

اثرات باکتری‌کشی نانوذرات نقره بیوسنتزی از یک گیاه دارویی علیه یک باکتری مقاوم به چند دارو اسینتوباکتر بومانی (*Acinetobacter baumannii*)

اعظم چهاردولی*

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

*نویسنده مسئول، ایمیل: a.chahardoli@razi.ac.ir

چکیده

سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها باعث عفونت‌های جدی می‌شوند که می‌تواند منجر به افزایش میزان مرگ‌ومیر، بستری طولانی مدت در بیمارستان و خسارات مالی شود. یافتن عوامل باکتری‌کش جدید علیه این باکتری‌ها، یک نگرانی حیاتی است. نانوذرات نقره به عنوان یک عامل ضد باکتریایی عالی می‌تواند نقش موثری در برابر این باکتری‌ها ایفا کند. بنابراین، در مطالعه حاضر، نانوذرات نقره بیوسنتز شده با استفاده از جوشانده برگ گیاه بومی زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschy* Boiss) برای ارزیابی اثرات باکتری‌کشی آن‌ها در برابر یک باکتری مقاوم به چند دارو یعنی اسینتوباکتر بومانی (*Acinetobacter baumannii*)، یک سویه گرم منفی مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، حداکثر ناحیه مهارکنندگی رشد باکتری مورد مطالعه برابر با ۱۶ میلی‌متر و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) نانوذرات نقره بیوسنتز شده برابر با ۱۵/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر در برابر باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک اسینتوباکتر بومانی بود. بنابراین، نانوذرات نقره بیوسنتز شده به عنوان یک ماده جایگزین مقرون به صرفه، سازگار با محیط زیست و ایمن با اثر ضد باکتریایی قوی می‌تواند در زمینه‌های مختلف مانند صنایع پزشکی و غذایی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: اسینتوباکتر بومانی، اثرات باکتری‌کشی، بیوسنتز، نانوذرات نقره.

مقدمه

استفاده از نانوذرات نقره به عنوان عوامل ضد باکتریایی نسبت به آنتی بیوتیک‌های معمولی مزایای بیشتری به همراه دارد زیرا این نانوذرات از مکانیسم‌های ضد باکتریایی چند وجهی استفاده می‌کنند و بنابراین امکان رشد و ایجاد مقاومت باکتریایی وجود ندارد (Pelgrift and Friedman, 2013). روش‌های مختلفی برای سنتز نانوذرات نقره گزارش شده است. بسیاری از این رویکردها گران هستند، به انرژی بالا نیاز دارند و شامل استفاده از پیش‌سازهای خطرناک و تولید محصولات جانبی سمی هستند (Chahardoli et al., 2018). بنابراین، استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی معمول به دلایل ذکر شده می‌تواند برای سلامتی انسان و محیط‌های زیستی را به همراه داشته باشد. اخیراً استفاده از مواد گیاهی برای سنتز سبز نانوذرات به عنوان پیش‌سازهای ارزان، آسان و مؤثر برای کاربردهای ضد میکروبی مورد توجه قرار گرفته است. نانوذرات نقره بیوژنیک اثر ضد باکتریایی بالاتری در برابر پاتوژن‌های انسانی نسبت به نمونه‌ها و نانوذرات تولید شده از طریق روش‌های شیمیایی نشان می‌دهند (Yassin et al., 2022). گزارش شده است که زرین گیاه یا بادرنجوبه دنیایی (*Dracocephalum kotschy* Boiss) از خانواده نعنائیان، سرشار از ترکیبات فنلی است که می‌تواند به عنوان عوامل احیاءکننده نیترات نقره در جهت بیوسنتز نانوذرات نقره عمل کند. بر این اساس در مطالعه حاضر، نانوذرات نقره بیوسنتز شده با استفاده از جوشانده آبی برگ زرین گیاه برای ارزیابی اثرات باکتری‌کشی آن‌ها بر علیه باکتری اسپینتوباکتر بومانی به عنوان یک پاتوژن مقاوم به چند دارو مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد مورد نیاز

سوش باکتریایی اسپینتو باکتر بومانی از آزمایشگاه میکروبیولوژی مرکز تحقیقات عفونت بیمارستانی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه شد. محیط کشت آگاری و برات مولر هینتون از شرکت سیگما آلد ریچ خریداری شد.

بیوسنتز نانوذرات نقره از جوشانده برگ زرین گیاه

اسپینتوباکتر بومانی یک کوکوباسیل گرم منفی هوازی است و بدون شک یکی از موفق‌ترین پاتوژن‌های مسئول عفونت‌های بیمارستانی در سیستم سلامت مدرن است. با توجه به شیوع و بروز عفونت‌های ایجاد شده توسط اسپینتو-باکتر بومانی مقاوم به چند دارو، آنتی‌بیوتیک‌های کمی برای درمان عفونت‌های ناشی از این پاتوژن عمل می‌کنند. اسپینتوباکتر بومانی یک پاتوژن فرصت طلب و مسئول عفونت‌های دستگاه ادراری، جریان خون، پوست و سایر بافت‌های نرم است. چندین گزارش نشان داده‌اند که اسپینتوباکتر بومانی به سرعت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت می‌کند و سوبه‌های مقاوم به چند دارو از این باکتری جداسازی و شناسایی شده‌اند (Lee et al., 2017). این باکتری منشأ پنومونی و سپتی سمی مکرر در بیماران با نقص ایمنی است. این سوش باکتریایی از یک سو از طریق عوامل ژنتیکی با واسطه کروموزوم در برابر کلاس‌های متعدد آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت می‌کند، در حالی که از سوی دیگر می‌تواند به مدت طولانی در شرایط سخت در محیط‌های بیمارستانی نیز باقی بماند (Asif et al., 2018). پنومونی مرتبط با ونتیلاتور که توسط اسپینتو-باکتر بومانی ایجاد می‌شود، مسئول نرخ مرگ و میر بالا و هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی، عمدتاً در بخش‌های مراقبت‌های ویژه (ICU) است. بنابراین توسعه عوامل ضد باکتریایی و دارویی موفق علیه این پاتوژن بیمارستانی بسیار ضروری است (Abootalebi et al., 2021). امروزه نانوذرات به عنوان عوامل ضد میکروبی جدید به دلیل نسبت سطح به حجم بالا و خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد آنها بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. بسیاری از نانوذرات فلزی و اکسید فلزی از جمله نقره، مس، تیتانیوم، روی و طلا به عنوان عوامل ضد میکروبی استفاده می‌شوند (Liao et al., 2019). نانوذرات نقره پرمصرف-ترین نانوذرات در زمینه پزشکی هستند و به عنوان ابزاری امیدبخش برای فرمولاسیون بیولوژیکی عوامل ضد میکروبی جدید گزارش شده است (Yassin et al., 2022).

حاوی باکتری کشت شده، اضافه شد. این پلیت پس از آماده سازی، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار گرفت. به منظور تخمین MIC، تغییرات رنگ هر چاهک مورد بررسی و شناسایی قرار گرفت و دین ترتیب حداقل غلظت بازدارندگی رشد اسپنتو باکتر بومانی تعیین گردید.

نتایج و بحث

با توجه به محدودیت بسیاری از انواع آنتی بیوتیک ها و عوامل ضد باکتریایی در برابر سویه های مقاوم به چند دارو، توجه زیادی به جایگزین های ایمن و مطمئن با کارایی بالا برای حل این مشکل شده است. استفاده از نانوذرات نقره بیوسنتز شده با استفاده از عصاره ها و ترکیبات گیاهی با خواص ضد میکروبی قوی می تواند راه-حل مناسبی برای این مشکل باشد. بنابراین، در تحقیق حاضر، پتانسیل باکتری کشی نانوذرات نقره بیوسنتزی از جوشانده برگ زرین گیاه در برابر اسپنتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو بررسی شد. نانوذرات نقره بیوسنتزی مورد استفاده در این مطالعه، از نانوذراتی است که قبلاً با استفاده از جوشانده برگ گیاه بومی زرین گیاه در آزمایشگاه ما مشخصه یابی شده بودند (Chahardoli et al., 2021). احیاء نیترات نقره به نانوذرات با تغییر رنگ محلول واکنش به رنگ قهوه ای نشان از تشکیل سریع نانوذرات مورد نظر در دقایق اولیه بود. آنالیز UV-vis ماکزیمم قله جذب نانوذرات نقره را در ۴۴۷ نانومتر نشان داد که در محدوده طیفی نانوذرات نقره (۴۶۰-۴۲۰ نانومتر) بود. طیف XRD ساختار بلوری با کریستالی نانوذرات حاصل را ثابت کرد (اطلاعات دقیق تر در مقاله منتر شده ما موجود است) این نانوذرات عمدتاً کروی بودند و در محدوده اندازه ۶۳-۵ نانومتر قرار داشتند (شکل ۱).

همانطور که ما در مقاله قبلی منتشر شده توضیح داده ایم، نانوذرات نقره با استفاده از جوشانده برگ زرین گیاه به عنوان عوامل احیاء کننده و تثبیت کننده تحت تابش نور خورشید بیوسنتز شدند. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی این نانوذرات، تشکیل و ساخت آنها را تایید نمود. خواص و ساختار نانوذرات نقره بیوسنتزی توسط تکنیک-های طیف سنجی UV-vis، طیف پراش اشعه ایکس (XRD)، طیف سنجی تبدیل فوریه مادان قرمز (FT-IR) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مشخصه یابی شد که تایید کننده تشکیل این نانوذرات و ویژگی های منحصر به فرد آنها می باشد.

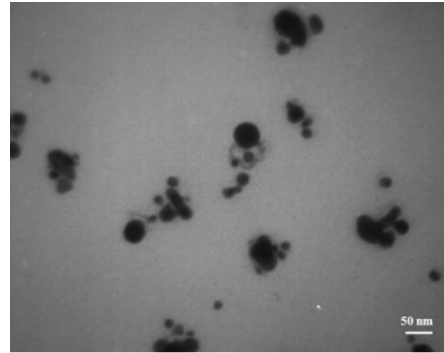
ارزیابی اثرات باکتری کشی نانوذرات بیوسنتزی

در مطالعه حاضر، اثرات باکتری کشی نانوذرات نقره بیوسنتزی بر علیه اسپنتو باکتر بومانی مقام به دارو با دو روش از جمله روش انتشار چاهک و روش حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) مورد بررسی قرار گرفت. در روش انتشار چاهک، سوسپانسیون باکتریایی از اسپنتو باکتر بومانی مقام به دارو در غلظت $10^8 \times 1/5$ واحد بر کلنی (CFU/mL) آماده و به صورت یکنواخت با استفاده از یک سوپ پنبه ای روی محیط کشت آگار مولر هینتون در پتری دیش کشت شد. بر روی این محیط آگار، چاهک هایی به اندازه ۶ میلی متر و با فاصله استاندارد ایجاد شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نانوذرات بیوسنتزی در داخل هر چاهک ریخته شد. پلیت آماده شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در یک انکوباتور قرار گرفت. پس از گذشت زمان انکوباسیون لازم، منطقه بازدارندگی شد باکتری مورد مطالعه با کمک خط کش اندازه گیری شد.

برای ارزیابی حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری مورد مطالعه در برابر نانوذرات نقره بیوسنتزی، روش استاندارد MIC مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی در غلظت مورد نظر مانند روش انتشار چاهک، باکتری مورد نظر در یک پلیت ۹۶ خانه ای کشت شد. سپس، ۵۰ میکرولیتر از نانوذرات بیوسنتزی نقره بصورت سریالی به هر چاهک یا خانه

مطالعه را برابر با 25 ± 5 میلی‌متر و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد با استفاده از روش MIC را برابر با ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تخمین زدند. در این مطالعه، عصاره *F. asafetida* منطقه بازدارندگی رشد برابر با 14 ± 3 میلی‌متر و مقدار MIC برابر با ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر را نشان داد (Abootalebi et al., 2021). نتایج این کار فعالیت ضد باکتریایی بیشتر نانوذرات نقره بیوسنتزی را در مقایسه با عصاره گیاه تایید نمود. پاسخ‌های مختلف باکتری اسپینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو در برابر نانوذرات نقره بیوسنتزی بواسطه ترکیبات فعال گیاه بومی زرین گیاه می‌تواند ناشی از اثرات عوامل مختلفی از جمله اندازه و شکل نانوذرات بیوسنتز شده، منشاء متفاوت ترکیبات احیاء کننده و پوشش‌دهنده یا تثبیت کننده موجود در عصاره‌های گیاهی، غلظت سویه‌های باکتریایی مورد استفاده و منشاء میکروارگانیسم‌ها باشد (Chahardoli et al., 2018). نانوذرات نقره بصورت چند وجهی عمل کرده و فرآیندهای متابولیک سلول‌های باکتریایی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. عملکرد نانوذرات نقره می‌توان به شرح زیر باشد: الف) این نانوذرات در ابتدا در دیواره سلولی و غشاء باکتری، اختلال ایجاد کرده و نفوذپذیری سلولی را افزایش می‌دهد. ب) در مرحله بعد نانوذرات نقره به داخل سلول نفوذ کرده و منجر به آسیب درون سلولی می‌شود که در نتیجه آن مسیرهای متابولیک مختل می‌گردد. ج) در داخل سلول، نانوذرات به ماکرومولکول‌های سلولی از جمله DNA و پروتئین‌ها آسیب وارد می‌کند و د) در نهایت با تولید گونه‌های اکسیژن فعال، حیات باکتریایی به خطر افتاده و مرگ سلولی رخ می‌دهد (Vazquez-Muñoz et al., 2019). با توجه به اثرات ضد باکتریایی قوی نانوذرات نقره بیوسنتزی با استفاده از جوشانده برگ گیاه بومی زرین گیاه در مطالعه ما، این نانوذرات می‌توانند به عنوان یک عامل ضد باکتری جدید در صنایع غذایی و دارویی در برابر باکتری اسپینتوباکتر بومانی مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه‌گیری



شکل ۱. تصویر TEM از نانوذرات نقره بیوسنتزی از گیاه بومی زرین گیاه (*D. kotschy*).

در ابتدا، قطر منطقه مهارکننده رشد (میلی‌متر) در اطراف چاهک‌های آغشته به نانوذرات بیوسنتزی در روش انتشار چاهک تعیین گردید. بر طبق این آزمایش، منطقه مهارکننده رشد باکتری اسپینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو برابر با ۱۶ میلی‌متر بود. این یافته، فعالیت ضدباکتریایی قوی نانوذرات بیوسنتزی نقره را در برابر اسپینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو نشان داد. غلظت MIC نانوذرات بیوسنتزی در برابر این سوش مقاوم به چند دارو برابر با ۱۵/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید که گواه بر این است که نانوذرات نقره بیوسنتزی از گیاه بومی زرین گیاه با خواص منحصر به فرد خود از رشد و تکثیر باکتری اسپینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو به شدت جلوگیری می‌کند.

علاوه بر این، جوشانده برگ گیاه بومی زرین گیاه با مقدار MIC تخمین زده شده برابر با ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از رشد اسپینتوباکتر بومانی مقاوم جلوگیری نمود. با این حال در مقایسه با جوشانده برگ گیاه بومی زرین گیاه، نانوذرات نقره بیوسنتزی از آنها، اثرات ضد باکتریایی قوی‌تری را نشان دادند. اثرات قوی‌تر نانوذرات نقره بیوسنتزی ممکن است به دلیل اندازه کوچک و مساحت سطح بزرگتر و سایر ویژگی‌های آنها باشد. در راستای تحقیق حاضر، ابوطالبی و همکاران (۲۰۲۰)، اثرات باکتری‌کشی نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز با استفاده از گیاه

Ferula asafoetida با اندازه ذرات تقریباً $10 \pm 2/77$ نانومتر را در برابر اسپینتوباکتر بومانی نشان دادند. این نویسندگان منطقه مهار کننده رشد سوش باکتری مورد

- Adv. Powder Technol. 29, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2017.11.003>
4. Chahardoli, A., Qalekhani, F., Shokoohinia, Y., Fattahi, A., (2021). Biological and catalytic activities of green synthesized silver nanoparticles from the leaf infusion of *Dracocephalum kotschy* Bois. *Glob. Challenges* 5, 2000018.
 5. Lee, C.-R., Lee, J.H., Park, M., Park, K.S., Bae, I.K., Kim, Y.B., Cha, C.-J., Jeong, B.C., Lee, S.H., (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 55.
 6. Liao, S., Zhang, Y., Pan, X., Zhu, F., Jiang, C., Liu, Q., Cheng, Z., Dai, G., Wu, G., Wang, L., (2019). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Nanomedicine* 14, 1469.
 7. Pelgrift, R.Y., Friedman, A.J., (2013). Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 1803–1815.
 8. Vazquez-Muñoz, R., Meza-Villezcás, A., Fournier, P.G.J., Soria-Castro, E., Juárez-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.
 9. 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.
- در تحقیق حاضر، ما از پتانسیل نانوذرات بیوسنتزی حاصل از جوشانده برگ گیاه بومی زرین گیاه به عنوان یک ماده سازگار با محیط زیست، غیر سمی و مقرون به صرفه برای سنجش اثرات باکتری‌کشی آن‌ها در برابر اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو استفاده کردیم. این نانو ذرات با اندازه متوسط ۱۹/۴۱ نانومتر دارای شکل کروی بودند. با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایش آنتی‌باکتریایی با روش‌های انتشار چاهک و MIC، نانوذرات نقره بیوسنتزی حاوی اثرات باکتری‌کشی قوی در برابر باکتری اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو بودند. بنابراین، این نانوذرات نقره بیوسنتزی به عنوان یک عامل باکتری‌کش مناسب می‌تواند جایگزین نوید بخشی بجای آنتی بیوتیک‌های سنتی برای کنترل عفونت‌ها در صنایع پزشکی و غذایی باشد.
- منابع**
1. Abootalebi, S.N., Mousavi, S.M., Hashemi, S.A., Shorafa, E., Omidifar, N., Gholami, A., (2021). Antibacterial effects of green-synthesized silver nanoparticles using *Ferula asafoetida* against *Acinetobacter baumannii* isolated from the hospital environment and assessment of their cytotoxicity on the human cell lines. *J. Nanomater.* 2021.
 2. Asif, M., Alvi, I.A., Rehman, S.U., (2018). Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infect. Drug Resist.* 11, 1249.
 3. Chahardoli, A., Karimi, N., Fattahi, A., (2018). *Nigella arvensis* leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles: Their characteristic properties and biological efficacy.

Bactericidal effects of biosynthetic silver nanoparticles from a medicinal plant against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*

Azam Chahardoli*

Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran
Corresponding author, Email: a.chahardoly@gmail.com

Abstract

Antimicrobial-resistant bacterial strains cause serious infections that can lead to increased mortality and morbidity rates, longer hospital stays, and financial losses. Finding new bactericidal agents against these bacterial is a critical concern. Silver nanoparticles (AgNPs) as an excellent antibacterial agent can play an effective role against these bacteria. Therefore, in the present study, biosynthesized AgNPs using leaf infusion of *Dracocephalum kotschy* Boiss were used to assess their bactericidal effects against a multidrug-resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* (a gram-negative strain). Based on the obtained results, the maximum zone of inhibition was 16 mm and the minimal inhibitory concentration (MIC) of biosynthesized AgNPs was 15.62 µg/mL against MDR *A. baumannii*. Therefore, biosynthesized AgNPs as cost-effective, eco-friendly, and safe alternative material with excellent bactericidal effect can be used in different fields such medical and food industries.

Keywords *Acinetobacter baumannii* ; AgNPs; Bactericidal effect; Biosynthesis