

بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس سنتز شده در حضور عصاره آبی زرشک

سیاه بر روی زخم عفونی جراحی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس

پروین اسکندری^۱، فائزه نقی لونیا^۲، رضا شاپوری^۳، مهدی ارفعی^۴

۱- استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران. نویسنده مسئول: eskandari.p14@gmail.com

۲- دانشجوی دکتری شیمی آلی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.

۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.

۴- دانشجوی کارشناسی میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: اکسید مس یکی از مهمترین اکسیدهای فلزات واسطه است که به دلیل داشتن خواص جالب در فناوری‌های مختلفی مانند ابررساناهای دمای بحرانی بالا، حسگرهای گاز، کاتالیزورهای نوری و غیره به کار برده می‌شود. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس عامل ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌های عفونی می‌باشد. در این بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس سنتز شده در حضور عصاره آبی زرشک سیاه بر روی زخم عفونی جراحی ناشی از این باکتری در موش بررسی گردید. **مواد و روش‌ها:** ابتدا در حضور عصاره آبی زرشک سیاه نانوذرات اکسید مس سنتز و با استفاده از آنالیزهای FT-IR، XRD، FE-SEM تایید گردید. میزان MIC و MBC نانوذرات سنتز شده بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با روش رقت در محیط کشت مولر هینتون برآش تعیین شد. در ادامه با ایجاد زخم جلدی و تلقیح محلول باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با غلظت 10^5 CFU/ml (۵ ×)، غلظت MBC به همراه پماد اوسرین بر روی زخم‌های عفونی شده بررسی گردید. **نتایج:** نانوذرات اکسید مس سنتز شده در حضور عصاره آبی زرشک سیاه دارای فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی بر کنترل رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. همچنین نانوذرات اکسید مس سنتز شده، اثر ضد میکروبی و ترمیم کنندگی مطلوبی بر روی زخم عفونی جراحی ناشی از این باکتری دارد. بر اساس نتایج آماری به دست آمده در گروه درمان با پماد اوسرین در مقایسه با گروه کنترل و بدون درمان اختلاف آشکاری دیده شد ($P < 0.01$).

نتیجه گیری: طبق یافته‌ها، در حضور عصاره آبی زرشک سیاه می‌توان به طور موثر و کارایی نانوذرات اکسید مس را در شرایط ساده و سازگار با محیط زیست سنتز نمود. نانوذرات سنتز شده دارای اثر ضد میکروبی قابل توجهی بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بوده و خاصیت ترمیم کنندگی مطلوبی در مقایسه با پماد اوسرین دارد. می‌توان انتظار داشت نانوذرات اکسید مس حاصله نقش موثری در درمان سایر عفونت‌های میکروبی داشته باشد.

کلمات کلیدی: نانوذرات اکسید مس، استافیلوکوکوس اورئوس، اوسرین، زرشک سیاه، موش

مقدمه

در سال‌های اخیر افزایش مقاومت میکروب‌ها یکی از مشکلات مهم در حوزه بهداشت و درمان بوده و بیماری‌های عفونی نیز یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در جهان می‌باشند (۱). در این میان، عفونت زخم از معمول‌ترین مشکلات بیماران متعاقب جراحی می‌باشد که به طور مشخص می‌تواند زمان التیام، بستری شدن بیمار، استرس و هزینه‌های ناشی از آن را افزایش دهد (۲). پیدایش گونه‌های میکروبی مقاوم به ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها سبب شده استفاده از ترکیبات ضد میکروبی نوین به صورت گسترده‌ای گسترش یابد. در این راستا، مواد با ابعاد نانو با خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی منحصر به فرد، در جوامع علمی مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته‌اند (۱). استفیلوکوکوس اورئوس از مهم‌ترین گونه‌های باکتری‌های گرم مثبت بوده و این باکتری کروی شکل با قطر ۱ میکرون، بدون حرکت، فاقد هاگ و به شکل خوشه انگوری بوده و از شایع‌ترین باکتری‌ها در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. این باکتری میکروفلور طبیعی بدن بوده و در شرایط مناسب مانند زخم‌های پوستی وارد بافت شده و موجب التهاب و بروز عفونت می‌گردد (۳). در سال‌های اخیر نانوذرات اکسید مس به دلیل خواص مطلوب کاتالیزوی، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ... در زمینه علوم زیستی و دارویی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (۴ و ۵). نانوذرات با ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر، قابل مقایسه با ابعاد مولکول‌های بیولوژیکی بزرگ مانند آنزیم‌ها و گیرنده‌ها می‌باشند. به همین دلیل نانوذرات می‌توانند با مولکول‌های زیستی برهمکنش داشته و در تشخیص و درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان مفید واقع شوند (۶ و ۷). در این میان نانوذرات اکسید مس بسیار پایدار بوده و در مقایسه با مواد

ضدمیکروبی آلی و برخی داروها، از فعالیت بیشتری برخوردار می‌باشند. اما بررسی‌های انجام شده بر روی فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات مس در مقایسه با سایر نانوذرات فلزی کمتر بوده است (۸ و ۹). سنتز نانوذرات اکسید مس در مقایسه با نانوذرات طلا و نقره بسیار ارزان‌تر بوده و این در حالی است که نانوذرات اکسید مس خاصیت ضدمیکروبی بالاتری از خود نشان می‌دهند. در سال‌های اخیر استفاده از عصاره گیاهان در سنتز نانوذرات به عنوان روش سنتز سبز و دوستدار محیط زیست بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۰). سنتز سبز نانوذرات در حضور عصاره گیاهان دارای مزایای قابل توجهی از جمله بازده بالا، سادگی روش، مقرون به صرفه بودن، سازگار با محیط زیست و کاهش مصرف حلال‌های آلی می‌باشد (۱۱-۱۷). خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات از جمله اندازه، میزان تجمع نانوذرات در مایعات، مقدار بار سطحی نانوذرات نقش مهمی در برهمکنش نهایی نانوذرات با سلول‌های هدف دارد. اخیراً تلاش‌های گسترده‌ای در سنتز سبز نانوذرات اکسید مس و بررسی فعالیت ضدباکتریایی آنها انجام شده است (۲). نتایج نشان داده در اکثر موارد فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات مس سنتز شده در حضور عصاره گیاهان نسبت به داروهای استاندارد بیشتر بوده است (۱۸). ایران یکی از بزرگترین تولیدکنندگان زرشک (*Berberis vulgaris*) در جهان است. عصاره آبی میوه زرشک تأثیرات مفیدی بر روی سیستم قلبی و عروقی و سیستم عصبی داشته و در درمان فشار خون و برخی از اختلالات عصبی مانند صرع و تشنج کاربرد دارد (۲۲-۱۹). همچنین زرشک سیاه (*Berberis integerrima*) یکی از گیاهان دارویی است که در طب سنتی ایران جایگاه ویژه‌ای از گذشته داشته

می‌سازد. اخیراً، سنتز نانوذرات پالادیم قرار گرفته بر روی اکسید گرافن کاهش یافته، نانوذرات طلا و اکسید روی با استفاده از عصاره میوه زرشک گزارش شده است (۲۶، ۱۵، ۵). با این حال استفاده از عصاره آبی زرشک سیاه در سنتز نانوذرات بسیار محدود بوده است. به همین منظور در بررسی حاضر، نانوذرات مس با استفاده از عصاره آبی زرشک سیاه تهیه و خواص ضد میکروبی آن بر روی زخم عفونی جراحی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

سدیم هیدروکسید ۵ مولار به مخلوط فوق به صورت قطره قطره افزوده شد تا pH محیط واکنش کاملاً قلیایی گردد. بعد از افزایش سدیم هیدروکسید، مخلوط واکنش به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ الی ۷۰ درجه سانتی‌گراد بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. تشکیل ذرات با رنگ قهوه‌ای تیره در داخل مخلوط واکنش، نشان دهنده سنتز نانوذرات اکسید مس می‌باشد. نانوذرات اکسید مس تشکیل شده با دستگاه سانتریفیوژ جداسازی و پس از چند بار شستشو با آب مقطر در دمای اتاق خشک گردید. ساختار نانوذرات حاصل شده با استفاده از آنالیزهای FT-IR، XRD، FE-SEM شناسایی و تایید گردید. نانوذرات حاصل شده برای بررسی فعالیت ضد میکروبی در ظرف درب بسته نگهداری شد.

تهیه سویه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

سویه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC29213 از بانک میکروبی مرکز تحقیقات نانو بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان تهیه شد. این باکتری‌ها بیماری‌زا بوده و روی محیط کشت مولر هیتون آگار کشت مجدد داده شدند و در آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

است. مهم‌ترین ترکیبات موجود در عصاره گیاه زرشک عبارتند از آلکالوئیدهای ایزوکوئینولینی مانند بربرین، بربرامین، جاترورهمیزین و پالماتین می‌باشد. همچنین میوه زرشک حاوی کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آلی، ویتامین C، ترکیبات پلی‌فنولیک (آنتوسیانین‌ها و رنگدانه‌های کارتوئیدی)، پکتین، تانن و ترکیبات معدنی می‌باشد (۲۴، ۲۳). وجود مقدار فراوانی ویتامین C در عصاره این گیاه به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان امکان استفاده از عصاره این گیاه به عنوان عامل پوشاننده و پایدار کننده نانوذرات را فراهم

تهیه عصاره زرشک

زرشک سیاه از باغات منطقه طارم زنجان تهیه گردید. زرشک‌های تهیه شده با آب مقطر شستشو و در دمای اتاق طی چند روز به طور کامل خشک گردید. میوه‌های خشک شده با استفاده از هاون پودر گردید. برای استخراج عصاره زرشک، مقدار ۵۰ گرم پودر زرشک در ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل شده اضافه و به مدت دو ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. بعد از خنک شدن مخلوط، ابتدا مخلوط با استفاده از پارچه نازک (گاز استریل) به طور اولیه صاف گردید. در ادامه عصاره به دست آمده در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۴۵۰۰ دور بر دقیقه در زمان‌های متوالی قرار داده شد تا ذرات جامد معلق به طور کامل از عصاره جدا گردد. عصاره حاصل تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گردید.

سنتز نانوذرات اکسید مس در حضور عصاره

زرشک سیاه

ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر عصاره آبی زرشک سیاه به ۲۵ میلی لیتر سولفات مس ۰/۰۲ مولار اضافه شد و مخلوط حاصل به مدت نیم ساعت روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. سپس محلول

آزمایشگاهی در حیوان خانه مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان در اتاق‌های مخصوص با آب و غذای استاندارد نگهداری و در شرایط تعریف شده آزمایشگاهی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۴ الی ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت حدود ۵۱ درصد نگهداری شدند. (۳)

بررسی اثر ضد میکروبی و ترمیم کنندگی عفونت زخم پوستی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در موش‌ها

برای تیمار موش‌ها مقدار غلظت MBC نانوذرات سنتز شده و موثر بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در هر گرم از پماد اوسرین اضافه گردید. حیوانات بعد از توزین، با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال ۴mg/ml بیهوش شده و در ناحیه پشت بین دو کتف با تراشیدن موها، برشی دایره‌ای شکل به قطر ۱ سانتی‌متر ایجاد شد. پوست ناحیه مذکور همراه با بافت همبند زیرین آن تا رسیدن به عضله کاملاً جدا گردید. حیوانات بعد از به هوش آمدن در قفس‌های جداگانه کاملاً تمیز و ضد عفونی شده نگهداری شدند (۲). پس از ۲۴ ساعت استراحت دادن به حیوانات محل زخم با تلقیح سوسپانسیون استافیلوکوکوس اورئوس با غلظت $(12 \times 10^8 \text{ CFU/ml})$ ، عفونی سازی شد و از روز بعد درمان آغاز گردید. در طول درمان به مدت ۶ روز که روزی ۲ مرتبه و هر بار برابر با ۱ گرم از پماد استفاده شد. در روز چهارم بعد از شروع درمان، جهت شمارش تعداد باکتری‌های مورد نظر در زخم‌ها با استفاده از سوآپ

انکوبه گردید. بعد از گذشت زمان انکوبه، برای بررسی و شمارش کلنی‌ها از هر لوله در محیط کشت مولر هیتون آگار

تعیین حداقل غلظت مهار کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MBC) نانوذرات اکسیدمس بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

به منظور تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC) نانوذرات اکسیدمس از روش براث ماکرودیلوشن استفاده شد (۲۷). به این منظور در ابتدا سوسپانسیون باکتری مزبور با غلظت نهایی $1/5 \times 10^6$ (CFU/ml) تهیه و در ۱۱ لوله آزمایش حاوی نانوذرات اکسیدمس با غلظت‌های ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲، ۳/۲، ۱/۵ و ۰/۷۸ میکروگرم/میلی لیتر (ppm) همراه با محیط مولر هیتون براث افزوده شده و بعد از رقت سازی مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد و بعد از زمان مقرر از هر لوله روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده و بعد از قرار گرفتن در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت، کم‌ترین غلظتی از نانوذرات که ۹۹/۹ درصد باکتری در آن رشد نکرده بودند به عنوان غلظت کشندگی MBC در نظر گرفته شد. (۲۸)

حیوانات آزمایشگاهی

در مدل حیوانی جهت بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۹ رت بالغ آزمایشگاهی با وزن تقریبی 190 ± 10 گرم مورد بررسی قرار گرفت. همچنین رت‌ها در ۳ گروه و در هر گروه ۳ رت تقسیم بندی شدند. گروه اول با نانوذرات سنتز شده به همراه اوسرین و گروه دوم با اوسرین درمان شدند. همچنین گروه سوم به عنوان کنترل و بدون درمان در نظر گرفته شدند. (۲۹) رت‌های نمونه برداری انجام شد و در لوله‌های ۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس

کشت داده که به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید (۳۰).

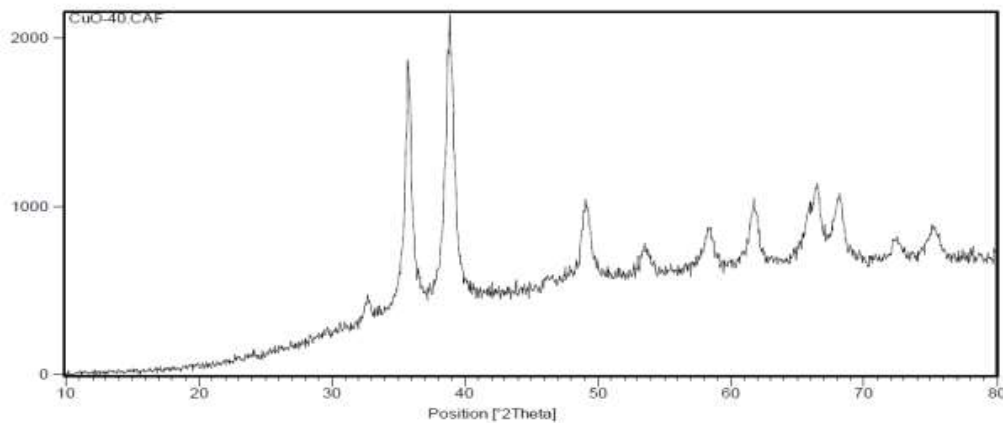
آزمون آماری

نتایج

پس از سنتز نانوذرات اکسید مس با استفاده از عصاره آبی زرشک سیاه، برای تایید تشکیل ساختار اکسید مس تشکیل شده آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD) نمونه انجام شد. در زیر نمودار پراش پرتو ایکس نمونه سنتز شده نشان داده

داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون LSD و ANOVA One way تجزیه و تحلیل گردید و سطح معنی دار ($P < 0.01$) در نظر گرفته شد.

شده است. آنالیز ساختار بلوری نانوذرات اکسید مس سنتز شده توسط XRD ساختار اکسید مس با خلوص بالا را تایید می‌کرد (۳۱). هیچ پیک از ناخالصی در طیف XRD دیده نشده و پهن بودن پیک مشاهده شده موید ابعاد کوچک نانوذرات تشکیل شده می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱: طیف XRD نانوذرات اکسید مس سنتز شده با استفاده از عصاره زرشک سیاه

است (۳۲). با استفاده از معادله شرر، اندازه متوسط نانوذره اکسید مس سنتز شده در زیر محاسبه و اندازه نانوذرات ۸/۷۲ نانومتر به دست آمد.

با توجه به معادله شرر سایز این نانوذرات محاسبه گردید و محاسبات در زیر آورده شده است. مفیدترین الگو برای استفاده از روش پراش پرتو ایکس برای محاسبه اندازه دانه بلوری، استفاده از عرض پیک ماکزیمم در نصف ارتفاع

$$d = \frac{0.9\lambda}{\beta \cdot \cos\theta}$$

$$2\theta = 35.5 \Rightarrow \cos\theta = 0.9524$$

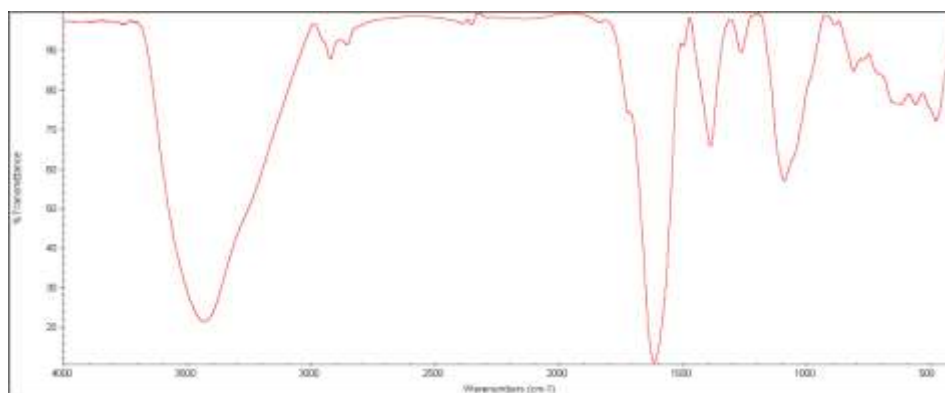
$$FWHM = 1 \Rightarrow \beta = (1 \times 3.14)/180 = 0.01744$$

$$d = (0.9 \times 1.5418)/(0.9524 \times 0.01744) = 8.72 \text{ nm}$$

آنالیز FT-IR

گرفته‌است. وجود نوارهای ارتعاشی در نواحی 455 cm^{-1} و 509 که نوارهای شاخص رنگدانه اکسید مس (II) هستند بیانگر تشکیل این ترکیب است. همچنین پیک‌های شاخص در ناحیه 1600 و 3390 cm^{-1} مربوط به گروه‌های کربونیلی و اسیدی موجود در عصاره زرشک سیاه می‌باشد (شکل ۲).

برای تایید قرارگیری ترکیبات آلی موجود در عصاره گیاه زرشک بر روی نانوذرات اکسید مس تشکیل شده طیف FT-IR مربوط به نانوذرات سنتز شده تهیه و در زیر نشان داده شده‌است. بررسی طیف FT-IR نشان می‌دهد ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره به خوبی بر روی نانوذرات قرار

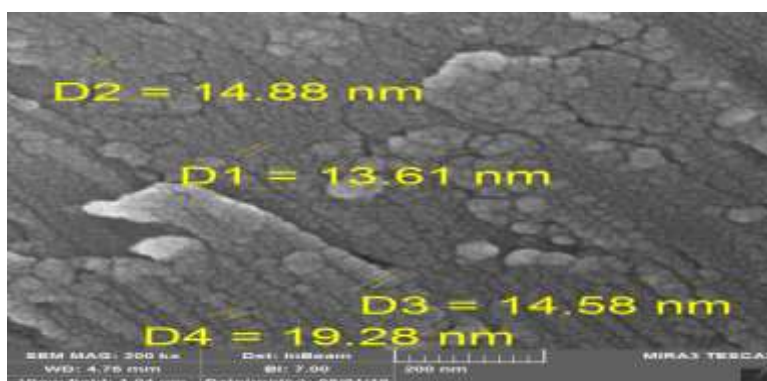


شکل ۲: تصویر FT-IR نانوذرات اکسید مس

آنالیز FE-SEM

شکل زیر آورده شده‌است. در این تصاویر اندازه نانوذرات اکسید مس با ابعاد زیر 20 نانومتر به خوبی قابل مشاهده است (شکل ۳).

ساختار نانوذرات اکسید مس سنتز شده توسط تصویر میکروسکوپی الکتریکی روبشی نشر میدانی FE-SEM در



شکل ۳: تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات سنتز شده

نتایج بررسی اثر کشندگی و مهار از رشد

میکروبی نانوذرات اکسید مس

بر اساس نتایج حاصله از بررسی‌های MBC و MIC، کمترین غلظت از نانوذرات که کلنی اندکی در آن رشد کرده بود به عنوان غلظت کشندگی در نظر گرفته شد. همچنین در

غلظتی از نانوذرات که تعداد کلنی‌ها به شکل محدود دیده شد به عنوان غلظت مهار از رشد ثبت گردید (۳۳،۳۴). بر اساس مقادیر افزوده شده نانوذرات اکسید مس و بررسی چشمی مقدار رشد و یا عدم رشد باکتری‌ها در محیط کشت مقادیر MIC و MBC طبق جدول زیر حاصل شد.

جدول ۱: مقادیر MIC و MBC برای نانوذرات اکسید مس سنتز شده در حضور عصاره آبی زرشک سیاه

MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	باکتری
۶۰	۷۰	استافیلوکوکوس اورئوس

نتایج حیوانی

رشد کلنی‌های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در گروه درمان با پماد اوسرین در مقایسه با گروه کنترل و بدون درمان اختلاف آشکاری دیده شد ($P < 0/01$). گروه درمان شده با پماد اوسرین حاوی نانوذرات اکسید مس در مقایسه با گروه بدون درمان دارای اختلاف معنادار بود ($P < 0/01$). همچنین گروه تیمار شده با اوسرین حاوی نانوذرات و گروه تیمار با اوسرین نیز دارای اختلاف قابل توجهی بودند ($P < 0/05$). (جدول شماره ۲). بررسی اثر ضد میکروبی و ترمیم کنندگی نانوذرات اکسید مس سنتز شده با عصاره آبی زرشک سیاه به صورت کیفی و در مقایسه با سرعت ترمیم زخم پوستی ایجاد

شده در موش‌های دریافت کننده پماد حاوی نانوذرات اکسید مس، گروه دریافت کننده پماد اوسرین و گروه کنترل و بدون درمان انجام گرفت. گروه تیمار شده با اوسرین حاوی نانوذرات اکسید مس در عرض ۴ روز ترمیم کامل پیدا کردند. در صورتی که گروه تیمار شده با اوسرین در طول ۷ روز ترمیم و گروه بدون درمان در عرض ۱۵ روز بهبود یافتند. بر اساس این نتایج نانوذرات اکسید مس سنتز شده در حضور عصاره آبی زرشک سیاه اثر ضد میکروبی و ترمیم کنندگی کارایی از خود نشان داد. با توجه به نتایج مطلوب به دست آمده، می‌توان انتظار داشت نانوذرات اکسید مس حاصله نقش موثری در درمان سایر عفونت‌های میکروبی داشته باشد.

جدول ۲: اثر درمان‌های مختلف بر میانگین و انحراف معیار تعداد کلنی‌های رشد یافته بر روی زخم عفونی در مدل حیوانی

ردیف	نام گروه	میانگین
گروه اول	گروه درمان با اوسرین و نانوذرات اکسید مس	$40/66 \pm 2/08^*$
گروه دوم	گروه درمان با اوسرین	$150/33 \pm 10/50^*$
گروه سوم	گروه کنترل و بدون درمان	$275/33 \pm 10/50$

* نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل و بدون درمان ($P < 0/01$)

بحث

سنتز نانوذرات با استفاده از عصاره‌های گیاهان نسبت به سایر روش‌های شیمیایی دارای مزیت‌هایی است که می‌توان به مقرون به صرفه بودن، دوست‌دار محیط‌زیست بودن و افزایش مقدار تولید در سنتزهای با میزان بالا اشاره کرد. همچنین نسبت به سایر روش‌های سنتز بیولوژیک نانوذرات، مراحل سنتز در این روش در زمان کمتری انجام و مزایایی نظیر کنترل بیشتر روی مراحل سنتز و پایداری بیشتر نانوذرات را به همراه دارد (۱۰). اکسید مس یکی از مهمترین اکسیدهای فلزات واسطه است که به دلیل داشتن خواص ارزشمند کاربرد گسترده‌ای در فناوری‌های مختلف مانند ابرسازهای دمای بحرانی بالا، حسگرهای گاز، کاتالیزورهای نوری و غیره دارد. در تحقیق حاضر، برای اولین بار از عصاره میوه زرشک سیاه به‌عنوان یکی از گیاهان بومی ایران، برای سنتز نانوذرات اکسید مس استفاده شده است. عصاره گیاه زرشک از دیرباز به عنوان یک ترکیب دارویی همواره مورد توجه بوده است (۲۲-۱۹). اخیراً آهنی و همکاران گزارش کرده‌اند استفاده از عصاره هیدورالکلی میوه گیاه زرشک تاثیر معنی‌داری بر تسریع روند بهبود زخم باز رت‌های نر داشته است (۳۵). عصاره گیاه زرشک حاوی آلکالوئیدهای ایزوکوئینولینی مانند بربرین، بربرامین، جاترورهیزین و پالماتین می‌باشد. همچنین میوه زرشک حاوی کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آلی، ویتامین C، ترکیبات پلی‌فنولیک (آنتوسیانین‌ها و رنگدانه‌های کارتنوئیدی)، پکتین، تانن و ترکیبات معدنی می‌باشد (۲۳، ۲۴)، که برخی از این ترکیبات می‌تواند به‌عنوان عامل احیاکننده و پوشاننده نانوذرات عمل کنند. آنالیزهای انجام شده کارایی عصاره زرشک سیاه را در سنتز نانوذرات اکسید مس نشان می‌دهد. در تصویر میکروسکوپ الکترونی FE-

SEM اندازه نانوذرات اکسید مس سنتز شده با ابعاد زیر ۲۰ نانومتر به خوبی قابل مشاهده است، همچنین محاسبه اندازه ابعاد نانوذرات از طریق معادله شرر و بر اساس آنالیز XRD، اندازه نانوذرات کمتر از ۱۰ نانومتر را نشان می‌دهد. با پیشرفت مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و ضدعفونی‌کننده‌های معمول، باعث توجه روزافزون به نانوذرات مس و اکسید مس با فعالیت واکنشی و ضد میکروبی بالا و قیمت ارزان شده است. اعظم و همکاران نانوذرات اکسید مس با ابعاد مختلف را با تغییر دمای کلسینه شدن سنتز نموده و تاثیر اندازه ابعاد نانوذرات بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی شده است. در این بررسی مقدار MIC با کاهش اندازه ابعاد نانوذرات اکسید مس کاهش یافته است (۱). ایزانلو و همکاران سنتز سبز نانوذرات اکسید مس با استفاده عصاره گیاه علف چای را گزارش و خاصیت ضد میکروبی نانوذرات حاصل را بررسی نمودند (۳۶). همچنین سنتز نانوذرات مس با استفاده از عصاره آبی گل *Postia puberula* و بررسی خواص ضدباکتریایی آن گزارش شده است (۳۷). نانوذرات اکسید مس در غلظت‌های کم برای سلول‌های بدن سمی نمی‌باشد. از این رو بررسی‌های متعددی در زمینه سنتز نانوذرات اکسید مس انجام و براساس مطالعات زیادی اثر نانوذرات اکسید مس به عنوان ماده ضد میکروبی به اثبات رسیده است (۳۸، ۳۹). بررسی‌هایی نیز مبتنی بر اثر نانوذرات بر روی ژنوم باکتری‌ها گزارش شده است (۴۰، ۴۱). بر اساس گزارشات، نانوذرات به غشای باکتری متصل شده و همچنین به داخل سلول باکتری نفوذ می‌کنند. غشای باکتری دارای پروتئین‌های حاوی گروه سولفور می‌باشد و نانوذرات با این پروتئین‌ها واکنش می‌دهند (۴۰). به نظر می‌رسد نانوذرات سنتز شده در حضور عصاره‌های گیاهی به دلیل دارا بودن

عنوان گیاه بومی منطقه، در سنتز نانوذرات اکسید مس را به خوبی نشان داد. نانوذرات سنتز شده از اندازه ابعاد و خلوص مناسبی برخوردار بودند. نانوذرات سنتز شده تاثیر ضد میکروبی مطلوبی بر روی زخم عفونی ناشی از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از خود نشان دادند. به این ترتیب گیاه زرشک سیاه می تواند به عنوان عامل موثر و مناسبی جهت سنتز نانوذرات مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات نانویوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان که در انجام آزمایش ها ما را یاری نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافی در این تحقیق وجود ندارد.

فهرست منابع

1. Azam A, Ahmed SA, Oves M, Khan MS, Memic A. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. *International Journal of Nanomedicine*. 2010 Jul 10; 7: 3527-3535.
2. Rahmani Gohar M, Moslemi HR, Kafshdouzan KH, Mazaheri Nezhad Fard R. Antibacterial activity of *origanum vulgare* on *staphylococcus aureus* in a rat model of surgical wound infection. *Journal of Medicinal Plants*. 2016 Feb 10; 15(57):19-24.
3. Kazemi N, Arfaei M, Ghasemi M. Antimicrobial and healing effect of Nettle, Purslane and Hedge Nettle extracts on burn infections of *Staphylococcus aureus* in mice. *Journal of Animal Philology and Development*. 2022 Dec 19; 16 (1): 59-69. (Persian)

ترکیبات آلی به عنوان عامل پوشاننده نانوذرات، اتصال بهتری از خود نشان دهند. بنابراین سنتز نانوذرات اکسید مس در پوشش های زیست سازگار و با اثر ضد میکروبی در بهبود زخم موثر خواهند بود. لذا به منظور سنتز سبز اکسید مس از عصاره زرشک سیاه با خاصیت ضد باکتریایی استفاده گردید و نانوذرات سنتز شده اثر ضد باکتریایی مناسبی از خود نشان دادند. تاکنون گزارشی مبنی بر سنتز نانوذرات اکسید مس در حضور عصاره زرشک سیاه و بررسی خواص ضد میکروبی آن گزارش نشده است.

نتیجه گیری

در این پژوهش، روشی ساده و موثر جهت سنتز سبز نانوذرات اکسید مس با استفاده از عصاره زرشک سیاه به عنوان عامل پوشاننده و احیا کننده نانوذرات ارائه شد. نتایج مطالعه حاضر کارایی و موثر بودن عصاره زرشک سیاه به

4. Faheem I, Sammia S, Shakeel AK, Ahmad W, Zaman S. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Abutilon indicum* leaf extract: Antimicrobial, antioxidant and photocatalytic dye degradation activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2016 May 4; 16(4): 743-53.

5. Yallappa S, Manjanna J, Sindhe MA, Satyanarayan ND, Pramod SN, Nagaraja K. Microwave assisted rapid synthesis and biological valuation of stable copper nanoparticles using *T. arjuna* bark extract. *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectrosc*. 2013 Jun 1; 110:108-115.

6. Seigneuric R, Markey L, Nuyten DS, Dubernet C, Evelo CT, Finot E, Garrido C. From nanotechnology to nanomedicine: applications to cancer research. *Current Molecular Medicine*. 2010 Oct 1; 10:640-652.

7. Liu Z, Kiessling F, Gätjert J. Advanced nanomaterials in multimodal imaging: design, functionalization, and biomedical applications. *Journal of Nanomaterials*. 2010 Jun; 2010.
8. Kwak K, Kim C. Viscosity and thermal conductivity of copper oxide nanofluid dispersed in ethylene glycol. *Korea Australia Rheology Journal*. 2005; 17:35-40.
9. Stoimenov PK, Klinger RL, Marchin GL, Klabunde KJ. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*. 2002 Aug 20; 18(17):6679-6686.
10. Sankar R, Manikandan P, Malarvizhi V, Fathima T, Shivashangari KS, Ravikumar V. Green synthesis of colloidal copper oxide nanoparticles using *Carica papaya* and its application in photocatalytic dye degradation. *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectrosc*. 2014 Mar 5; 121:746-50.
11. Atarod M, Nasrollahzadeh M, Sajadi SM. Green synthesis of Pd/RGO/Fe₃O₄ nanocomposite using *Withania coagulans* leaf extract and its application as magnetically separable and reusable catalyst for the reduction of 4-nitrophenol. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2016 Mar 1; 465(1): 249-258.
12. Nasrollahzadeh M, Sajadi SM. Preparation of Au nanoparticles by *Anthemis xylopoða* flowers aqueous extract and their application for alkyne/aldehyde/amine A³-type coupling reactions. *RSC Adv*. 2015; 5: 46240-46246.
13. Hatamifard A, Nasrollahzadeh M, Lipkowski J. Green synthesis of a natrolite zeolite/palladium nanocomposite and its application as a reusable catalyst for the reduction of organic dyes in a very short time. *RSC Advances*. 2015; 5: 91372-91381.
14. Nasrollahzadeh M, Sajadi SM, Maham M. Green synthesis of palladium nanoparticles using *Hippophae rhamnoides* Linn leaf extract and their catalytic activity for the Suzuki–Miyaura coupling in water. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2015 Jan 1; 396: 297-303.
15. Nasrollahzadeh M, Sajadi SM, Rostami-Vartooni A, Alizadeh M, Bagherzadeh MJ. Green synthesis of the Pd nanoparticles supported on reduced graphene oxide using barberry fruit extract and its application as a recyclable and heterogeneous catalyst for the reduction of nitroarenes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2016 Mar 15; 466:360-368.
16. Nasrollahzadeh M, Sajadi SM, Maham M. *Tamarix gallica* leaf extract mediated novel route for green synthesis of CuO nanoparticles and their application for N-arylation of nitrogen-containing heterocycles under ligand-free conditions. *RSC Advances*. 2015; 5:40628-40635.
17. Nasrollahzadeh M, Maham M, Sajadi SM. Green synthesis of CuO nanoparticles by aqueous extract of *Gundelia tournefortii* and evaluation of their catalytic activity for the synthesis of N-monosubstituted ureas and reduction of 4-nitrophenol. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015 Oct 1; 455:245-253.
18. Ahamed M, Alhadlaq HA, Majeed Khan MA, Karuppiah P, Al-Dhabi NA. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*. 2014 Jan 1; 2014:17-17.
19. Timothy C, Birdsall ND, Gregory S, Kelly ND. Berberine: Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Alternative medicine review. A Journal of Clinical Therapeutic*. 1977; 2(2):94-103.
20. Khosrokhavar R, Ahmadiani A, Shamsa F. Antihistaminic and anticholinergic activity of methanolic extract of barberry fruit (*Berberis vulgaris*) in the guinea-pig ileum. *Journal of Medicinal Plants*. 2010; 9(35):99-105.
21. Fatehi M, Saleh TM, Fatehi-Hassanabad Z, Farrokhfal K, Jafarzadeh M,

Davodi SA. Pharmacological study on *Berberis vulgaris* fruit extract. *Journal of ethnopharmacology*. 2005 Oct 31; 102:46-52.

22. Imanshahidi M, Hosseinzadeh H, Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. *Phytotherapy Research*, 2008 Aug; 22(8):999-1012.

23. Sabir M, Bhide NK. Study of some pharmacological actions of berberine. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1971 Jul; 15(3):111-32.

24. Shamsa F, Ahmadiani A, Khosrokhavar R. Antihistaminic and anticholinergic activity of barberry fruit (*Berberis vulgaris*) in the guinea-pig ileum. *Journal of Ethnopharmacology*, 1999 Feb 1; 64(2):161-166.

25. Abootorabi Z, Poorgholami M, Hanafi-Bojd MY, Hoshyar, R. Green synthesis of gold nanoparticles using Barberry and Saffron extracts. *Modern Care Journal*. 2016 Oct 31; 13(4): e13000.

26. Anzabi, Y. Biosynthesis of ZnO nanoparticles using barberry (*Berberis vulgaris*) extract and assessment of their physico-chemical properties and antibacterial activities. *Green Processing and Synthesis*. 2018 Apr 1; 7(2):114-121.

27. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Oregon; Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014.

28. Shanbhag TV, Sharma C, Adiga S, Bairy LK, Shenoy S, Shenoy G. Wound healing activity of alcoholic extract of *Kaempferia galanga* in Wistar rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2006 Oct 1; 50(4):384-90.

29. Parivar K, Yaghmaei P, Hayati RN, Mohammadi MP. Effects of synchronized oral administration and topical application of Kombucha on third-degree burn wounds

regeneration in mature rats. *Medical Sciences*. 2012 Apr 1; 22(1):1-11

30. Mohamed H. One year prevalence of critically ill burn wound bacterial infections in surgical ICU in Egypt: Retrospective study. *Egyptian Journal of Anaesthesia*. 2016 Jul 1; 32(3):431-4.

31. Cullity BD, Elements of X-ray Diffraction, 2nd edition. Addison Wesley Publishing, London. 1978.

32. Villani M, Alabi AB, Coppede N, Calestani D, Lazzarini L, Zappettini A. Facile synthesis of hierarchical CuO nanostructures with enhanced photocatalytic activity. *Crystal Research and Technology*. 2014 Aug; 49(8):594-8.

33. Alizadeh H, Salouti M, Shapouri R. Bactericidal effect of silver nanoparticles on intramacrophage *brucella abortus* 544. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2014 Mar; 7(3): e9039.

34. Gottenbos B, vander Mei HC, Klatter F, Nieuwenhuis P, Busscher HJ. In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber. *Biomaterials*. 2002 Mar 1; 23(6):1417-23.

35. Ahani, S, Moayer, F, Khosravi Dehaghi, N. Effect of hydro-alcoholic extract of barberries (*Berberis vulgaris*) on wound healing process in rats. *Journal of Animal Philology and Development*. 2023; 16(2): 12-26. (Persian)

36. Ghahremani, F, Izanloo, C. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using extract of *Hypericum perforatum* and *Marrubium vulgare* and evaluation of antioxidant properties of herbal extracts and antibacterial feature of green-synthesized nanostructures. *Journal of Nanomaterials*. 2020; 12(44): 239-249. (Persian)

37. Ebrahimi, K. Synthesis of copper nanoparticles using aqueous extract of *Postia puberula* flora and evaluation of their antimicrobial activity. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of*

Biology), 2018 Dec 22; 31(4): 437-445. (Persian)

38. Shankar, Sh, Jong-Whan, R. Effect of copper salts and reducing agents on characteristics and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Materials Letters*. 2014; 132:307–311

39. Murugan ,V, Sadhasivam, S. Glucosamine functionalized copper nanoparticles: preparation, characterization and enhancement of anti-bacterial activity by ultraviolet irradiation. *Chemical Engineering Journal*. 2012 Oct 1; 209:558-567.

40. Amjady, F, Golestani, B, Karimi, F. An investigation of the effect of copper oxide nanoparticles on E. coli genome by RAPD molecular markers. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 2016 Feb 20; 28(4): 475-487. (Persian)

41. Golestani B, Jafari A, karimi F. An investigation of the effect of copper oxide nanoparticles on Salmonella tifi morum genome by RAPD molecular markers. *Modares Journal of Biotechnology*, 2016 Sep 10; 7 (2) :80-90. (Persian)



Investigation of antimicrobial properties of green synthesized CuO nanoparticles using *Berberis integerrima* aqueous extract on infected surgical wound caused by *Staphylococcus aureus*

Parvin Eskandari¹, Faeze Naghilonia², Reza Shapouri³, Mahdi Arfaei⁴

1- Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Zanzan Branch, Islamic Azad University, Zanzan, Iran.

2- Phd student in Organic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Zanzan Branch, Islamic Azad University, Zanzan, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Zanzan Branch, Islamic Azad University, Zanzan, Iran.

4- BSc student in Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Zanzan Branch, Islamic Azad University, Zanzan, Iran.

Received: 2022.04. 20

Accepted: 2022.06.15

Abstract

Background & Aims: CuO is one of the most important transition metal oxides due to its interesting properties. It is used in various technological applications such as high critical temperature superconductors, gas sensors, photocatalyst, and so on. *Staphylococcus aureus* bacteria causes a wide range of infectious diseases. In this study, the antimicrobial activity of the synthesized copper oxide nanoparticles in the presence of *Berberis integerrima* aqueous extract on the infected surgical wound caused by this bacterium was investigated in mice.

Materials and methods: First, copper oxide nanoparticles were synthesized in the presence of *Berberis integerrima* aqueous extract and confirmed by XRD, FT-IR, FE-SEM analyses, and the MIC and MBC levels of the nanostructures used were determined by the dilution method in Mueller Hinton Broth culture medium. Also, after creating a skin wound and inoculating the solution of *Staphylococcus aureus* bacteria with a concentration of (5×10^5 CFU/ml), the concentration of MBC along with Eucerin ointment was checked on the infected wounds.

Results: In general, copper oxide nanoparticles synthesized in the presence of *Berberis integerrima* aqueous extract has a significant antimicrobial activity to control the growth of *Staphylococcus aureus* bacteria. Also, the synthesized copper oxide has a favorable antimicrobial and reparative effect on the infected surgical wound caused by this bacterium.

Conclusion: According to the findings, copper oxide nanoparticles can be effectively and efficiently synthesized by *Berberis integerrima* aqueous extract in simple and environmentally friendly conditions. It also has a significant antibacterial effect on *Staphylococcus aureus* bacteria and has a favorable reparative effect compared to Eucerin ointment. Copper oxide nanoparticles can be expected to play an effective role in the treatment of microbial infections.

Key words: *Berberis integerrima*, copper nanoparticles, Eucerin, mice, *Staphylococcus aureus*.