● **مقاله تحقیقی**

تولید زیستی نانوذرات نقره به‌وسیله دو گونه گلسنگ «اوسنئا آرتیکولاتا» و «رامالینا سیننسیس» و بررسی خواص ضدباکتریایی آنها علیه برخی باکتری‌های بیماری‌زا

هیوا عبدالملکی[۱]، *پرستو پورعلی[۲]، محمد سهرابی[۳]

چکیده

مقدمه: روش تولید زیستی نانو ذرات به‌علت عدم نیاز به مصرف انرژی و خطر کم مورد توجه واقع شده است. در مطالعه حاضر تولید نانو ذرات نقره به‌وسیله دو گونه گلسنگ «اوسنئا آرتیکولاتا» و «رامالینای سیننسیس» و همچنین اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات تولید شده مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: جهت تولید نانو ذرات نقره، عصاره آبی هر یک از گلسنگ‌ها تهیه و با محلول نیترات نقره در غلظت نهایی ۱ میلی مولار مجاور شد. تولید نانوذرات به‌وسیله روش‌های اسپکتروفتومتری، پراش پرتوی ایکس و میکروسکوپ الکترونی عبوری مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی خواص ضد باکتریایی از روش ایجاد چاهک در آگار علیه باکتری‌های اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوک اورئوس استفاده شد.

یافته‌ها: نانوذرات تولیدی به‌وسیله هر دو گونه گلسنگ دارای بیشینه جذب در طول موج‌های ۴۵۰ و ۴۸۰ نانومتر بودند. حضور نانو ذرات نقره به‌وسیله روش پراش پرتوی ایکس تأیید شد. اندازه نانوذرات نقره تولید شده توسط گلسنگ اوسنئا آرتیکولاتا در حدود ۱۰ الی ۵۰ نانومترو نانوذرات تولید شده به‌وسیله گلسنگ رامالینای سیننسیس ۵۰ الی ۸۰ نانومتر بود. آزمون ضدباکتریایی نشان داد نانوذرات تولید شده بر روی هر چهار باکتری اثر مهاری مناسبی را نشان می‌دهند.

بحث و نتیجه گیری: گلسنگ‌ها به‌علت فراوانی، رشد سریع و سازگاری با محیط زیست می‌توانند گزینه مناسبی جهت تولید نانوذرات نقره باشند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانوذرات تولیدی اثرات ضد باکتریایی مناسبی را از خود نشان می‌دهند و می‌توان از این نانوذرات در صنایع مختلف استفاده نمود.

کلمات کلیدی: تولید زیستی، نانوذرات نقره، گلسنگ، عوامل ضد باکتریایی

۱. کارشناس ارشد، نیشابور، ایران، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی
۲. مربی، شاهرود، ایران، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده پزشکی (*مؤلف مسئول)
parastoo_pourali@yahoo.com
۳. استادیار، تهران، ایران، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، گروه بیوتکنولوژی

فصلنامه علمی پژوهشی ابن سینا / اداره بهداشت، امداد و درمان نهاجا (سال هفدهم، شماره چهارم،زمستان ۱۳۹۴، مسلسل ۵۳)
تاریخ دریافت:۹۴/۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۱

مقدمه

در سال‌های اخیر استفاده از نانو ساختارها در صنعت به یک امر مهم تبدیل شده است. نانوذرات به دلیل دارا بودن خواص ویژه الکتریکی، نوری، مغناطیسی، شیمیایی و مکانیکی به‌طور گسترده در صنایع با تکنولوژی بالا مانند پزشکی تشخیصی، ساخت مواد ضد میکروب، دارو رسانی و همچنین الکترونیک و اپتوالکترونیک، کاتالیست‌های شیمیایی و صنایع تبدیل انرژی به‌کار می‌روند [۱]. نانوذرات به موادی با اندازه یک تا چند صد نانومتر اطلاق می‌شود که از صدها اتم یا مولکول تشکیل شده‌اند و می‌توانند اشکال مختلفی مانند کروی، کریستالی، چند وجهی و... داشته باشند [۲]. جهت تولید نانوذرات از روش‌های گوناگونی مانند کاهش حلال، واکنش‌های شیمیایی و فتوشیمیایی در میسل معکوس، تجزیه حرارتی ترکیبات نقره با کمک گرفتن از پرتوها، روش‌های الکتروشیمیایی و سونوشیمیایی استفاده می‌شود. اما متأسفانه در غالب روش‌هایی که جهت تولید نانو ذرات مورد استفاده قرار می‌گیرند استفاده از مواد سمی و پرتوهای خطرناک یک امر اجتناب ناپذیر است. از معایب دیگر این روش‌ها می‌توان به تولید نانوذرات در مقیاس پایین، اتلاف بالای انرژی و تخلیص دشوار و کم فایده نانوذرات اشاره کرد [۳]. با توجه به این موضوع، نیاز به روشی پر بازده، ارزان و بدون نیاز به استفاده از مواد سمی رو به افزایش می‌باشد. روش «بیوسنتز» یا «تولید زیستی» روشی است که به‌دلیل تولید آسان، عدم نیاز به مصرف انرژی و سازگاری با محیط زیست به تازگی مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. گیاهان، محصولات گیاهان، جلبک‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، باکتری‌ها و ویروس‌ها از موجوداتی هستند که می‌توانند در سنتز زیستی نانوذرات مورد استفاده قرار گیرند. از میان موجودات مختلف، مطالعات کمتری بر روی گلسنگ‌ها جهت تولید نانوذرات نقره انجام گرفته است و اهمیت آنها در تولید نانوذرات نقره کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. گلسنگ‌ها ارگانیسم‌هایی هستند که از اجتماع قارچ و جلبک به‌وجود می‌آیند و برخی شواهد نشان می‌دهدکه دارای قدمتی در حدود ۴۰۰ میلیون سال می‌باشند [۴]. قریب به نیمی از قارچ‌های کره زمین آسکومیکوتا[1] هستند و تقریباً نیمی از این قارچ‌ها زندگی اشتراکی با جلبک‌ها داشته و گلسنگ‌ها را به‌وجود می‌آورند. آسکومیکوتاهای تشکیل دهنده گلسنگ‌ها عمدتاً دیسکومیست[2] می‌باشند. گلسنگ‌ها به‌علت فراوانی می‌توانند گزینه مناسبی جهت تولید زیستی ارزان قیمت نانوذرات باشند [۵، ۶]. همچنین گلسنگ‌ها به‌دلیل دارا بودن متابولیت‌های ثانویه که قارچ‌ها مسئول تولید آنها می‌باشند، از خود خواص ضد باکتری نشان می‌دهند. حدود ۸۰۰ ترکیب ثانویه از گلسنگ‌های قارچی کشف شده است که در نوع خود منحصر به فرد می‌باشند و در مقابل باکتری‌های بیماری‌زای انسانی دارای خاصیت ضد باکتریایی می‌باشند [۷، ۸]. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تولید زیستی نانوذرات نقره به‌وسیله عصاره آبی دو گونه گلسنگ به نام‌های «اوسنئا آرتیکولاتا[3]» و «رامالینای سیننسیس[4]» بوده است. سپس اثر ضد باکتری محلول حاوی نانوذرات تولید شده نسبت به عصاره خالص گلسنگ‌ها علیه چهار باکتری اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوک اورئوس مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

روش بررسی

دو گلسنگ مورد استفاده در این مطالعه از مناطق شمالی ایران جمع‌آوری شدند. پس از شست و شوی هر یک از گلسنگ‌ها با آب مقطر و خشک کردن در دمای محیط، نمونه‌ها به قطعات کوچک با ابعاد تقریبی ۵ میلی‌متر خرد شدند. به‌منظور تهیه عصاره آبی ۲۰ گرم از هر نمونه با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و حرارت داده شد. پس از رسیدن به نقطه جوش عصاره از منبع حرارت دور شد و پس از سرد شدن به‌وسیله کاغذ صافی صاف و برای استفاده‌های بعدی در دمای

1. Ascomycota
2. Discomycetes
3. *Usnea articulata*
4. *Ramalina sinensis*

۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت [۹].

جهت تولید نانوذرات نقره، در ابتدا محلول نیترات نقره ۱ مولار تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. جهت تولید نانوذرات ۱۰ میلی لیتر عصاره هر یک از گلسنگ‌ها به‌طور جداگانه با ۱۰میکرولیتر محلول نیترات نقره ۱ مولار مخلوط شد و در انکوباتور شیکر در دور ۲۰۰ rpm، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد [۱۰].

بررسی تولید نانوذرات نقره به صورت چشمی، سنجش چگالی نوری، پراش پرتوی ایکس و عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری انجام گرفت. در بررسی چشمی، تغییر رنگ محلول به زرد مایل به قهوه‌ای و سپس قهوه‌ای تیره نشان دهنده تولید نانوذرات نقره بود. جهت انجام سنجش چگالی نوری، چگالی نوری محلول حاوی نانوذرات نقره در طول موج ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر مورد اندازه گیری قرار گرفت. محلول شاهد (بلانک) عصاره خالص گلسنگ و فاقد نیترات نقره بود [۱۰، ۱۱]. در پراش پرتوی ایکس، ابتدا محلول حاوی نانوذرات توسط دستگاه فریز درایر به‌صورت پودر در آمد و سپس اسکن توسط دستگاه XRD مدل X'Pert Pro MPD با زاویه 2θ، محدوده اسکن۳۰ تا ۹۰ درجه، نرخ اسکن $2^{\circ}/min^{-1}$، ولتاژ ۴۰ KV و جریان ۳۰ mA انجام شد [۱۲]. در عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری، ابتدا نانوذرات بر روی گرید مسی پوشیده شده از کربن ثابت شدند و پس از خشک شدن، عکسبرداری با دقت ۲/۳۲ آنگستروم انجام شد [۱۳].

به‌منظور بهینه‌سازی تولید نانوذرات تأثیر چهار عامل غلظت سوبسترا، زمان، دما و pH بر روی بیوسنتز نانوذرات توسط دو گونه گلسنگ مورد آزمایش قرار گرفت. به‌منظور بررسی تأثیر غلظت سوبسترا، ابتدا در لوله‌های آزمایش ۲۰ میلی لیتر از عصاره آبی هر یک از گونه‌های گلسنگ اضافه سازی و غلظت‌های مورد استفاده از نیترات نقره در حجم نهایی ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵، ۵ افزوده شد. سپس تمامی لوله‌های آزمایش تحت شرایط یکسان در شیکر انکوباتور در

جدول ۱- شرایط مختلف آزمایش برای چهار عامل غلظت سوبسترا، زمان، دما و pH بر روی بیوسنتز نانوذرات

نوع عامل محیطی مورد آزمایش	حالات مورد آزمایش	شرایط انکوباسیون (h/rpm)
غلظت سوبسترا (میلی مولار)	۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵، ۵	۷۲ /۱۵۰
زمان (ساعت)	۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶	۱۵۰
دما (ºC)	۲۷، ۳۷، ۴۷	۷۲ /۱۵۰
pH	۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹	۷۲ /۱۵۰

دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت زمان ۷۲ ساعت در دور ۱۵۰rpm قرار داده شدند.

جهت بررسی تأثیر دما، مقدار ۲۰ میلی لیتر از عصاره آبی هر یک از گلسنگ‌ها به همراه ۲۰ مایکرولیتر از نیترات نقره ۱ مولار مخلوط و سپس لوله‌ها در دماهای متفاوت در شیکر انکوباتور به مدت ۷۲ ساعت و در دور ۱۵۰rpm قرار گرفتند. دماهای مورد بررسی به ترتیب ۲۷ و ۳۷ و ۴۷ درجه سانتی‌گراد بودند.

جهت بررسی تأثیر pH، در هر لوله آزمایش به میزان ۲۰ میلی لیتر از عصاره آبی هر یک از گلسنگ‌ها افزوده و سپس ۲۰ مایکرولیتر از نیترات نقره ۱ مولار به آن اضافه سازی شد. نهایتاً به‌وسیله محلول NaOH و HCl یک نرمال، pH هر یک از محلول‌ها در محدوده pH ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ به‌وسیله pH متر تنظیم گردید. در پایان نمونه‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت در شیکر انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در دور ۱۵۰rpm قرار گرفتند.

همچنین جهت بررسی تأثیر زمان، مقدار ۲۰ میلی لیتر از عصاره آبی هر یک از گلسنگ‌ها به همراه ۲۰ مایکرولیتر از نیترات نقره ۱ مولار مخلوط وسپس نمونه‌ها تحت شرایط دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و با دور ۱۵۰rpm در انکوباتور شیکر قرار گرفتند. سپس در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند [۱۴].

در نهایت جهت بررسی نتایج بهینه‌سازی از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. بدین منظور نمونه‌ها در طول موج ۳۵۰ الی ۷۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند.

به‌منظور بررسی آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. بدین منظور داده‌ها توسط آزمون آنوای یک طرفه

الف)

ب)

شکل ۱- تصویر دو گلسنگ جمع آوری شده الف) *Usnea articulata* و ب) *Ramalina sinensis*

مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و رابطه تأثیر هر یک از نانوذرات تولید شده بر باکتری‌های مورد آزمایش بررسی شد.

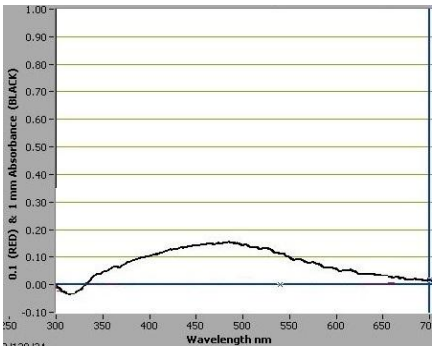
جهت انجام آزمون ضد باکتریایی بر روی چهار گونه باکتریایی مورد آزمون از روش ایجاد چاهک در آگار[1] استفاده شد. ابتدا محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه و در پلیت تقسیم گردید. سپس مقدار مناسب از کلنی‌های هر باکتری در سرم فیزیولوژی حل شد تا کدورت آن باسوسپانسیون استاندارد ۰/۵ مک فارلند برابر شود. در هر پلیت از سوسپانسیون باکتری تهیه شده با استفاده از سواب استریل در سه جهت کشت انبوه داده شد. سپس با استفاده از ژل پانچر بر روی ژل ۵ چاهک به شعاع ۶ میلی متر با فاصله ۱/۵ سانتی متر ایجاد شد. درون چاهک‌ها مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر محلول با استفاده از سمپلر ریخته شد. چاهک‌های پر شده درون هر پلیت شامل نیترات نقره یک میلی مولار به‌عنوان شاهد مثبت، عصارهای آبی دو گونه گلسنگ و عصاره‌های حاوی نانوذرات نقره قرار گرفت. سپس پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد [۱۳].

1. Agar well diffusion

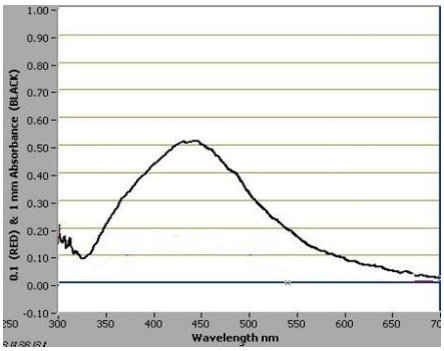
یافته‌ها

دو گلسنگ مورد نظر جمع‌آوری و تأیید شدند (شکل ۱). در بررسی چشمی تولید نانوذرات نقره، پس از گذشت ۷۲ ساعت از انکوباسیون محلول‌ها، به تدریج تغییر رنگ به زرد مایل به قهوه‌ای و سپس قهوه‌ای تیره مشاهده شد. این تغییر رنگ به‌دلیل رزونانس پلاسمایی سطحی نانوذرات نقره می‌باشد و بنابراین حضور نانوذرات را تأیید می‌نمود.

بیشینه چگالی نوری برای نانوذارت تولید شده توسط عصاره آبی رامالینا در محدوده طول موج ۴۸۰ نانومتر و برای نانوذرات تولید شده توسط عصاره آبی اوسنئا آرتیکولاتا در حدود طول موج ۴۵۰ نانومتر بود (نمودار۱). نانوذرات نقره به‌دلیل پدیده‌ای به نام رزوانس پلاسمون سطحی از طریق امواج نور قابل پیگیری هستند. رزوانس پلاسمون سطحی به نوسانات مشترک الکترون‌های روی سطح نانو ساختارهای فلزی اطلاق می‌شود که در برابر پاسخ به یک محرک خارجی نظیر نور یا بار الکتریکی ایجاد می‌گردد و به همین دلیل نانوذرات را می‌توان در محیط‌های مختلف ردیابی نمود.

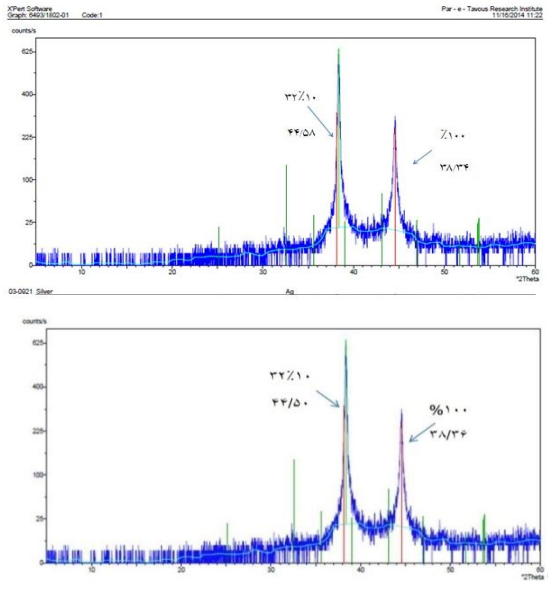


الف)



ب)

نمودار ۱- الگوی میزان جذب نانوذرات تولیدی توسط عصاره آبی گلسنگ های *Ramalina sinensis* (الف) و *Usnea articulata* (ب)

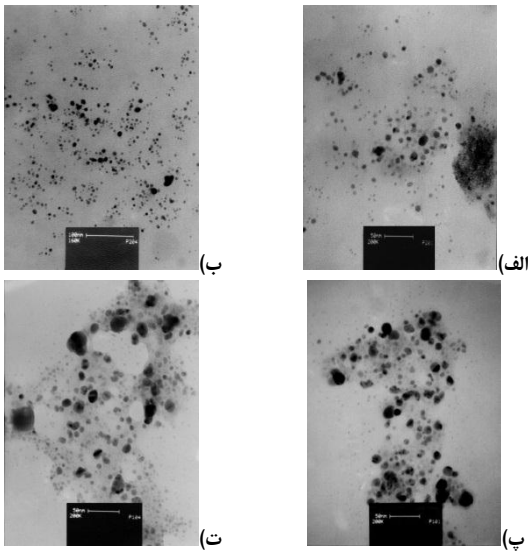


نمودار ۲- الگوی حاصل از آزمون پراش پرتوی ایکس بر روی نانوذرات تولید شده توسط *Usnea articulata* (الف) و *Ramalina sinensis* (ب)

بررسی نتایج آزمون پراش پرتوی ایکس حضور عنصر نقره را در عصاره حاوی نانوذرات در گلسنگ اوسنئا آرتیکولاتا در زوایای °۴۴/۵۸و°۳۸/۳۴ و برای گلسنگ رامالینای سیننسیس در زوایای °۴۴/۵۰ و °۳۸/۳۶ درجه نشان داد (نمودار ۲). در تکنیک فوق سایر ترکیبات در محلول عصاره آبی گلسنگ‌ها وجود داشت و روش پراش پرتو ایکس توانست از میان سایر ترکیبات مشابه و غیر مشابه حضور فلز نقره را تأیید کند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نیز تولید نانوذرات نقره به‌وسیله عصاره آبی هر دو گونه گلسنگ را تأیید نمود (شکل ۲). اندازه نانوذرات نقره تولید شده توسط گلسنگ اوسنئا آرتیکولاتا در حدود۱۰ تا ۵۰ نانومتر و نانوذرات تولید شده به‌وسیله گلسنگ رامالینای سیننسیس ۵۰ تا ۸۰ نانومتر بود. بررسی‌ها تصاویر میکروسکوپی نشان داد که عصاره هر دو گونه گلسنگ قادر به تولید نانوذرات نقره به اشکال کروی بودند.

بررسی نتایج بهینه سازی تولید نانوذرات و اسپکتروفتومتری

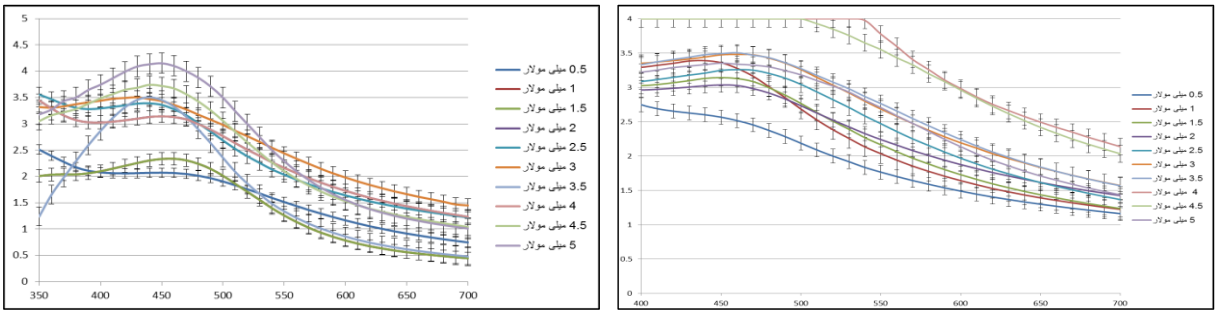
در مورد گلسنگ اوسنئا آرتیکولاتا بهترین غلظت سوبسترا جهت تولید نانوذرات نقره ۵ میلی مولار و برای نمونه گلسنگ رامالینای سیننسیس بهترین غلظت سوبسترا جهت تولید نانوذرات نقره غلظت ۳/۵ میلی مولار بود. نتایج بررسی تولید



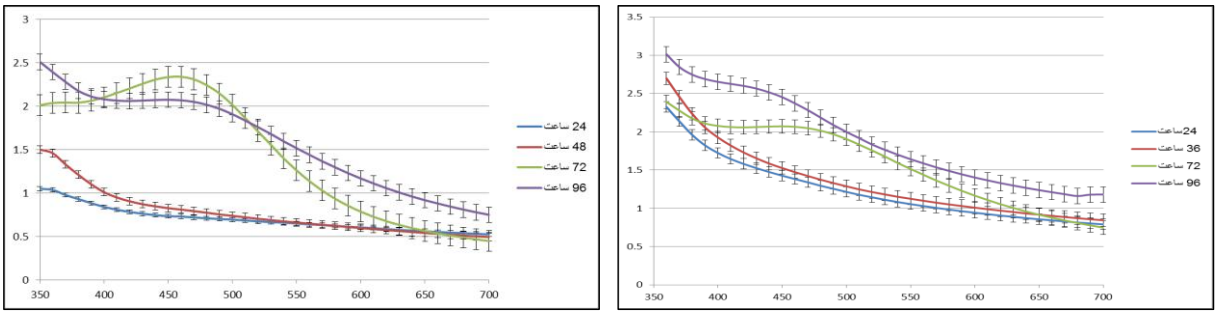
شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری؛ نانوذرات تولید شده به وسیله گلسنک‌های *Usnea articulata* (الف و ب) و *Ramalina sinensis* (پ و ت)

نانوذرات در زمان‌های به ۲۴، ۴۸، ۷۲ و۹۶ ساعت نشان داد که در مورد هر دو گلسنگ بهترین زمان بیوسنتز نانوذرات ۷۲ ساعت بوده است. بررسی‌ها و نتایج اسپکتروفتومتری نشان داد که برای گلسنگ اوسنئا آرتیکولاتا بهترین دما جهت تولید نانوذرات نقره ۴۷ درجه سانتیگراد و برای نمونه گلسنگ رامالینای سیننسیس بهترین دما جهت تولید نانوذرات نقره ۳۷ درجه سانتیگراد بوده است. بیوسنتز نانوذرات توسط نمونه‌ها در pHهای ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و۹ بررسی شد و طبق نتایج مشاهده شده برای هر دو گونه گلسنگ بهترین pH جهت تولید نانوذرات نقره در حدود pH ۹ بود. (نمودار ۳)

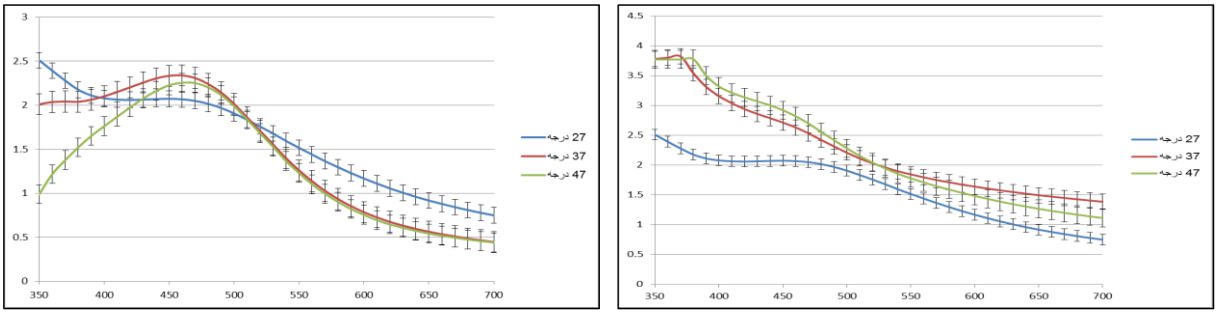
آزمون‌های ضد باکتریایی نشان داد که عصاره‌های آبی دو گونه گلسنگ مورد بررسی تنها علیه باکتری باسیلوس سوبتیلیس اثر مهاری دارند در صورتی که نانوذرات تولیدی توسط عصاره این گلسنگ‌ها علیه هر چهار باکتری اثر ضد باکتریایی مناسبی را نشان دادند و اثر ضد باکتریایی نانوذرات تولید شده به‌صورت معناداری بیش از عصاره‌های آبی گلسنگ‌ها بود (جدول ۲).



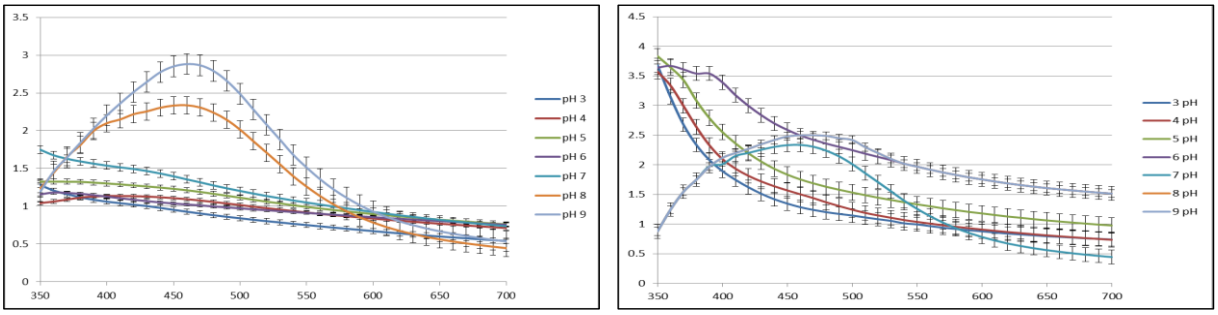
تأثیر غلظت سوبسترا بر تولید نانوذرات (الف) (ب)



تأثیر زمان بر تولید نانوذرات (الف) (ب)



تأثیر دما بر تولید نانوذرات (الف) (ب)



تأثیر pH بر تولید نانوذرات (الف) (ب)

نمودار ۳- تاثیر عوامل مختلف بر تولید نانوذرات الف) *Usnea articulata* و ب) *Ramalina sinensis*

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره ها و نانوذرات تولید شده بر روی چهار باکتری مورد آزمایش

نام باکتری	*Usnea articulata*		*Ramalina sinensis*	
	عصاره آبی خالص	نانوذرات تولیدی توسط عصاره آبی	عصاره آبی خالص	نانوذرات تولیدی توسط عصاره آبی
اشریشیا کلی	۶/۰۰±۰/۰۰	۱۵/۸۰±۰/۸۰	۶/۳۳±۰/۳۳	۱۵/۰۰±۰/۰۰
سودوموناس آئروژینوزا	۶/۰۰±۰/۰۰	۱۵/۰۰±۲/۸۰	۶/۰۰±۰/۰۰	۲۰/۰۰±۲/۸۰
استافیلوکوک اورئوس	۶/۳۳±۰/۳۳	۲۰/۰۰±۲/۸۰	۶/۳۳±۰/۳۳	۱۱/۶۰±۱/۶۰
باسیلوس سوبتیلیس	۱۰/۰۰±۰/۰۰	۲۰/۰۰±۰/۰۰	۱۳/۳۰±۱/۶۰	۶/۶۰±۱/۶۰

جدول ۳- بررسی واریانس (ANOVA)

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	ارزش F	مقدار احتمال
کل محلول ها	۴	۳۳/۶۳۱	۸/۴۰۸	۷۲/۵۵۳	<۰/۰۰۱**
کل باکتری ها	۳	۲/۳۵۴	۰/۷۸۵	۶/۷۷۲	<۰/۰۱*
کل تکرارها	۲	۰/۱۵۲	۰/۰۷۶	۰/۶۵۶	>۰/۰۵
اثر متقابل محلول در باکتری (تکرار اول)	۱۲	۶/۷۱۹	۰/۵۶۰	۴/۸۳۱	<۰/۰۰۱**
اثر متقابل محلول در باکتری (تکرار دوم)	۸	۱/۱۱۹	۰/۱۴۰	۱/۲۰۷	>۰/۰۵
اثر متقابل محلول در باکتری (تکرارسوم)	۶	۱/۳۶۵	۰/۲۲۷	۱/۹۶۳	>۰/۰۵
خطا	۲۴	۲/۷۸۱	۰/۱۱۶	–	–
کل	۶۰	۱۲۸/۶۲۵	–	–	–

** معنی دار در سطح ۱٪ * معنی دار در سطح ۵٪

نتایج بررسی‌های آماری به‌منظور مقایسه تأثیر نانوذرات تولید شده از هر عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوک اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس) و گرم منفی (اشریشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا) در جدول ۳ آمده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود بین محلول‌های عصاره آبی دو گلسنگ مورد مطالعه، نانو ذرات تولید شده توسط آنها و نیترات نقره اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود داشت. نانوذرات نقره تولیدی توسط عصاره آبی گلسنگ‌ها بیشترین تأثیر را بر روی باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا داشته است که نتایج پژوهش نشان داد که بین ۴ نوع باکتری بررسی شده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ وجود داشت. اثر متقابل محلول در باکتری در سطح ۱٪ معنی‌دار بود؛ به این معنی که نانوذرات تولید شده توسط گلسنگ‌ها خاصیت ضدباکتریایی داشته‌اند. بقیه گروه‌ها یعنی عصاره‌های آبی اثر مناسبی نداشته‌اند و به همین صورت اختلاف معنی‌داری هم نداشتند.

بحث و نتیجه‌گیری

احیای یون‌های آبی نیترات نقره به‌وسیله روش‌های آنزیمی یکی از راه‌های رایج جهت تولید نانوذرات نقره به‌صورت بیولوژیک به‌وسیله میکروارگانیسم‌ها است. نشانه کاهش یون‌های نقره و تولید نانو ذرات نقره تغییر رنگ محلول به زرد مایل به قهوه‌ای و قهوه‌ای تیره است. علت این تغییر رنگ پدیده‌ای به نام ارتعاشات سطحی پلاسمون در نانوذرات نقره می‌باشد [۱۵]. مطابق نتایج به‌دست آمده از بهینه‌سازی‌های صورت گرفته مشخص شد بهترین زمان تولید نانوذرات توسط عصاره آبی گلسنگ‌های مورد مطالعه ۷۲ ساعت می‌باشد. احمد و همکارانش در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ انجام شد ثابت کردند که تولید نانو ذرات تابعی از زمان است و با گذشت زمان غلظت نانوذرات در محلول افزایش می‌یابد و رنگ محلول تیره‌تر می‌شود [۱۲].

در مطالعه می[1] و همکارانش پس از ۷۲ ساعت مجاورت عصاره آبی *Parmotrema praesorediosum* و *Ramalina dumeticola* با محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار تغییر رنگ مشاهده شد که این نتایج با مطالعه حاضر مشابهت داشت [۱۶].

به‌نظر می‌رسد ترکیب عناصر خاک می‌تواند درصد ترشحات و مواد آلی تولیدی توسط یک گونه گلسنگ را تغییر دهد و در نتیجه مکان جمع‌آوری گلسنگ‌ها می‌تواند بر روش احیایِ یون‌های نقره و تولید نانوذرات نقره و همچنین زمان تولید نانوذرات نقره تأثیرگذار باشد.

در این مطالعه از روش اسپکتروفتومتری به‌عنوان یک روش ساده جهت تأیید تولید زیستی نانوذرات استفاده شد. حداکثر جذب برای نانوذرات تولید شده توسط گلسنگ‌های اوسنئا آرتیکولاتا و رامالینای سیننسیس به ترتیب در طول موج ۴۱۰ و ۴۵۰ نانومتر بود. در مطالعه مشابه می و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که طیف جذبی نانوذرات نقره حاصل از عصاره‌های *Ramalina dumeticola* و *Parmotrema praesorediosum* به ترتیب ۴۰۷ و ۴۲۳ نانومتر بوده است [۱۶]. در مطالعه دیگری دساری[2] و همکارانش حداکثر چگالی نوری نانوذرات نقره حاصل از عصاره چهار گونه گلسنگ را در طول موج ۴۰۰ الی ۴۵۰ نانومتر گزارش کردند [۱۱].

در مطالعه‌ای دیگر ال‌الدین[3] و همکارانش نشان دادند که توسط میزان جذب نانوذرات نقره توسط دستگاه اسپکتروفتومتر

1. Mie
2. Dasari
3. Alaaldin

می‌توان شکل نانوذرات نقره را مشخص نمود. آنها در مطالعات خود ثابت کردند که تنها نانوذرات کروی در نمودار چگالی نوری رسم شده توسط روش اسپکتروفتومتری دارای یک پیک جذبی می‌باشند و نانوذرات با اشکال دیگر دارای دو پیک حداکثر جذب در دو طول موج متفاوت هستند [۱۷]. از این‌رو به نظر می‌رسد وجود یک پیک در نمودار میزان جذب نانوذرات تولیدی توسط هر یک از گلسنگ‌های مورد آزمایش نشان دهنده کروی بودن نانو ذرات تولید شده در این مطالعه می‌باشد.

جهت تأیید تولید نانوذرات از روش پراش پرتوی ایکس به عنوان یک روش غیر مخرب استفاده شد. در این روش پرتوی ایکس به نانوذرات تابانده می‌شود و پس از برخورد با نانوذرات، با توجه به به ساختار کریستالی آنها منعکس می‌شود. با تجزیه و تحلیل نمودار حاصل از این روش می‌توان به حضور عناصر فلزی مختلف در محلول پی برد. نمودارهای به‌دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که با وجود حضور ترکیبات مختلف درون محلول، وجود ترکیبات نقره به وضوح قابل تشخیص است.

تصاویر به‌دست آمده از بررسی نانوذرات نقره تولید شده به‌وسیله گلسنگ‌های مورد مطالعه توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد که اندازه متوسط نانو ذرات نقره تولیدی توسط گلسنگ اوسنئا آرتیکولاتا بین ۵۰ تا ۱۰ نانومتر و رامالینای سیننسیس ۵۰ تا ۸۰ نانومتر بوده است. بررسی‌ها به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد که هر دو نمونه گلسنگ قادر به تولید نانوذرات نقره به شکال کروی بودند و اندازه نانوذرات تولیدی توسط گلسنگ اوسنئا آرتیکولاتا نسبت به گلسنگ رامالینای سیننسیس کوچک‌تربوده است.

دساری و همکارانش در تحقیقات خود اندازه نانوذرات نقره تولید شده توسط چهار گونه گلسنگ را بین ۱۵۰ تا ۲۵۰ نانومتر اعلام کردند که با نتایج مطالعه حاضر متفاوت بود [۱۱].

می و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که در تجزیه و تحلیل به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی TEM[1] اندازه متوسط نانو ذرات نقره حاصل از عصاره *Ramalina dumeticola* ۲۰ نانومتر و اندازه متوسط نانوذرات نقره حاصل از عصاره *Parmotrema praesorediosum* ۴۲ نانومتر بوده است [۱۶]. گوراما[2] و همکارانش در تحقیقات خود اندازه نانوذرات نقره تولید شده را در حدود ۱۵ نانومتر گزارش کردند [۱۳].

آزمون‌های ضد باکتریایی نشان داد که عصاره آبی هر دو گونه گلسنگ فقط در باسیلوس سوبتیلیس اثر مهاری داشته و در هیچ‌کدام از باکتری‌های دیگر به تنهایی حاوی خاصیت ضدباکتریایی نبوده‌اند در حالی‌که نانوذرات نقره تولیدی توسط عصاره‌ها اثر ضد باکتریایی مناسبی را علیه هر چهار سویه باکتری دارا بودند. همان‌گونه که بررسی‌های آماری نشان داد نانوذرات نقره تولید شده بیشترین اثر را بر روی باسیلوس سوبتیلیس و کمترین اثر را بر روی اشریشیا کلی داشتند. اثر نانوذرات تولیدی بر روی باسیلوس سوبتیلیس اختلاف معناداری در سطح ۵٪ با سایر باکتری‌ها نشان داد که احتمال می‌رود این امر به علت خصوصیات این باکتری باشد.

می و همکارانش در مطالعه خود اثر نانوذرات تولید شده به‌وسیله عصاره آبی *Parmotrema praesorediosum* را علیه هشت گونه مختلف از میکروارگانیسم‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره تولید شده فعالیت ضدباکتریایی بالقوه‌ای در برابر باکتری‌های گرم منفی داشت که نتایج این تحقیق با نتایج مطالعه حاضر متضاد بود [۱۶].

همچنین دساری و همکارانش در مطالعه خود فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره تولید شده به‌وسیله گلسنگ‌های *Parmeliopsis ambigua*، *Punctelia subrudecta*، *Evernia mesomorpha* و *Parmelia Perlata* را با روش انتشار دیسک علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که حداکثر

1. Transmission electron microscopy
2. Gowramma

فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره حاصل از گلسنگ *Evernia mesomorpha* علیه باکتری‌های گرم منفی بوده است. نتایج این پژوهش نیز با نتایج مطالعه حاضر متضاد بود [۱۱].

همچنین مزید و همکارانش در مطالعه خود فعالیت ضدباکتریایی گلسنگ *Parmelia kamstchandalis* را علیه باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس مگاتریوم، استافیلوکوک اورئوس و سالمونلا پاراتیفیA گزارش کردند که نتایج این پژوهش علیه باکتری باسیلوس سوبتیلیس مشابه نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر می‌باشد [۱۸].

در مورد خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره اختلاف معنی‌داری بین انواع باکتری‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر وجود نداشت و نانوذرات نقره اثر ضد باکتریایی مشابهی را علیه باکتری‌های مورد آزمون نشان دادند. بنابراین خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره برای هر دو گروه از باکتری‌ها تا حدودی یکسان می‌باشد. اگرچه بر خلاف یافته‌های به‌دست آمده از این مطالعه، تاکار[1] و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نشان داده‌اند که باسیلوس سوبتیلیس (گرم مثبت) نسبت به اشریشیا کلی (گرم منفی) به نانوذرات نقره حساسیت بیشتری دارد [۱۹]. ناندا[2] و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که نانوذرات نقره بر ضد باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی عملکرد بهتری دارند. دلیل این حالت احتمالاً به ساختار و اندازه نانوذرات وابسته است [۲۰]. علاوه بر این اثر ضد میکروبی نانوذرات به نوع میکروارگانیسم هدف نیز وابسته است. برای مثال هئی[3] در سال ۲۰۰۷ نشان داد که نانوذرات نقره اثر ضد باکتریایی بهتری در مقابل اشریشیا کلی نسبت به استافیلوکوک اورئوس نشان می‌دهند که دلیل آنرا تفاوت موجود بین ساختار دیواره باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دانسته است [۲۱].

1. Thakkar
2. Nanda
3. Hei

در مقابل این گزارش، روپارلیا[4] و همکارانش در سال ۲۰۱۱ نشان داده‌اند که این حالت وابسته به نوع سویه ارگانیسم هدف متفاوت است به‌طوری‌که برخی از سویه‌های اشریشیا کلی نسبت به سویه‌های استافیلوکوک اورئوس به نانوذرات نقره مقاومت بیشتری داشته‌اند [۲۲]. بنابراین تفاوت‌های فردی بین زیر گونه‌های مختلف از یک گونه باکتریایی منفرد می‌تواند در حساسیت یا مقاومت به نانوذرات فلزی تعیین کننده باشد. علاوه بر این، نشان داده شده است که در کنار اندازه و شکل، ترکیب سطحی نانوذرات که همان پوشاننده‌های آنها می‌باشند، در خواص ضد میکروبی دخیل‌اند. برای مثال هنگامی که نانوذرات نقره با اندازه و شکل مشخص دارای خصوصیات سطحی متفاوت باشند، خواص ضدمیکروبی آنها متفاوت خواهد بود. مشاهده شده است چنانچه نانوذرات به‌طور سست به پوشانندهای مانند سیترات متصل شوند، نسبت به حالتی که به‌صورت محکم به پوشانندهای مانند پلی الکترولیت متصل شوند، تمایل به تشکیل توده داشته که نهایتاً سطح در دسترس نانوذرات برای واکنش با سلول‌های باکتریایی را کاهش داده که باعث کاهش اثر ضد میکروبی آنها می‌شود [۲۳].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که گلسنگ‌ها با قابلیت‌هایی مانند رشد آسان، نیاز به مواد غذایی ساده و پتانسیل رشد در مقیاس بالا می‌توانند گزینه مناسبی جهت تولید زیستی نانوذرات باشند. همچنین به‌نظر می‌رسد استفاده از گلسنگ‌هایی با متابولیت‌های ثانویه ضد باکتری جهت تولید زیستی نانوذرات می‌تواند به افزایش خواص ضد میکروبی محلول تولیدی حاوی نانوذرات کمک کند. روش تولید زیستی به علت عدم نیاز به مصرف انرژی، استفاده از مواد شیمیایی خطرناک، سادگی و سهولت تولید گزینه مناسبی جهت تولید نانوذرات می‌باشد و احتمالاً نانوذرات تولید شده توسط این روش را می‌توان در صنایع مرتبط با انسان مانند صنایع دارویی، پوشاک و بهداشتی با امنیت بالاتری مورد استفاده قرار داد.

4. Ruparelia

References

1. Kouvaris P, Delimitis A, Zaspalis V, Papadopoulos D, Tsipas SA, Michailidis N. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles produced using Arbutus Unedo leaf extract. Materials letters. 2012;76:18-20.
2. Harrison RM, Shi JP, Xi S, Khan A, Mark D, Kinnersley R, et al. Measurement of number, mass and size distribution of particles in the atmosphere. Philosophical transactions of the royal society of London A: mathematical, physical and engineering sciences. 2000;358(1775):2567-2580.
3. 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):113-120.
4. Çobanoğlu G, Sesal C, Gökmen B, Çakar S. Evaluation of antimikrobial properties of some lichens. Southwest J. Hortic. Biol. Environ. 2010;1(2):153-158.
5. Ahmadjian V. Methods of isolating and culturing lichen symbionts and thalli. In: Ahmadjian V, ed. The lichens. New York: Academic Press; 1973:653-659.
6. Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell MM. Introductory Mycology. 4nd ed. New York: Wiley; 1996.
7. Huneck S, Yoshimura I. Identification of lichen substances. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1996.
8. Miao V, Coeffet-LeGal MF, Brown D, Sinnemann S, Donaldson G, Davies J. Genetic approaches to harvesting lichen products. Trends in biotechnology. 2001;19(9):349-355.
9. Shahi SK, Patra M. Microbially synthesized bioactive nanoparticles and their formulation active against human pathogenic fungi. Reviews on Advanced Materials Science. 2003;5:501-509.
10. 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;91:212-214.
11. Dasari S, Suresh K, Rajesh M, Reddy S, Samba C, Hemalatha C, et al. Biosynthesis, characterization, antibacterial and antioxidant activity of silver nanoparticles produced by lichens. J. Bionanosci. 2013;7(3):237-244.
12. Ahmad N, Sharma S, Alam MK, Singh VN, Shamsi SF, Mehta BR, et al. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces. 2010;81(1):81-86.
13. Gowramma B, Keerthi U, Rafi M, Rao DM. Biogenic silver nanoparticles production and characterization from native stain of Corynebacterium species and its antimicrobial activity. 3 Biotech. 2015;5(2):195-201.
14. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. Bioresource technology. 2008;99(15):776-784.
15. 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.
16. Mie R, Samsudin MW, Din LB, Ahmad A. Green synthesis of silver nanoparticles using two lichens species: Parmotrema praesorediosum and Ramalina dumeticola. Applied Mechanics and Materials. 2012;229-231:256-259.
17. Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? Journal of nanoparticle research : an interdisciplinary forum for nanoscale science and technology. 2010;12(7):2313-2333.
18. Mazid M, Hasan C, Rashid M. Antibacterial activity of Parmelia kamstchandalis. Fitoterapia. 1999;70(6):615-617.
19. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine. 2010;6(2):257-262.
20. Nanda A, Saravanan M. Biosynthesis of silver nanoparticles from Staphylococcus aureus and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine. 2009;5(4):452-456.
21. Hiep HM, Endo T, Kerman K, Chikae M, Kim D-K, Yamamura S, et al. A localized surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of casein in milk. Science and technology of advanced materials. 2007;8(4):331-338.
22. Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttagupta SP, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta biomaterialia. 2008;4(3):707-716.
23. Zhou Y, Kong Y, Kundu S, Cirillo JD, Liang H. Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against Escherichia coli and bacillus Calmette-Guerin. Journal of nanobiotechnology. 2012;10(19):1-9.

Biosynthesis of silver nanoparticles by two lichens of "*Usnea articulate*" and "*Ramalina sinensis*" and investigation of their antibacterial activity against some pathogenic bacteria

Abdolmaleki H[1], *Pourali P[2], Sohrabi M[3]

Abstract

Background: Nowadays, biosynthesis of nanoparticles is considered because of its low energy requirements and risk. In present study, silver nanoparticles produced by two species of lichens "*Usnea articulata*" and "*Ramalina sinensis*". Furthermore, the antibacterial effects of nanoparticles were studied.

Materials and Methods: To produce silver nanoparticles, lichens aqueous extract was placed in the vicinity of 1mmol of the silver nitrate solution. The production of nanoparticles was studied by spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), and transmission electron microscopy (TEM). The antibacterial effect of the produced silver nanoparticles was investigated by agar well diffusion method against *Escherichia coli* ,*Pseudomonas aeruginosa* ,*Bacillus subtilis,* and *Staphylococcus aureus*.

Results: The biosynthesized nanoparticles by two types of lichens had a maximum absorption at the wavelengths of 450 and 480 nm. Also, the presence of silver nanoparticles was confirmed by XRD method. The size of silver nanoparticles produced by *Usnea articulata* was about 10 to 50 nm and the nanoparticles produced by *Ramalina sinensis* around was 50 to 80 nm. The antibacterial test of the nanoparticles showed a good inhibitory effect against all four bacteria.

Conclusion: Lichens can be a good choice to produce silver nanoparticles, due to the abundance, fast growth, and environmental sustainability. The results of present study showed that biosynthesized silver nanoparticles had an effective inhibitory activity against bacteria. Therefore, these nanoparticles can be used in various industries.

Keywords: Biological Products, Nanoparticles, Lichen, Anti Bacterial Agents

1. MSc, Neishaboor Branch, Islamic Azad University, Neishaboor, Iran

2. Instructor, Department of Medical Sciences, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran (*Corresponding author) parastoo_pourali@yahoo.com

3. Assistant professor, Department of biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran