Journal of Microbial World
Volume 13, No. 4, January 2021

Short Communication

Antibacterial effect of silver nanoparticles synthesized from the red algae *Gracilaria gracilis*

Mohammad hossein zamani kochesfehani[1], Somayeh Ataei jaliseh[2], Maryam zamani kochesfehani[3]

[1]MSc, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
[2]Assistant professor, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
[3]MSc, Department of Biology, Faculty of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran.

Abstract

Silver nanoparticles (Ag-np) have high penetration and antimicrobial effect due to their high surface-to-volume ratio. The aim of this study was to biosynthesize silver nanoparticles with red algae extract, *Gracilaria gracilis*, and to investigate their antibacterial activity against a number of standard and drug-resistant *pathogenic bacteria.* First, Ag-np were synthesized. To confirm the structure and size of Ag-np, was used X-Ray diffraction spectroscopy, FE-SEM electron microscopy, and X-ray energy dispersive spectroscopy (EDS). The antimicrobial effects of algae extract on bacteria were determined by sequential dilution method. The size of nanoparticles under electron microscopy was between 12 and 46 nm. The nanoparticles were able to inhibit most of standard and antibiotic resistant bacteria, Ag-np at a concentration of 29 µg /ml, on the standard bacteria: *S. typhimorium, E. coli*, *K. pneumonia* and the clinically resistant bacteria, *E. coli* and *K. pneumonia*, they had the most inhibitory effect. In contrast, standard and clinically resistant isolates of *S. aureus* and standard strain *S. pneumonia* were resistant to Ag-np. The results of this research showed that the *G. gracilis* red algae as a bio-source that can be useful for green synthesis of silver nanoparticles at very low cost applications, these nanoparticles can be used as candidates for drug composition.

Keywords: Silver nanoparticles, *Gracilaria gracilis*, XRD, EDS.

Received: 30 May 2020 Revised: 13 September 2020 Accepted: 15 December 2020

Correspondence to: Somayeh Ataei jaliseh

Tel: 09111433511

E-mail: Atayi.somayeh@yahoo.com

Journal of Microbial World 2021, 13(4): 369-378.

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال سیزدهم شماره چهارم (پیاپی ٤٥) زمستان ١٣٩٩
صفحات ٣٧٨-٣٦٩

Short Communication

اثر ضد باکتریایی نانو ذره نقره سنتز شده از جلبک قرمز *گراسیلاریا گراسیلیس*

محمد حسین زمانی کوچصفهانی[1]، سمیه عطائی جلیسه[2*]، مریم زمانی کوچصفهانی[3]

[1] کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران. [2] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران. [3] کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

چکیده

نانوذرات به دلیل نسبت بالای سطح به حجم، قدرت نفوذ و اثر ضدمیکروبی بالایی دارند. این مطالعه با هدف سنتز زیستی نانوذرات نقره با عصاره جلبک قرمز *گراسیلاریا گراسیلیس* (*Gracilaria gracilis*) و بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن انجام شد. ابتدا نانوذرات نقره سنتز گردید. برای تایید ساختار و اندازه نانوذرات نقره تولید شده از دستگاه پراش پرتو ایکس، میکروسکوپ الکترونی نگاره (FE-SEM) و دستگاه طیف سنجی پراکندگی انرژی پرتو ایکس (EDS) استفاده شد. بررسی اثرات ضد میکروبی نانو ذره با روش رقیق سازی متوالی صورت پذیرفت.

اندازه نانو ذرات در زیر میکروسکوپ الکترونی بین ١٢ تا ٤٦ نانومتر بود. نانوذرات توانستند اغلب باکتری‌های استاندارد و مقاوم به آنتی بیوتیک مورد بررسی را مهار کنند. نانوذرات نقره در غلظت ٢٩ میکروگرم بر میلی لیتر، بر روی باکتری‌های استاندارد *کلبسیلا نمونیه*، *اشریشیا کلی*، سالمونلا *تایفی موریوم* و باکتری‌های بالینی مقاوم *کلبسیلا نمونیه* و *اشریشیا کلی* بیشترین اثر مهاری را داشتند. در مقابل، جدایه‌هایی استاندارد و بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* و استاندارد *استرپتوکوکوس نمونیه* نسبت به نانو ذرات نقره مقاوم بودند.

واژگان کلیدی: نانو ذرات نقره، *گراسیلاریا گراسیلیس*، XRD، EDS.

دریافت مقاله: ١٣٩٩/٣/١٠ ویرایش مقاله: ١٣٩٩/٦/٢٠ پذیرش مقاله: ١٣٩٩/٩/٢٥

مقدمه

در سال‌های اخیر نانوذرات فلزی به دلیل کاربردهای متنوع در زمینه‌های مختلف، بطور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (٢١). روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی به منظور سنتز نانوذرات نقره وجود دارند. اما یکی از معایب این روش‌ها، استفاده از عوامل احیا کننده و مصرف انرژی است که از یک سو برای سلامتی انسان و محیط زیست خطرات بالقوه دارند و از سوی دیگر در تولید آن‌ها در مقیاس صنعتی هزینه بر بوده و توجیه اقتصادی ندارند (٣). بنابراین با توجه به مشکلات عمده‌ای که در روش‌های شیمیایی و فیزیکی برای تولید نانوذرات وجود دارد، سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از میکروارگانیسم‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و جلبک‌ها جایگزین مناسبی محسوب می‌شود (٢٤).

از بین این عوامل زیستی، جلبک‌ها به ویژه ماکروجلبک‌ها جایگاه بهتری را به خود اختصاص داده اند. چرا که این منابع دریایی، به صورت طبیعی در دسترس و دارای منابع مهم فیتوشیمیایی از جمله کاروتنوئیدها، پروتین‌ها، اسیدهای چرب ضروری، پلی ساکاریدها، ویتامین‌ها و مواد معدنی هستند،

*) آدرس برای مکاتبه: گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.
تلفن: ٠٩١١١٤٣٣٥١١ پست الکترونیک: Atayi.somayeh@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

همچنین نانوذراتی تولید می‌کنند که پایداری بالایی داشته، و به آسانی قابل دستکاری هستند (۲٤).

استفاده بسیار از آنتی بیوتیک‌ها برای از بین بردن باکتری‌ها، سبب مقاوم شدن آنها به آنتی بیوتیک و گسترش بیماری‌های عفونی شده است. بعلاوه مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌ها بعنوان یک شاخص مهم بهداشتی و تهدیدی برای سلامتی محسوب می‌شود که عامل قابل توجهی در شیوع عفونت‌های بیمارستانی دارد. از بین باکتری‌های گرم منفی که ایجاد عفونت‌های بیمارستانی می‌کنند می‌توان به باکتری‌های *سودوموناس*، *اسینتوباکتر* و از بین باکتری‌های گرم مثبت نیز می‌توان به جنس‌های *استافیلوکوکوس* و *انتروکوکوس* اشاره کرد (۲۲و۳٤). بنابراین جستجوی موادی با خاصیت ضد باکتریایی (نسل جدید داروهای ضد باکتری) به منظور ممانعت از رشد باکتری‌ها و از بین بردن باکتری‌های مقاوم به دارو بسیار ضروری می‌باشد (۱۰). در این میان می‌توان به فرآورده‌های دارویی که بوسیله نانوتکنولوژی تهیه شده اند اشاره کرد. قبلا نانو ذرات نقره به عنوان باکتری کش موثر در برابر باکتری‌های وسیع الطیف، از جمله باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت معرفی گردیده است (۱٤).

از آنجا که سنتز نانو ذرات با استفاده از جلبک‌ها کمتر شناخته شده است، از این رو هدف از این پژوهش، سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از ماکروجلبک *گراسیلاریا گراسیلیس* و بررسی اثر ضد باکتریایی آن می‌باشد.

روش کار

الف) نمونه برداری و آماده سازی نمونه‌ها: برای این مطالعه آزمایشگاهی، ابتدا نمونه برداری از جلبک *گراسیلاریا گراسیلیس* (از خانواده Rhodophyceae) در فصل بهار سال ۱۳۹۷ از سواحل جنوبی دریای خزر، منطقه سیسنگان واقع در ۲۰ کیلومتری شهر نوشهر (به مختصات جغرافیایی ۳٦/۳۵ درجه شمالی و ۵۱/٤۸ درجه غربی) انجام پذیرفت. نمونه‌های جمع آوری شده در کیسه‌های نایلونی حاوی آب دریا نگه داری و سپس به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت منتقل گردید و توسط متخصصان مربوطه شناسایی شد. سپس به منظور از بین بردن گل و لای، نمک و سطوح چسبیده بر روی آن‌ها، چند مرتبه با آب معمولی و سپس با آب مقطر شسته شدند. نمونه‌ها توسط متخصصان مربوطه از روی خصوصیات ظاهری و ریخت شناسی به کمک کلیدهای شناسایی معتبر (۱) شناسایی گردید. در مرحله بعد نمونه‌ها توسط دستگاه فریز درای (مدل آلفا ساخت کشور آلمان) به مدت ۱۸ ساعت خشک شد و با آسیاب برقی پودر گردید.

ب) عصاره گیری جلبک: برای تهیه عصاره آبی، ۵ گرم از پودر جلبک قرمز به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٦۰ درجه در حمام آب قرار گرفت و سپس محلول دو بار به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. پس از سرد شدن، محلول رویی با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک فیلتر شد. عصاره آبی جلبک برای آزمایشات بعدی در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شد (۱۱).

ج) سنتز نانو ذرات نقره: برای تولید نانوذرات نقره از محلول نیترات نقره به عنوان پیش ساز استفاده شد. به منظور احیای یون‌های Ag^{+}، ۱۰ میلی لیتر عصاره آبی جلبک را به ۹۰ میلی لیتر محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار تحت دمای ۱۲۱ درجه اضافه شد. احیای یون‌های نقره بعد از گذشت ۱۰ دقیقه، منجر به تغییر رنگ محلول از صورتی به رنگ قهوه ای گردید(۵).

د) شناسایی و تعیین ویژگی های نانوذرات تولید شده: برای تعیین ویژگی‌ها و اطمینان از تولید و کیفیت نانوذرات نقره تولید شده با استفاده از عصاره جلبک دریایی *گراسیلاریا گراسیلیس* از دستگاه طیف سنج پراش پرتو ایکس (X-Ray diffraction =XRD)، از میکروسکوپ الکترونی نگاره (Field Emission Scanning Electron Microscope= FE-SEM)، از دستگاه طیف سنجی (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy= EDS) پراکندگی انرژی پرتو ایکس (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy= EDS) استفاده شد (۱۰).

ه) بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات: فعالیت ضد باکتریایی

نانوذره سنتز شده از عصاره جلبک *گراسیلاریا گراسیلیس* در برابر گونه‌های بیماریزای استاندارد *کلبسیلا نمونیه* (*K. pneumonia* ATCC 10031)، *پروتئوس میرابیلیس* (*P. mirabilis* ATCC 43071)، *استرپتوکوکوس نمونیه* (*S. pneumonia* ATTCC 6305)، *انتروکوکوس فیکالیس* (*E. faecalis* ATCC 29212)، *انتروباکتر آئروژینوزا* (*E. aeruginosa* ATCC 13048)، *شیگلا فلکسنری* (*S. flexneri* ATCC 12022)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*S. aureus* ATCC 25923)، *سودوموناس آئروژینوزا* (*P. aeruginosa* ATCC 27853)، *اشریشیا کلی* (*E. coli* ATCC 2592) و *سالمونلا تیفی موریوم* (*S. typhimurium* ATCC 0298). ۵ جدایه باکتری‌های مقاوم به چند دارو (Multidrug Resistant) *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سیتروباکتر فرندیی* (*C. freundii*)، *کلبسیلا نمونیه* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار گرفت. تمامی میکروارگانیسم‌ها از شرکت رویان سنجش پارسیان تهران تهیه شده بودند.

برای یافتن جدایه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک تعدادی نمونه جمع آوری گردید. این نمونه‌ها جهت کشت بر روی محیط‌های بلاد آگار و EMB انتقال داده شد. به منظور تعیین هویت گونه‌های باکتری از آزمون‌های متعدد ریخت شناسی و افتراقی بیوشیمیایی استفاده شد (۲۵ و ۳۲).

برای سنجش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها از روش دیسک دیفیوژن و ۹ نوع آنتی بیوتیک نیتروفورانتوئین (FM) (۳۰ میکروگرم)، پی پنسیلین تروبیسیتام (PTZ) (۲۰میکروگرم)، ایمیپنم (IMP) (۳۰میکروگرم)، سفپیم (FEP) (۳۰ میکروگرم)، آمیکاسین (AN) (۲۰میکروگرم)، سفتازیدیم (CAZ) (۲۰میکروگرم)، تری متوپریم - سولفامتوکسازول (SXT) (۳۰میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (CP) (۳۰میکروگرم)، جنتامایسین (GM) (۳۰میکروگرم) استفاده شدند. میزان حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد بر اساس استاندارد CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute) سال ۲۰۲۰ مشخص شد. جدایه‌های دارای الگوی مقاومتی چند دارویی (MDR) بر اساس وجود مقاومت به سه یا بیشتر آنتی بیوتیک از خانواده‌های مختلف تفسیر گردید (۱۸).

ی) تعیین *حداقل غلظت بازدارندگی* (*Minimum Inhibitory Concentration= MIC*): آزمون حداقل غلظت بازدارندگی با روش میکرو دایلوشن با استفاده از پلیت‌های ۹۶ خانه انجام گرفت. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث در چاهک ها ریخته شد سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از نانو ذرات با غلظت اولیه ۰/۰۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر (۲) را به چاهک‌های ردیف اول اضافه نموده و پس از مخلوط کردن نانو ذره با محیط کشت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول را برداشته و به ردیف دوم اضافه گردید و از ردیف دوم به سوم و به همین ترتیب تا ردیف دهم نانو ذره ها رقیق شد. از ردیف دهم ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و بیرون ریخته شد. آنگاه از سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند رقت ۱:۱۰۰ تهیه گردید و به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به همه چاهک‌ها اضافه گردید.

ردیف شماره یازده حاوی محیط کشت و سوسپانسیون باکتری بوده که به عنوان کنترل مثبت و ردیف شماره دوازده به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. سپس پلیت را در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت گرماگذاری کرده و برای تعیین MIC میزان کدورت چاهک‌ها که بیانگر مقدار رشد باکتری خوانده شد. MIC برابر است با حداقل غلظتی از یک ماده ضد میکروبی که برابر است با حداقل غلظت از ماده ضد میکروبی که درآن رشد قابل رویتی مشاهده نشود (۳۱).

و) سنجش حداقل غلظت کشندگی (*Minimum Bactericidal Concentration= MBC*): به منظور سنجش MBC از چاهک‌هایی که حاوی عصاره جلبک با غلظتی بالاتر از MIC بودند، نمونه برداری گردید. بدین ترتیب که ۵۰ میکرولیتر از چاهک‌های مذکور توسط سمپلر نمونه برداری شده و در محیط نوترینت آگار کشت داده شد و پس از ۲٤ ساعت گرماگذاری رشد یا عدم رشد باکتری بر روی پلیت‌ها بررسی گردید. کمترین رقتی که باکتری نتوانست در مجاورت آن مواد ضد میکروبی در نظر گرفته شد.

نتایج

الف) سنتز نانو ذرات نقره: پس از اضافه نمودن نیترات نقره به عصاره جلبک *گراسیلاریا* در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس احیای یون‌های نقره پس از ۱۰ دقیقه مشاهد شد و منجر به تغییر رنگ محلول از صورتی به قهوه ای روشن گردید. این تغییر رنگ نشان از احیای یون‌های نقره و تولید نانو ذرات نقره است.

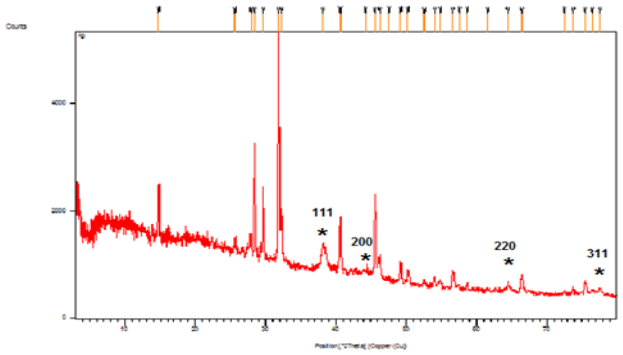
ب) آنالیز پراش پرتو ایکس: آنالیز XRD به منظور اثبات نانوکریستال‌های فلزی نقره انجام گرفت. بر اساس یافته‌های بدست آمده که در شکل ۱ نشان داده شده است، الگوی XRD نمونه پودری نانو ذرات نقره در سطوح ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰ و ۳۱۱ پیک‌هایی با مقادیر ۳۸/۱°، ٤٤/١°، ٦٤/٤° و ۷۳/۷° را نشان داد که با نمونه‌های استاندارد نانو کریستال نقره کاملا هم خوانی دارد (۲۸).

ج) آنالیز FE-SEM و طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس: برای بررسی مورفولوژی سطح و اندازه نانوذرات نقره سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی FE-SEM استفاده شد. تصاویر بدست آمده وجود نانو ذرات نقره را تایید کرده و اندازه آنها را حدود ۱۲ تا ٤٦ نانومتر مشخص نمود (شکل ۲).

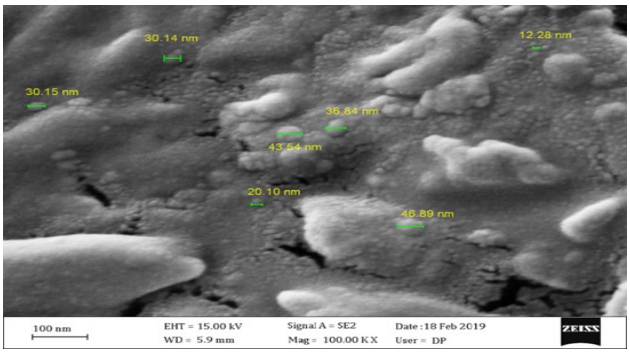
طیف پراش انرژی (EDS) حضور عناصری مانند فلز نقره، کربن، پتاسیم، نیتروژن، اکسیژن و گوگرد را در نانو ذرات حاصل از جلبک قرمز *گراسیلاریا* نشان داد (شکل ۳).

د) فعالیت ضد میکروبی نانو ذره نقره: تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره جلبک *گراسیلاریا گراسیلیس* بر اساس نتایج آنتی بیوگرام در نهایت ۵ جدایه باکتری مقاوم به ۹ آنتی بیوتیک *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سیتروباکتر فرندیی*، *کلبسیلا نمونیه* و *سودوموناس آئروژینوزا* شناسایی و جداسازی شد و در ادامه برای ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره مورد استفاده قرار گرفتند.

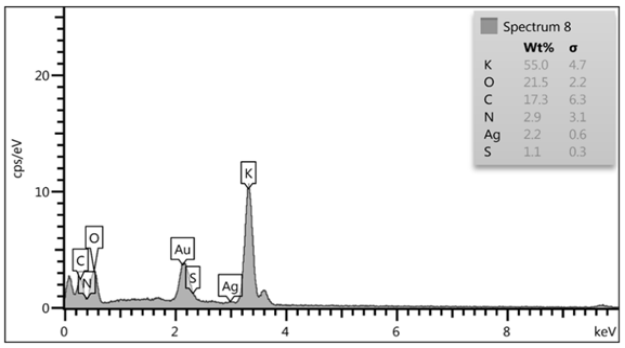
در بررسی خاصیت ضد باکتریایی نانو ذره، نشان داد که نانو ذره نقره سنتز شده از عصاره *گراسیلاریا گراسیلیس* دارای خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌باشد.



شکل ۱: XRD از نانودرات نقره سنتز شده توسط *گراسیلاریا گراسیلیس*



شکل ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره جلبک *گراسیلاریا گراسیلیس* (بزرگنمایی:۱۰۰نانومتر).



شکل۳: طیف پراش انرژی نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک قرمز *گراسیلاریا گراسیلیس*.

از بین ده باکتری استاندارد مورد بررسی، هشت باکتری نسبت به نانو ذره نقره حساسیت نشان دادند، حساس ترین باکتری‌ها *سالمونلا تیفی موریوم*، *شیگلا فلکسنری*، *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا نمونیه* ، به ترتیب، با حداقل میزان بازدارندگی و حداقل میزان کشندگی ۲۹ و ۲۹ میکروگرم بر میلی لیتر بودند. دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس نمونیه* نسبت به تیمار نانوذره مقاوم بودند.

از بین باکتری‌های مقاوم به دارو، جداسازی شده از نمونه‌های

آزمایشگاهی، چهار باکتری نسبت به نانو ذره نقره حساس بودند، اما باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* از خود مقاومت نشان داد. از بین همه باکتری‌های استاندارد مورد آزمون سویه‌های *کلبسیلا نمونیه*، *سیتروباکتر فرندیی* و *اشریشیا کلی* مقاوم به آنتی بیوتیک حساس تر از بقیه بودند و در غلظت ۲۹ میکروگرم بر میلی لیتر حداقل غلظت مهاری نسبت به نانو ذره را از خود نشان دادند (جدول ۱).

جدول ۱: MIC و MBC نانو ذره نقره سنتز شده از عصاره *گراسیلاریا گراسیلیس* در برابر باکتری‌ها

باکتری ها	MIC(µg/ml)	MBC(µg/ml)
S. aureus ATCC 25923	–	–
S. Pneumonia ATCC 6305	–	–
P. aeruginosa ATCC 27853	230	230
S. typhimorium ATCC 0298	29	29
E. aeruginosa ATCC 13048	230	230
S. flexrneri ATCC 12022	29	58
E. coli ATCC 25922	29	29
E. feacalis ATCC 29212	58	58
P. mirabilis ATCC 43071	117	230
K. pneumonia ATCC 10031	29	29
S. aureus -MDR	–	–
E. coli -MDR	29	29
C. freundii- MDR	29	58
K. pneumonia- MDR	29	29
P. aeroginosa - MDR	460	460

بحث

تاکنون در مطالعات مختلفی از روش‌های زیستی برای سنتز نانو ذرات نقره با کمک عصاره جلبک‌ها و اثرات ضد سرطانی و ضد باکتریایی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته شده است. مطالعه پروین (Parveen) و لاکشمی (Lakshmi) اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره احیا شده با عصاره جلبک قرمز *آمفیروآ فراجیلیسیما* (*Amphiroa fragilissima*) را نشان دادند. آن‌ها نقش گروه‌های آمین، پپتید، فلاونوئید، ترپنوئید و متابولیت‌های ثانویه را در پایدارسازی و سنتز نانوذرات نقره مرتبط دانستند (۲۰). در تحقیقی بیوسنتز نانوذرات نقره با اندازه ۱۲۲ نانومتر با استفاده از احیای عصاره جلبک *گراسیلاریا کراسا* (*Gracilaria crassa*) انجام و خواص ضد باکتریایی آن علیه باکتری‌های پاتوژن مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۶).

در مطالعه حاضر برای سنتز سبز نانوذرات نقره، از عصاره جلبک *گراسیلاریا گراسیلیس* استفاده شد. پس از افزودن عصاره جلبک قرمز به محلول نیترات نقره بعد از ده دقیقه رنگ محلول به قهوه ای تغییر یافت که ایجاد نانوذرات نقره را اثبات می کند. مالوانی (Mulvaney) گزارش داد که تغییر رنگ بخاطر القای لرزش پلاسمای سطحی در نانوذرات فلزی است و تغییر نیترات نقره را به نانوذرات نقره نشان می‌دهد (۱۹). طبق گزارش مدینا–رامیرز (Medina-Ramirez) و همکاران در سال ۲۰۰۹ ایجاد نانوذرات نقره به میان کنش آب دوستی– آبگریزی مربوط است که به نیروهای بین مولکولی منجر می‌گردد (۱۸). این تغییر رنگ با نتایج حاصل از کومار (Kumar) و همکاران مطابقت می‌کند و از اولین نشانه‌های تولید نانوذرات نقره محسوب می‌شود (۱۵). با توجه به مقالات، مشکل بزرگ تولید نانو ذرات زیستی، سرعت پایین تولید آنهاست، اما عصاره جلبک قرمز طی ده دقیقه سنتز نانوذرات نقره وتغییر رنگ محلول را شروع می‌کند و تا مدت‌ها رنگ محلول ثابت می‌ماند (۲۵).

الگوی طیف XRD نانو ذرات تولید شده، ساختار کریستالی نانو ذرات نقره را تایید می‌کند (شکل۲). پیک‌های شاخص °۳۸/۱، °۴۴/۱، °۶۴/۴، °۷۳/۷ مربوط به ساختار کریستالی نانوذرات نقره می‌باشند و بیانگر استاندارد ساختار مکعبی با وجوه مرکز پر (FCC) می‌باشند. بنابراین اطمینان حاصل شد که فلز تولید شده نانو کریستال‌های نقره هستند.

نتایج بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (FE-SEM) در رابطه با نانوذرات نقره وجود این ذرات را تایید می‌کند. در پژوهش حاضر، اندازه ذرات اکثرا حدود ۲۰ تا ٤۰ نانومتر بوده است. مطالعات نشان داده اند که مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، فنل ها و فلاونوئیدها و برخی ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در جلبک‌های دریایی قادر به احیا یون‌های فلزی به فرم نانو می‌باشند. همچنین این ترکیبات نقش مهمی در پوشش نانوذرات تولید شده و پایداری آنها ایفا می‌نمایند (۳۰).

طیف EDS احیای یون‌های نقره را به نانوکریستال‌های عنصر فلز اثبات کرد. جذب پیک نوری مشاهده شده تقریبا در 3keV مشخصا برای نانوکریستال‌های فلزی نقره می‌باشد که طبق گزارشات ماگوداپاتی (Magudapathy) و همکارانش بخاطر لرزش پلاسمون سطحی می‌باشد و حضور نانوکریستال‌های عنصر نقره را اثبات می‌کند (۱۵). حضور عناصری مانند کربن، پتاسیم، نیتروژن، اکسیژن و گوگرد را در نانوذرات حاصل از جلبک قرمز *گراسیلاریا* نیز مشاهده شد. بهیمبا (Bhimba) و همکارانش در سال ۲۰۱٤ نیز طی سنتز سبز نانوذرات نقره از عصاره جلبک *گراسیلاریا کورتیکا* (*G. cortica*) وجود سیگنال‌های مربوط به عناصر اکسیژن، فسفر و کربن را در آنالیز EDS مشاهده کردند (٤). این سیگنال‌ها احتمالا بخاطر پراش پرتو ایکس پروتین‌ها و قندهای موجود در جلبک می‌باشد (٤ و۷).

در این مطالعه نانوذرات نقره تولید شده با استفاده از عصاره جلبک قرمز *گراسیلاریا گراسیلیس* دارای اثر ضد میکروبی روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی بودند، حتی اثر مطلوبی بر روی باکتری‌های مقاوم به دارو از خود نشان دادند. نتایج پژوهش حاضر با نتایج دی آراگاو (de Aragao) و همکاران در سال ۲۰۱۹ که اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک *گراسیلاریا بیردیا* مورد بررسی قرار دادند همخوانی داشت (۷). همچنین نتایج پژوهش ما با سایر پژوهش‌ها مانند: سوپراجا (Supraja) و همکارن در سال ۲۰۱٦ در مورد اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره جلبک قرمز *گراسیلاریا کورتیکا* (*Gracilariacorticata*) (۲۹)، ونکاتسان (Venkatesan) و همکاران در سال ۲۰۱٦ در مورد اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره جلبک *اکلونیا کاوا* (*Ecklonia cava*) (33)، بهویار (Bhuyar) و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مورد اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده از ماکروجلبک *پادینا* (*Padina* sp.) (٦)، یوسف زادی و همکاران درسال ۲۰۱٤ در مورد تاثیر ضد میکروبی نانوذره نقره سنتز شده از عصاره جلبک سبز *انترومورفا فلکسوسا* (*Enteromorpha flexuosa*) (35) و سالاری (Salari) و همکاران در سال ۲۰۱٤ در مورد فعالیت ضد میکروبی نانوذره نقره سنتز شده از جلبک اسپیروژیرا واریانس (*Spirogyra varians*) نیز هم‌خوانی داشت(۲۸). در مطالعه ای که توسط هومبرتا (Humberto) و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مورد اثر مهاری نانوذرات نقره بر روی باکتری‌های مقاوم به چند دارو (*سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلی* مقاوم به آمپی سیلین، *استرپتوکوکوس پیوژنز* مقاوم به اریترومایسین) صورت گرفت، مشاهدات اثر باکتریواستاتیک نانوذرات نقره روی باکتری‌ها را تایید کردند. این درحالی است که *سودوموناس آئروژینوزا* دارای تعداد زیادی از فاکتورهای مقاومت آنتی بیوتیکی است که درمان آنتی بیوتیکی آن را با مشکل مواجه ساخته است (۱۲) که با داده‌های ما مطابقت دارد.

نتیجه گیری

باتوجه به نتایج این مطالعه سنتز سبز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره جلبک قرمز *گراسیلاریا گراسیلیس* به آسانی و بدون آسیب به طبیعت انجام شد که می‌تواند جایگزین خوبی برای روش‌های شیمیایی گران قیمت و مخرب محیط زیست باشد، همچنین نانو ذره سنتز شده اثرات ضد باکتریایی خوبی در برابر باکتری‌های استاندارد و همچنین مقاوم به دارو داشت البته برای معرفی این نانو ذرات نقره سنتز شده بعنوان یک جایگزین خوب برای آنتی بیوتیک‌های رایج، تحقیقات بیشتری نیاز است.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی می‌باشد. نویسندگان این مقاله از مساعدت و راهنمایی‌های پرسنل زحمت کش آزمایشگاه میکروبیولوژی بیمارستان رازی رشت کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Abbott I A and Hollenberg G. Marine Algae of California. Stanford uni press. 1976; 827p.

2. Bao H, Yu X, Xu C, Li X, Li Z, Wei D, Liu Y. New toxicity mechanism of silver nanoparticles: promoting apoptosis and inhibiting proliferation. Plos one. 2015; 10(3):547-551**.**

3. Behdad R, Mirzaie A, Zare Karizi SH. Green synthesis of silver nanoparticle using *Acroptilon repens* extract and evaluation of its anti-efflux activity against *Acinetobacter bumanni* clinical isolates. JMW. 2017; 10(3): 211-220. (In persian)

4. Bhimba B V, Kumari P R. Phytosynthesis of silver nanoparticles from the extracts of seaweed *Ulva lactuca* and its antimicrobial activity. Int J Pharm BioSci. 2014; 5: 666-677.

5. Bhimba B V, Gurung S S, Nandhini U. Marine fungus (*Aspergillus oryzae*) mediated biosynthesis of silver nanoparticles. Int. J. ChemTech Res. 2015; 7: 68-72.

6. Bhuyar P, Rahim MHA, Sundararajiu S, Ramaraj R, Maniam GP, Govindan N. Synthesis of silver nanoparticles using marine macroalgae Padina sp. and its antibacterial activity towards pathogenic bacteria. Beni- Suef Univ J Basic App Sci. 2020; 9(3): 1-15.

7. De Aragao A, De Oliveira T, Quelemes P, Perfeito M, Araujo M, Santiago J, Cardoso V, Quaresma P, De Souza de Almeida Leite J, DaSilva D. Arab J Chem. 2019; 12:4182-4188.

8. Dehghan Nayeri F, Mirhosseini M, Mafakheri S, Zarrabi MM. Antibacterial and antifungal effects of silver nanoparticles synthesized by the aqueous extract of sesame (*Sesamum indicum L.*).J. Cell. Mol. Res. 2018; 31(1):155-165.(In Persian)

9. Devi J S, Bhimba B V. Antimicrobial potential of silver nanoparticles synthesized using *Ulva recticulata*. Asian J Pharm Clin Res. 2014; 7:82-85.

10. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Trevino EA. Methods for testing antimicrobial effectiveness. In: Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM, editors. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 8th ed. St Louis: Mosby Co; 2013: 171-94.

11. Hajimehdipoor H, Khanavi M, Shekarchi M, Abedi Z, Pirali Hamedani M. Investigation of the Best Method for Extraction of Phenolic Compounds from Echinaceae purpurea L. (Moench). J. Med. Plants. 2009; 8 (32) :145-152. (In Persian)

12. Humberto H, Lara V, Humberto H, Lara V, Ayala-Nunez NV, Carmen LD, Ixtepan T, Cristina RP. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. World J Microbiol Biotechnol.2010; 26(4):615-621.

13. Ayala-Nunez NV, Carmen LD, Ixtepan T, Cristina RP. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. World J Microbiol Biotechnol.2010; 26 (4):615-621.

14. Kheybari S, Samadi N, Hosseini S, Fazeli A, and Fazeli M R. Synthesis and antimicrobial effects of silver nanoparticles. DARU. 2010; 18(3):168-172.

15. Kumar p, Senthamil Selvi S, Govindaraju M. Seaweed-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Gracilaria corticata* for its antifungal activity against *Candida* spp. Appl Nanosci.2013; 3:495–500.

16. Lavakumar V, Masilamani K, Ravichandiran V, Venkateshan N, Saigopal DVR, Ashok Kumar CK, Sowmya C. Promising upshot of silver nanoparticles primed from *Gracilaria crassa* against b andacterial pathogens. Chem Cent J. 2015; 9(42):1-8.

17. Magudapathy P, Gangopadhyay P, Panigrahi B K, Nair K G M, Dhara S. Electrical transport studies of Ag nanoclusters embedded in glass matrix. Physica B Condensed Matter. 2001; 299:142-146.

18. Medina-Ramirez T, Bashir S, Luo Z & Liu J L. Green synthesis and characterization of polymer-stabilized silver nanoparticles. Colloids Surf B Biointerfaces. 2009; 73:185-191.

19. Mulvaney P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles, Langmiur. 1996; 12:788-800.

20. National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control 2004; 32:470-785.

21. Parveen SK, Lakshmi D. Biosynthesis of silver nanoparticles using red algae *Amphiroa fragilissima* and its antibacterial potential against gram positive and gram negative bacteria. J Curr Res Sci. 2016; 19:93-100.

22. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. Am J Med. 2006; 119 (6):20-28.

23. Pourali P, Baseri Salehi M, Afsharnezhad S, Behravan J. Biological production and assessment of the antibacterial activity of gold nanoaprticles. JMW.2013; 6(3):198-211.(In persian)

24. Rahimi Z, Yousefzadi M, Noori A, Akbarzadeh A. Synthesis of silver nanoparticles usin g three marine macro algea from the Persian gulf. JOC.2014; 5(19):71-78. (In persian)

25. Ramezani F, Kazemi B, Jebali A. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Leishmania sp.* NCMBJ. 2013; 3(9):107-111. (In persian)

26. Rice LB. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. Am J Infect Control. 2006; 119 (6):62-70.

27. Sadeghi M, Assar S. An in vitro antimicrobial activity of ten Iranian-made toothpastes. Dent Res J (ISfahan). 2009; 6(2):87-92.

28. Salari Z, Danafar F, Dabaghi S, Ataei SA. Sustainable synthesis of silver nanoparticles using macroalgae *Spirogyra varians* and analysis of their antibacterial activity. J. Saudi Chem. Soc. 2014; 20:459-464.

29. Supraja N, Prasad TNVKV, Soundariya M, Babujanarthanam R. Synthesis, characterization and dose dependent antimicrobial and anti-cancerous activity of phycogenic silver nanoparticles against human hepatic carcinoma (HepG2) cell line. 2016; 3(4):425-440.

30. Suriya J, Bharathi RS, Sekar V, Rajasekaran R. Biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity using seaweed *Urospora* sp. Afr. J. Biotechnol. 2012; 11:12192-12198.

31. Tavafi H, Abdi-Ali A, Ghadam P, Gharavi S. Evaluation of thesynergistic effect of bacterial recombinant alginate lyase and therapeutic antibiotics on the growth of planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. JMW. 2019; 12(2):160-171.

32. Taylor PL., Ussher AL, Burrell RE, Impact of heat on nanocrystalline silver dressings. Part I: Chemical and biological properties. Biomaterials. 2005; 26(35):7221.

33. Venkatesan J, Kim S, Shim MS. Antimicrobial, Antioxidant, and Anticancer Activities of Biosynthesized Silver Nanoparticles Using Marine Algae *Ecklonia cava*. Nanomaterials. 2016; 6(235):1-18.

34. YaghootiKhorasani MM AS, Rezahosseini O,Assar Sh. Comparison of inhibitory dilutions of a thymol based mouthwash (ORION O) with chlorhexidine on Streptococus mutans and Streptococcus sanguis. Dent Res J (Isfahan) 2011; 7(2):122-9.

35. Yousefzadi M, Rahimi Z, Ghafori V. The green synthesis, characterization and antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from green alga *Enteromorpha flexuosa* (wulfen) J. Agardh, Adv. Mater. Lett. 2014; 137:1–4.

36. Zhang XF, liu ZG,Wei shen W, Gurunathan S. SilverNanoparticles: Synthesis, Characterization,Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. Int J Mol Sci, 2016; 17(9):1-34.