم به دارو باشد. امروزه، استفاده از فناوری نانو می‌تواند یک جایگزین مناسب و امیدوارکننده جدید در توسعه عوامل ضد میکروبی مؤثر در برابر روش‌های رایج باشد.

فعالیت ضد میکروبی نانوذرات از مکانیسم بسیار متفاوتی در مقایسه با آنتی بیوتیک‌ها ناشی می‌شود. فرض بر این است که مساحت سطح نانوذرات یک جزء اصلی در فعالیت آنها است اما این فاکتور در یک نوع نانوذره نسبت به دیگری متفاوت است (Salayová et al., 2021). در میان نانوذرات سنتز شده، نانوذرات نقره به عنوان عوامل ضد باکتریایی امیدبخش با تاکید بر خاصیت باکتری کشی آنها در نظر گرفته می‌شوند. اخیراً نانوذرات نقره به روش سبز با استفاده از گونه‌های مختلف گیاهی سنتز شده‌اند که یک جایگزین نویدبخش در برابر روش‌های شیمیایی خطرناک است. سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره‌های گیاهی در مقایسه با روش‌های شیمیایی و سایر روش‌های سنتز دارای مزایای متعددی است، زیرا این روش سازگار با محیط زیست، آسان، مقرون به صرفه با سمیت کم، عملکرد بالا و بازده انرژی بالا است (Alharbi et al., 2022). ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در

[1] Multidrug-Resistant (MDR)

گیاهان از جمله آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ایریدوئیدها، ساپونین‌ها، ترپنوئیدها، پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و سایر پلی‌فنول‌ها، نقش اساسی در سنتز سبز نانوذرات به‌عنوان عوامل احیاءکننده، پوشاننده و تثبیت‌کننده ایفا می‌کنند. بنابراین، مطالعه حاضر عمدتاً بر ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات فرموله شده نقره با استفاده از ترکیبات زیست فعال عصاره آبی برگ گیاه سیاه‌دانه دشتی به عنوان یک گیاه دارویی قوی با فعالیت بیولوژیکی عالی در برابر باکتری مقاوم به داروی کلبسیلا پنومونیه متمرکز شده است.

مواد و روش‌ها

محیط کشت آگاری مولر هینتون و براث مولر هینتون از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شد. باکتری مقاوم به داروی کلبسیلا پنومونیه از آزمایشگاه میکروبیولوژی مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه شد.

تهیه نانوذرات نقره ازعصاره برگ گیاه

همان‌طور که در مقاله قبلی منتشر شده توضیح داده ایم، نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه سیاه‌دانه دشتی به عنوان عوامل آحیاء کننده و تثبیت کننده/پوشاننده با قرار گرفتن در معرض نور خورشید بیوسنتز شدند. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی تعیین شده، تشکیل نانوذرات فرموله شده را تایید کردند. ساختار کریستالی، گروه‌های عاملی درگیر در واکنش، اندازه و شکل نانوذرات فرموله شده با استفاده از آنالیزهای طیف سنجی UV-vis، طیف‌سنجی پراش اشعه ایکس (XRD)، طیف‌سنجی تبدیل فوریه‌ی مادون قرمز (FT-IR) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مشخص شدند. اطلاعات دقیق تر در مقاله قبلی ما موجود است (Chahardoli et al., 2018).

تخمین فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره فرموله شده با روش انتشارچاهک

در مطالعه حاضر، فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره زیست فرموله شده در برابر باکتری مقاوم به داروی کلبسیلا پنومونیه با استفاده از روش انتشار چاهک آزمایش شد .برای این منظور سوسپانسیون باکتریایی از کلبسیلا پنومونیه در غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ واحد کلنی بر میلی‌لیتر (CFU/mL) تهیه و به طور یکنواخت روی محیط کشت مولر هیلتون آگار

کشت شد. بر روی سطح آگار در پتری‌دیش، چاهک‌هایی با اندازه ۶ میلی‌متر ایجاد شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نانوذرات نقره زیست فرموله شده در هر چاهک ریخته شد. پلیت آماده شده در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در یک انکوباتور قرار گرفت. پس از گذشت زمان انکوباسیون، ناحیه مهار یا منطقه بازدارندگی رشد با کمک یک خط‌کش اندازه‌گیری شد.

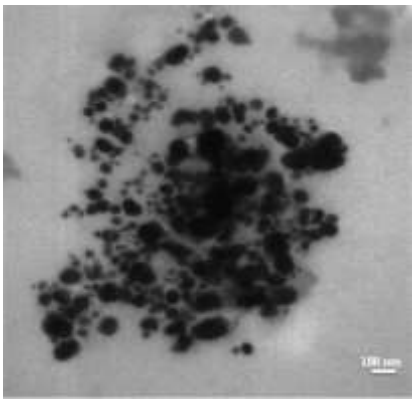
ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی به روش حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC[1])

روش استاندارد میکرودایلوشن (Microdilution) برای بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری‌های توسط نانوذرات نقره زیست فرموله شده به کار گرفته‌شد. سوسپانسیون باکتریایی از باکتری مقاوم به داروی کلبسیلا پنومونیه با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/mL آماده شده و به داخل چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. سپس، ۵۰ میکرولیتر از نانوذرات بیوسنتزی نقره بصورت سریالی به داخل چاهک‌ها اضافه شد. این پلیت آماده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در یک انکوباتور اینکوبه شد. با تجزیه و تحلیل تغییرات رنگ در چاهک‌های کشت شده، مقدار MICدر کمترین غلظت محاسبه گردید.

نتایج و بحث

در کار حاضر، فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره فرموله شده از گیاه سیاه‌دانه دشتی در برابر باکتری مقام به داروی کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات مورد استفاده در این مطالعه، قبلاً با استفاده از عصاره برگ گیاه سیاه‌دانه دشتی در آزمایشگاه ما فرموله و مشخصه‌یابی شدند. تشکیل این نانوذرات در آزمایشگاه با تغییر رنگ آنی و تبدیل رنگ به قهوه‌ای تیره و طیف‌سنجی مرئی UV تأیید شد که حداکثر جذب را در ۴۱۶ نانومتر نشان داد. طیف سنجی XRD ساختار بلوری نانوذرات را نشان داد. تصاویر TEM نشان داد که نانوذرات نقره ناهمسانگرد و عمدتاً کروی با اندازه‌هایی در محدوده ۵ تا ۱۰۰ نانومتر هستند (شکل ۱). آنالیز FTIR، نقش فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و گروه‌های فنلی موجود در عصاره برگ گیاه‌سیاه‌دانه دشتی در احیاء و تثبیت نانوذرات نقره را ثابت کرد (Chahardoli et al., 2018).

[1] Minimum Inhibitory Concentration



شکل ۱. تصویر TEM از نانوذرات نقره عمدتا کروی زیست فرموله شده از گیاه سیاه‌دانه دشتی.

برای سنجش فعالیت ضد باکتریایی این نانوذرات، قطر منطقه بازدارندگی (میلی‌متر) در اطراف چاهک‌های آغشته به نانوذرات نقره حاصل در برابر سویه آزمایشی تعیین شد. منطقه بازدارندگی رشد برابر با ۱۴ میلی‌متر بود. این نتیجه نشان‌دهنده فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره فرموله شده از گیاه سیاه‌دانه دشتی را در برابر باکتری مقام به داروی کلبسیلا پنومونیه نشان داد. غلظت MIC از نانوذرات زیست فرموله شده در برابر باکتری مورد مطالعه برابر با ۱۵/۶۲ میکروگرم در میلی‌لیتر تخمین زده شد که نشان می‌دهد نانوذرات نقره فرموله شده به شدت تکثیر و رشد این نوع مقام کلبسیلا پنومونیه را سرکوب می‌کند. علاوه بر این، عصاره برگ گیاه سیاه‌دانه دشتی، مقدار MIC برابر با ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر را در برابر این سویه نشان داد. با این حال، نانوذرات نقره زیست فرموله شده فعالیت ضد باکتریایی بیشتری را در مقایسه با عصاره برگ گیاه مورد مطالعه نشان داد که ممکن است به دلیل اندازه کوچک و مساحت سطح بزرگ‌تر نانوذرات حاصل باشد. نتایج مشابهی توسط Alharbi و همکارش به دست آمد که فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره یک گیاه *Neurada procumbens* با اندازه ذرات در محدوده ۲۰-۵۰ نانومتر در برابر باکتری مقاوم به داروی کلبسیلا پنومونیه گزارش کردند (Alharbi and Alarfaj, 2020). علاوه بر این در مطالعه دیگری، یاسین و همکاران (۲۰۲۲)، کارایی ضد میکروبی نانوذرات نقره فرموله شده از عصاره برگ گیاه *Origanum majorana* با اندازه تقریبا ۲۶/۶۳ نانومتر را در برابر سویه کلبسیلا پنومونیه در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر هر دیسک، با مناطق بازدارنگی رشد به ترتیب ۲۱/۵۵ و ۲۴/۵۶ میلی‌متر با مقدار MIC با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند (Yassin et al., 2022). نتایج این تحقیق، فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات فرموله شده با استفاده از گیاه‌سیاه‌دانه دشتی را تایید کرد. پاسخ‌های مختلف باکتری مقاوم به داروی کلبسیلا پنومونیه در برابر نانوذرات نقره حاصل در مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از اثرات عوامل مختلفی از جمله اندازه و شکل نانوذرات، منبع و انواع متفاوت عوامل احیاءکننده و

تثبیت کننده یا پوشش‌دهنده، CFU اولیه سویه‌های باکتریایی و منشاء میکروارگانیسم‌ها باشد (Chahardoli et al., 2018). نانوذرات نقره یک شیوه عملکردی چند سطحی را در برابر سلول‌های باکتریایی نشان دادند که بر فرآیندهای متابولیک آنها موثر است از جمله: الف) اختلال در دیواره سلولی و غشاء و افزایش نفوذپذیری سلول، ب) نفوذ نانوذرات نقره و آسیب درون سلولی که مسیرهای متابولیک را مختل می‌کند، ج) آسیب به بیومولکول‌ها مانند DNA و پروتئین ها، و د) تولید گونه های اکسیژن فعال و و در نهایت کاهش حیات و زنده مانی باکتری می‌باشد (Vazquez-Muñoz et al., 2019). با توجه به فعالیت ضد باکتریایی عالی نانوذرات نقره زیست فرموله شده از گیاه سیاه‌دانه دشتی در مطالعه حاضر، این نانوذرات می‌توانند به عنوان یک عامل ضدباکتری جدید در صنایع پزشکی و غذایی علیه باکتری مقاوم به داروی کلبسیلا پنومونیه و سایر گونه های باکتریایی استفاده شوند.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، از نانوذرات نقره زیست فرموله شده از عصاره آبی برگ گیاه سیاه‌دانه دشتی به عنوان یک ماده غیر سمی، مقرون به صرفه و زیست سازگار برای سنجش فعالیت ضدباکتریایی آنها در برابر باکتری مقاوم به داروی کلبسیلا پنومونیه استفاده شد. با توجه به نتایج بدست‌آمده از آزمایش آنتی‌باکتریایی با روش‌های انتشار چاهک وMIC ، نانوذرات نقره زیست فرموله شده، فعالیت ضدباکتریایی عالی را در برابر باکتری مقاوم به داروی کلبسیلا پنومونیه نشان دادند. بنابراین، این نانوذرات زیست فرموله شده با استفاده از عصاره گیاه سیاه‌دانه دشتی به عنوان یک عامل باکتری کش قوی می‌تواند جایگزین نوید بخشی بجای آنتی‌بیوتیک-های رایج و سنتی برای کنترل عفونت‌ها در صنایع پزشکی و غذایی باشد.

ملاحظات اخلاقی:

قدردانی: از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

تعارض منافع: طبق اظهار نویسنده، این مقاله تعارض منافع ندارد.

برگرفته از پایان نامه/رساله: این مقاله برگرفته از پایان نامه/رساله نبوده است.

منابع

- Alharbi, F.A., Alarfaj, A.A., (2020). Green synthesis of silver nanoparticles from Neurada procumbens and its antibacterial activity against multi-drug resistant microbial pathogens. J. King Saud Univ. 32, 1346–1352.
- Alharbi, N.S., Alsubhi, N.S., Felimban, A.I., (2022). Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plants: Characterization and application. J. Radiat. Res. Appl. Sci. 15, 109–124.
- Chahardoli, A., Karimi, N., Fattahi, A., (2018). Nigella arvensis leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles: Their characteristic properties and biological efficacy. Adv. Powder Technol. 29, 202–210. https://doi.org/10.1016/j.apt.2017.11.003
- Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., Galdiero, M., (2015). Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. Molecules 20, 8856–8874.
- Naseer, M., Ramadan, R., Xing, J., Samak, N.A., (2021). Facile green synthesis of copper oxide nanoparticles for the eradication of multidrug resistant Klebsiella pneumonia and Helicobacter pylori biofilms. Int. Biodeterior. Biodegradation 159, 105201.
- Salayová, A., Bedlovičová, Z., Daneu, N., Baláž, M., Lukáčová Bujňáková, Z., Balážová, Ľ., Tkáčiková, Ľ., (2021). Green synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity using various medicinal plant extracts: Morphology and antibacterial efficacy. Nanomaterials 11, 1005.
- Vazquez-Muñoz, R., Meza-Villezcas, A., Fournier, P.G.J., Soria-Castro, E., Juarez-Moreno, K., Gallego-Hernández, A.L., Bogdanchikova, N., Vazquez-Duhalt, R.,

Huerta-Saquero, A., (2019). Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. PLoS One 14, e0224904.

- Yassin, M.T., Mostafa, A.A.-F., Al-Askar, A.A., Al-Otibi, F.O., (2022). Facile green synthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extract of Origanum majorana with potential bioactivity against multidrug resistant bacterial strains. Crystals 12, 603