

## اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده به روش سنتز زیستی با استفاده از تراوش های بذر گیاه کهورک روی دو سویه استاندارد/شریشیاکلی با نام های K12 و 25922

مهرداد خاتمی\*<sup>۱</sup>، زهرا عزیزی<sup>۱</sup>، دکتر شهرام پورسیدی<sup>۲</sup>، دکتر امید نجاریون<sup>۳</sup>

۱- کارشناس ارشد بخش بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. ۲- دانشیار بخش بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

۳- رزیدنت مرکز توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان کودکان، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** ذرات در علم نانو اندازه‌ای در مقیاس ۱۰۰-۱ نانومتر دارند که نانوذرات نامیده می‌شوند. علاوه بر ترکیب و ساختار، ابعاد مواد نیز یکی از عوامل موثر بر خواص مواد است. با ظهور توسعه نانوتکنولوژی و با توجه به خاصیت ضد میکروبی نقره و افزایش این خاصیت در مقیاس نانو؛ می‌توان از آن در مبارزه با پاتوژن‌های مختلف انسانی نیز بهره برد. این مطالعه به منظور تعیین اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده به روش سنتز زیستی با استفاده از تراوش های بذر گیاه کهورک روی دو سویه استاندارد/شریشیاکلی با نام های K12 و 25922 انجام شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی آنالیز مشخصات نانوذرات نقره با آنالیز UV visible اسپکتروفتومتری، پراش اشعه ایکس و میکروسکوپ الکترونی عبوری انجام شد. سپس به منظور بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده، از روش رقت‌سازی لوله‌ای برات (ماکرودیلوژن) استفاده گردید. کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین غلظت باکتری کشی (MBC) نانوذرات نقره روی دو سویه استاندارد/شریشیاکلی محاسبه شد.

**یافته‌ها:** عکس الکترونی تشکیل نانوذرات را با قطری در محدوده ۳۵-۵ نانومتر با بیشترین فراوانی در محدوده اندازه ۲۵-۲۰ نانومتر نشان داد. نانوذرات نقره سنتز شده در غلظت بسیار پایین از رشد باکتری‌ها جلوگیری کرد. به طوری که برای K12 و 25922 از باکتری استاندارد/شریشیاکلی کمترین غلظت مهارکنندگی به ترتیب ۱/۵۶ و ۰/۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ppm) و کمترین غلظت باکتری کشی به ترتیب ۳/۱۲ و ۰/۷۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ppm) تعیین گردید.

**نتیجه‌گیری:** سنتز زیستی با استفاده از تراوش های بذر کهورک روشی بسیار کم‌هزینه و بدون نیاز به مصرف انرژی است. نانوذرات نقره با توجه به فعالیت شدید ضدباکتریایی می‌توانند جایگزین مناسبی برای مواد گندزد، ضد عفونی کننده و کنترل عوامل بیماری‌زا باشند.

**کلید واژه‌ها:** ماکرودیلوژن، کمترین غلظت باکتری کشی، میکروسکوپ الکترونی عبوری، کمترین غلظت مهارکنندگی

\* نویسنده مسؤول: مهرداد خاتمی، پست الکترونیکی mehrdad7khatami@gmail.com

نشانی: کرمان، انتهای بزرگراه ۲۲ بهمن، میدان پژوهش، دانشگاه شهید باهنر کرمان، بخش بیوتکنولوژی، تلفن ۰۳۴-۳۳۲۲۲۶۳۴، نمابر ۳۳۲۲۲۰۳۲

وصول مقاله: ۹۳/۴/۲۹، اصلاح نهایی: ۹۳/۸/۲۱، پذیرش مقاله: ۹۳/۱۰/۲۰

### مقدمه

اپتوالکترونیک بسیار مورد توجه محققان هستند (۳ و ۲). در زمینه تحقیقات مرتبط با علوم زیست‌شناسی نانوذرات نقره به عنوان عامل باکتری کش استفاده شده‌اند و در ردیابی DNA نیز کاربرد پیدا کرده‌اند (۵ و ۴). برای سنتز نانوذرات، روش‌های فیزیکی، زیستی و شیمیایی متفاوتی عرضه شده‌اند. از جمله روش‌های فیزیکی و شیمیایی می‌توان به روش‌های تابش الکترونی (۶)، فرسایش لیزری (۷)، امواج میکروویو (۸)، روش احیا شیمیایی (۹)، احیا الکتروشیمیایی (۱۰) و لیتوگرافی (۱۱) اشاره کرد. از جمله معایب این روش‌ها، استفاده از عوامل احیاء کننده و مصرف بالای انرژی و

ذرات با اندازه‌ای در مقیاس ۱۰۰-۱ نانومتر، نانوذرات نامیده می‌شوند. علاوه بر ترکیب و ساختار، ابعاد مواد نیز یکی از عوامل موثر بر خواص مواد است که می‌تواند موادی با خصوصیات جدید تولید نماید. با ظهور نانوتکنولوژی و با توجه به خاصیت ضد میکروبی نقره و افزایش این خاصیت در مقیاس نانو، می‌توان از آن در مبارزه با پاتوژن‌های مختلف انسانی و حیوانی نیز بهره برد. نانوذرات نقره کاربردهای فراوانی در علوم مختلف مانند پزشکی، داروسازی، فیزیک و شیمی دارند (۱). نانوذرات نقره به دلیل رسانایی خوب، پایداری شیمیایی، خواص کاتالیتیک، فتونیک و

طی سال‌های ۹۳-۱۳۹۲ انجام شد.

از نیترات نقره و محیط کشت‌های مولر هینتون برات و آگار ساخت شرکت مرک آلمان استفاده شد. بذر گیاه کهورک از محوطه دانشگاه علوم پزشکی کرمان جمع‌آوری شد.

**تهیه تراوش بذر گیاه کهورک:** ده گرم از گیاه در نظر گرفته شد. سپس برای حذف گرد و خاک و ضدعفونی سطحی، دو بار به مدت یک دقیقه با آب شسته و به مدت چهار دقیقه با محلول هیپوکلرید سدیم ۳۰ درصد ضدعفونی شد. سپس سه بار به مدت دو دقیقه با آب دوبار تقطیر استریل شستشو داده شدند. در نهایت به مدت دو دقیقه با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس سه بار به مدت دو دقیقه با آب دیونیزه استریل شستشو شدند.

برای تهیه تراوش، بذرها را ضدعفونی شده به ارلن حاوی ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه استریل اضافه شدند و به مدت دو روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و در تاریکی قرار گرفتند (۱۶). سپس بذرها بیرون ریخته شدند و مایع باقیمانده با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۴۲ فیلتر گردید و در دمای ۴ درجه سانتی گراد در تاریکی نگهداری شد. از عصاره حاصل برای سنتز نانوذرات نقره استفاده گردید.

**سنتز نانوذرات نقره:** ۵۰ میلی لیتر استوک غلیظ و ذخیره اولیه محلول نیترات نقره (۰/۱ مولار) تهیه گردید. با استفاده از استوک ذخیره تهیه شده و آب دیونیزه مقدار ۱۰۰ میلی لیتر محلول نیترات نقره با غلظت ۴ میلی مولار تهیه و به ۵۰ میلی لیتر تراوش‌های بذر گیاه کهورک همانگونه که در بالا شرح داده شده، اضافه گردید (۲۳).

**تعیین مشخصات نانوذرات:** سنتز نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه UV visible اسپکتوفتومتری جذبی از نوع Scan Drop محصول شرکت Analytik jena ساخت آلمان در محدوده طول موج ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر بررسی شدند. پراش اشعه ایکس با استفاده از دستگاه PANalytical, X PERTPRO ساخت هلند و با تابش  $1.54 =$  در زاویه ۲ تا در محدوده ۸۰-۲۰ انجام شد. برای تعیین اندازه، شکل و نحوه توزیع نانوذرات نقره عکس‌برداری الکترونی عبوری با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی مارک ZEISS ساخت آلمان (۸۰ Kb) انجام شد.

**سویه‌های میکروبی:** سویه‌های استاندارد میکروبی مورد آزمایش اشریشیاکلی ATCC K 12 و اشریشیاکلی ATCC 25922 تهیه شده از دانشگاه علوم پزشکی نارالله تهران بودند.

**رقت‌سازی لوله‌ای برات (برات ماکرودایلوشن):** اثر ضدباکتریایی به روش ماکرودیلوشن برات با تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمترین غلظت باکتری کشی (MBC) انجام شد. برای هر باکتری یک سری ۱۲ لوله‌ای از رقت‌های مختلف نانوذرات نقره

وابستگی به تجهیزات گران است که از یک طرف می‌تواند برای سلامتی انسان و محیط زیست خطرات بالقوه داشته باشند و از سوی دیگر در تولید در مقیاس صنعتی هزینه‌بر هستند و توجه اقتصادی ندارند. با توجه به هزینه‌های بالای سنتز شیمیایی آنها و افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، بررسی سنتز بیولوژیک نانوذرات نقره با صرف انرژی و هزینه بسیار کم نسبت به روش شیمیایی و بدون نیاز به حلال‌های آلی و نیز اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره حائز اهمیت است. در نتیجه روش‌های زیستی سنتز نانوذرات توسعه یافته‌اند تا نانوذراتی سازگار با محیط زیست و ارزان قیمت تولید گردد. بیوسنتز نانوذرات توسط میکروب‌ها به عنوان یک جایگزین مناسب برای روش‌های رایج شیمیایی به منظور تولید نانوذرات مورد توجه قرار گرفته است (۱۲). سنتز سبز نانوذرات نقره توسط باکتری‌ها و قارچ‌های مختلف قبلاً مورد مطالعه قرار گرفته است. از مایع رویی کشت قارچ فوزاریوم مونیلیفورم برای تولید نانوذرات نقره در مقیاس آزمایشگاهی استفاده شده است (۱۳). Klaus و همکاران (۱۴) تولید نانوذرات نقره شش ضلعی و نیز کروی را توسط باکتری سودوموناس استوتزری AG259 ثابت کرده‌اند. سنتز سبز با استفاده از گیاهان (۱۵ و ۱۶) نیز انجام شده است. در سال ۲۰۱۰ سنتز نانوذرات نقره با استفاده از پوست موز گزارش شد (۱۷). هدف از این تحقیقات یافتن روشی برای سنتز نانوذرات نقره به روشی که نه تنها نیاز به صرف انرژی نداشته باشد؛ بلکه یک منبع ارزان قیمت و قوی به عنوان کاهش‌دهنده Ag+ به AGO بوده است.

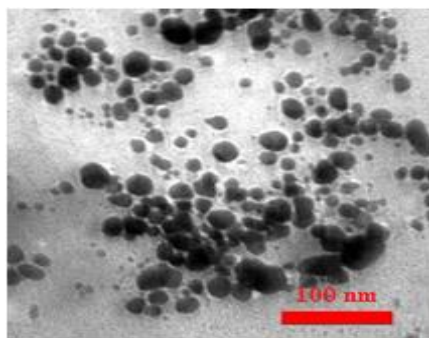
بدین منظور از تراوش‌های بذر گیاه کهورک (*Prosopis farcta*) به عنوان عامل کاهنده استفاده شد. گیاه کهورک یا جعجعه از خانواده Mimosoideae است که بومی نواحی خشک و نیمه خشک آسیا، آفریقا و آمریکا بوده و گیاهی چندساله و بوته‌ای به ارتفاع حدود ۳۰ تا ۱۰۰ سانتی متر است. خواص آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی آن به اثبات رسیده است (۱۸ و ۱۹). سویه‌های استاندارد باکتری اشریشیاکلی به عنوان یکی شایع‌ترین عوامل عفونت‌زای زخم‌های سوختگی است (۲۰-۲۲). با توجه به مقاوم شدن این سویه‌های بیماری‌زا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و نیز تولید بیوفیلم، یافتن مواد جایگزین قادر به مهار رشد آنها ضروری است. این مطالعه به منظور تعیین اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده به روش سنتز زیستی با استفاده از تراوش‌های بذر کهورک روی دو سویه استاندارد اشریشیاکلی با نام‌های K12 و 25922 به روش رقت‌سازی لوله‌ای برات انجام شد.

## روش بررسی

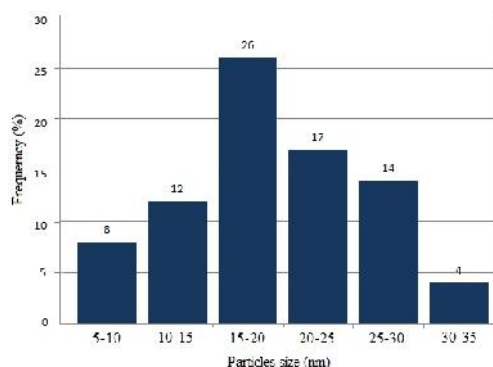
این مطالعه توصیفی به‌طور مشترک در دانشگاه علوم پزشکی بندرعباس و آزمایشگاه تحقیقاتی بیوتکنولوژی دانشگاه باهنر کرمان

سطوح ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰ و ۳۱۱ بود و تشکیل ساختار کریستالی نانوذرات نقره را نشان داد.

**عکس برداری الکترونی عبوری (TEM):** عکس الکترونی عبوری تشکیل و شکل کروی نانوذرات نقره را اثبات نمود (شکل یک). پراکنش اندازه نانوذرات مشاهده شده در عکس الکترونی در نمودار یک آمده است که به روشنی نمایانگر نانوذرات با قطری در محدوده ۳۵-۵ نانومتر با بیشترین فراوانی در محدوده اندازه ۲۵-۲۰ نانومتر است.



شکل ۱: عکس برداری الکترونی عبوری



نمودار ۱: پراکنش اندازه نانوذرات نقره سنتز شده

**جدول ۱:** اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده به روش سنتز زیستی با استفاده از تراوش‌های بذر گیاه کهورک در غلظت‌های مختلف روی دو سویه استاندارد اشریشیاکلی

<i>E.coli</i> 25922	<i>E.coli</i> K12	غلظت نانوذرات نقره (µg/ml)
-	-	۴۰۰
-	-	۲۰۰
-	-	۱۰۰
-	-	۵۰
-	-	۲۵
-	-	۱۲/۵
-	-	۶/۲۵
-	**	۳/۱۲
-	*	۱/۵۶
+ **	+	۰/۷۸
+ *	+	۰/۳۹

\* کمترین غلظت مهارکنندگی، \*\* کمترین غلظت باکتری‌کشی - عدم رشد باکتری، + رشد باکتری

تهیه شد. لوله‌ها شامل یک میلی‌لیتر محیط کشت مولر هیتون برات حاوی غلظت‌های ۸۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶، ۰/۷۸ و ۰/۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره بودند (۲۴). از کشت یک روزه باکتری‌های تحت آزمایش روی محیط کشت مولر هیتون آگار با استفاده از کلریدسدم (۰/۹ درصد)، کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و به تمامی رقت‌ها در لوله‌ها معادل یک میلی‌لیتر اضافه شد که باعث کاهش غلظت نانوذرات درون لوله‌ها به نصف گردید و غلظت‌ها به مقادیر ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶، ۰/۷۸ و ۰/۳۹

میکروگرم بر میلی‌لیتر تغییر یافتند. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت قرار گرفتند. به عنوان کنترل مثبت درون یک لوله تنها محیط کشت مولر هیتون برات همراه باکتری تلقیح و انکوبه گردید. به عنوان کنترل منفی و برای اطمینان از استریل بودن مراحل انجام کار و سوسپانسیون نانوذرات نقره سنتز شده، درون یک لوله فقط یک میلی‌لیتر محیط کشت مولر هیتون برات و در لوله دیگری یک میلی‌لیتر محیط کشت مولر هیتون برات حاوی محلول‌های نانوذرات نقره با غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. در نهایت برای تعیین اثر ضد میکروبی تراوش‌های بذر گیاه کهورک یک لوله محیط کشت حاوی غلظتی برابر همان غلظتی از تراوش‌ها که برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شده بود؛ تهیه و همراه با نمونه‌های تست انکوبه گردید. نانوذرات نقره زیستی سنتز شده در محلول آبی، به راحتی با استفاده آب دیونیزه رقیق شدند و هیچ‌گونه رسوب یا مشکلی ایجاد نکردید. پس از انکوباسیون، لوله‌های حاوی کشت باکتری‌ها، به صورت چشمی در مقابل نور مستقیم از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری بررسی شدند. برای اطمینان از مرگ سلول‌های باکتریایی و تعیین کمترین غلظت باکتری‌کشی، از لوله‌هایی فاقد کدورت ۱۰۰ میکروولتر برداشته شد و بر روی محیط مولر هیتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد. به منظور اطمینان از نتیجه آزمایش‌ها، تمامی تست‌ها سه بار تکرار و نتایج با یکدیگر مقایسه شدند.

#### یافته‌ها

**سنتز نانوذرات نقره:** نانوذرات نقره توسط تراوش‌های بذر گیاه کهورک از محلول نیترات نقره سنتز شد. تغییر رنگ عصاره از زرد روشن به خرمایی شفاف، تشکیل نانوذرات نقره را نشان داد.

**UV visible اسپکتروفتومتری:** تراوش‌های بذر گیاه کهورک تیمار شده با نیترات نقره پیک جذبی در محدوده ۴۲۱ نانومتر را نشان داد که بیانگر تشکیل نانوذرات نقره بود.

**پراش اشعه ایکس:** الگو پراش اشعه ایکس تراوش‌های بذر گیاه کهورک تیمار شده با نیترات نقره، چهار پیک مجزا در زاویه‌های ۳۸/۱۱، ۴۴/۳۸، ۶۴/۴۴ و ۷۷/۴۲ را نشان داد که به ترتیب مرتبط با

در سال ۲۰۰۹ اثر نانوذرات نقره با میانگین اندازه ذرات ۷ و ۷۰ روی اشریشیاکلی، سودوموناس اتوروس و باسیلوس سابیتیلیس ارزیابی شد و کمترین غلظت مهارکنندگی نانوذرات نقره روی هر سه سویه برای نانوذرات نقره با میانگین قطر ۷ نانومتر به ترتیب ۲، ۳ و ۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمترین غلظت مهارکنندگی برای نانوذرات نقره با میانگین قطر ۷۰ نانومتر برای اشریشیاکلی و سودوموناس اتوروس به ترتیب ۳۴ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (۲۸) که به مراتب بسیار اثر کمتری نسبت به نانوذرات نقره سنتز شده در مطالعه Khaydarov و همکاران (۲۸) داشت.

Singh و همکاران در سال ۲۰۱۴ نانوذرات نقره را با استفاده عصاره گیاه *Tinospora cordifolia* سنتز و اثر ضدباکتریایی آن را روی ۲۰ سویه بالینی سودوموناس اتروژینوزا بین ۲۰۰-۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند (۲۳). شاید دلیل این تفاوت در نتایج ارایه شده، مربوط به تفاوت ساختاری و ژنتیک گونه‌ها باشد و یا ممکن است به علت کارایی ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده با تراوش‌های بذر گیاه کهورک باشد.

با توجه به اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره تولید شده بر سویه‌های ارزیابی شده در مطالعه حاضر؛ پیشنهاد می‌شود تا به‌عنوان یه ماده ضد عفونی کننده موثر برای گندزدایی پسماندهای بیمارستانی و استریل نمودن محیط‌های اتاق عمل به کار رود.

### نتیجه گیری

سنتز زیستی با استفاده از تراوش‌های بذر کهورک روشی بسیار کم هزینه و بدون نیاز به مصرف انرژی است. نانوذرات نقره با توجه به فعالیت شدید ضدباکتریایی می‌توانند جایگزین مناسبی برای مواد گندزدا، ضد عفونی کننده و کنترل عوامل بیماری‌زا باشند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه آقای مهرداد خاتمی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی از بخش بیوتکنولوژی دانشگاه شهیدباهنر کرمان بود. بدین وسیله از جناب آقای دکتر حمیدرضا کاوسی به خاطر راهنمایی‌ها و کمک‌های بی‌دریغ در تمام مراحل پژوهش قدردانی می‌نمایم.

**اثرات ضدباکتریایی:** کمترین غلظت مهارکنندگی و کمترین غلظت باکتری کشی نانوذرات نقره روی سویه‌های استاندارد اشریشیاکلی با نام‌های K12 و 25922 محاسبه شد. به طوری که برای سویه باکتری K12 کمترین غلظت مهارکنندگی ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ppm) و کمترین غلظت باکتری کشی ۳/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. در حالی که برای سویه 25922 کمترین غلظت مهارکنندگی ۰/۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمترین غلظت باکتری کشی ۰/۷۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ppm) تعیین گردید (جدول یک). نانوذرات سنتز شده در غلظت بسیار پایین از رشد باکتری‌ها جلوگیری کرد. در حالی که تراوش‌های بذر گیاه کهورک فاقد هر گونه اثر ضدباکتریایی بود.

### بحث

با توجه به نتایج این مطالعه نانوذرات نقره با اندازه‌ای در محدوده ۳۵-۵ نانومتر با بیشترین فراوانی در محدوده اندازه ۲۵-۲۰ نانومتر دارای فعالیت شدید ضدباکتریایی تولید گردید. به علت نیازمند نبودن به منابع انرژی تولید در مقیاس صنعتی نیز روش مطالعه حاضر مقرون به صرفه است. از طرفی با مشاهده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در سویه‌های باکتریایی بیماری‌زا و کشنده، تحقیقات بسیاری برای کشف مواد جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها انجام شده است. در سال ۱۹۶۰ از نیترات نقره ۵ درصد برای درمان سوختگی‌ها استفاده شد (۲۵). با پیشرفت علم نانو تکنولوژی در سال ۲۰۰۴ نانوذرات نقره به عنوان عوامل ضد میکروبی جدید موثر بر باکتری اشریشیاکلی معرفی گردید (۲۶). در مطالعه حاضر میانگین کمترین غلظت مهارکنندگی نانوذرات نقره روی هر دو سویه استاندارد باکتری اشریشیاکلی یک میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. در گزارش‌های ارایه شده، نتایج متفاوتی حاصل شده است. Krishnaraj و همکاران نانوذرات نقره ۳۰-۲۰ نانومتری را به روش سنتز زیستی با استفاده از عصاره گیاه *Acalypha indica* تهیه کردند و کمترین غلظت مهارکنندگی روی هر دو سویه استاندارد اشریشیاکلی و ویبریو کلرایه را ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند (۲۷) که تقریباً ۱۰ برابر بیشتر از غلظت تعیین شده در مطالعه Krishnaraj و همکاران (۲۷) است.

### References

- Soltani Nejad M, Khatami M, Shahidi Bonjar GH. Extracellular synthesis gold nanotriangles using biomass of *Streptomyces microflavus*. IET Nanobiotech. 2015 Oct. doi: 10.1049/iet-nbt.2015.0028
- Shipway AN, Katz E, Willner I. Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications. Chemphyschem. 2000 Aug; 1(1): 18-52. doi: 10.1002/1439-7641(20000804)1:1<18::AID-CPHC18>3.0.CO;2-L
- Hussain S, Pal AK. Incorporation of nanocrystalline silver on carbon nanotubes by electrodeposition technique. Materials Letters. 2008; 62 (12-13): 1874-77.

doi:10.1016/j.matlet.2007.10.021

- Cho KH, Park JE, Osaka T, Park S. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochim Acta. 2005; 51(5): 956-60. doi:10.1016/j.electacta.2005.04.071
- Cao YWC, Jin RC, Mirkin CA. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. Science. 2002; 297(5586): 1536-40. doi: 10.1126/science.297.5586.1536
- Li K, Zhang FS. A novel approach for preparing silver nanoparticles under electron beam irradiation. Journal of Nanoparticle Research. 2009; 12(4): 1423-28. doi:

10.1007/s11051-009-9690-2

7. Tsuji, T, Kakita, T, Tsuji, M. Preparation of nano-size particles of silver with femtosecond laser ablation in water. *Applied Surface Science*. 2003; 206 (1-4): 314-20. doi:10.1016/S0169-4332(02)01230-8

8. Nadagouda MN, Speth TF, Varma RS. Microwave-Assisted Green Synthesis of Silver Nanostructures. *Acc Chem Res*. 2011; 44(7):469-78. doi: 10.1021/ar1001457

9. Faure C, Derre A, Neri W. Spontaneous formation of silver nanoparticles in multilamellar vesicles. *J Phys Chem B*. 2003; 107(20): 4738-46. doi: 10.1021/jp027449u

10. Zhang YH, Chen F, Zhuang JH, Tang Y, Wang D, Wang Y, et al. Synthesis of silver nanoparticles via electrochemical reduction on compact zeolite film modified electrodes. *Chem Commun*. 2002; 23: 2814-15. doi: 10.1039/B208222E

11. Jensen TR, Malinsky MD, Haynes CL, Van Duyne RP. Nanosphere lithography: tunable localized surface plasmon resonance spectra of silver nanoparticles. *J Phys Chem B*. 2000; 104(45):10549-56. doi: 10.1021/jp002435e

12. Soltani Nejad M, Khatami M, Shahidi Bonjar GH. Streptomyces somaliensis mediated green synthesis of silver nanoparticles. *Nanomed J*. 2015; 2(3): 217-22. doi:10.7508/nmj.2015.03.007

13. Ashrafi SJ, Falahati Rastegar M, Jafarpour B, Kumar SA. Use of plant pathogenic fungi *Fusarium moniliforme* for biosynthesis of silver nano particles with emphasis to time. *European Cells and Materials*. 2010; 20(3): 8.

14. Klaus T, Joerger R, Olsson E, Granqvist CG. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(24): 13611-14. doi: 10.1073/pnas.96.24.13611

15. Karimi J, Mohsenzadeh S. [Plant synthesis of silver nanoparticles by *Achillea wilhelmsii* Pharmaceutical plant]. *Razi Journal of Medical Sciences*. 2013; 20(6): 64-69. [Article in Persian]

16. Khatami M, Pourseyedi S, Khatami M, Hamidi H, Zaeifi M, Soltani L. Synthesis of silver nanoparticles using seed exudates of *Sinapis arvensis* as a novel bioresource ,and evaluation of their antifungal activity. *Bioresources and Bioprocessing*. 2015 Apr; 2(19): 1-7. doi: 10.1186/s40643-015-0043-y

17. Bankara A, Joshi B, Kumar AR, Zinjardea S. Banana peel extract mediated novel route for the synthesis of silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2010; 368(1-3): 58-63. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.07.024

18. Sharma N, Garg V, Paul A. Antihyperglycemic,

antihyperlipidemic and antioxidative potential of *Prosopis cineraria* bark. *Indian J Clin Biochem*. 2010 Apr; 25(2):193-200. doi: 10.1007/s12291-010-0035-9

19. Malik S, Mann S, Gpta D, Guptar RK. Nutraceutical properties of *Prosopis cineraria*(L.) Druce pods: A component of Panchkuta. *J Pharmacogn Phytochem*. 2013;2(2):66-73.

20. Jafar E, Shakibaie MR, Poormasoomi L. Isolation of a novel antibiotic resistance plasmid DNA from hospital isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Exp Pathol*. 2013; 3:140. doi: 10.4172/2161-0681.1000140

21. Stein GE, Schooley S, Tyrrell KL, Citron DM, Goldstein EJ. Bactericidal activities of methoxyfluoroquinolones gatifloxacin and moxifloxacin against aerobic and anaerobic respiratory pathogens in serum. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Apr;47(4):1308-12.

22. Azzopardi EA, Azzopardi E, Camilleri L, Villapalos J, Boyce DE, Dziewulski P, et al. Gram negative wound infection in hospitalised adult burn patients--systematic review and metanalysis-. *PLoS One*. 2014 Apr; 9(4): e95042. doi: 10.1371/journal.pone.0095042

23. Singh K, Panghal M, Kadyan S, Chaudhary U, Yadav JP. Antibacterial activity of synthesized silver nanoparticles from *Tinospora cordifolia* against multi drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *J Nanomed Nanotechnol*. 2014; 5:192. doi: 10.4172/2157-7439.1000192

24. Khatami M, Pourseyedi S. Phoenix dactylifera (date palm) pit aqueous extract mediated novel route for synthesis high stable silver nanoparticles with high antifungal and antibacterial activity. *IET Nanobiotechnol*. 2015 Aug; 9(4):184-90. doi: 10.1049/iet-nbt.2014.0052

25. Moyer CA, Brentano L, Gravens DL, Margraf HW, Monafa WW. Treatment of large human burns with 0.5 percent silver nitrate solution. *Arch Surg*. 1965 Jun; 90:812-67.

26. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*. 2004 Jul; 275(1):177-82.

27. Krishnaraj C, Jagan EG, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan PT, Mohan N. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010 Mar; 76(1):50-6. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.10.008

28. Khaydarov R, Khaydarov R, Estrin Y, Evgrafova S, Scheper T, Endres C, Cho S. Silver Nanoparticles. *Environmental and Human Health Impacts. Nanomaterials: Risks and Benefits. NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security*. 2009; pp: 287-97.

Original Paper

## Antibacterial effect of silver nanoparticles synthesized by green method against the standard strains *Escherichia coli* k12 and *Escherichia coli* 25922

Khatami M (M.Sc)\*<sup>1</sup>, Azizi Z (M.Sc)<sup>1</sup>, Pourseyedi Sh (Ph.D)<sup>2</sup>, Najarion O (Ph.D)<sup>3</sup>

<sup>1</sup>M.Sc, Department of Biotechnology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. <sup>2</sup>Associate Professor, Department of Biotechnology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. <sup>3</sup>Clinical Research Development Center of Children Hospital, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.

---

### Abstract

**Background and Objective:** Nano-sized particles at scale of 1 to 100 nm, called nanoparticles. In addition, the composition and structure of materials is also one of the factors influencing the material properties. With the advent of nanotechnology and due to increasing antimicrobial properties of nanoscale silver it can also be used in the fight against various human pathogens. This study was carried out to evaluate the antibacterial effect of silver nanoparticles synthesized by green method against the standard strains *Escherichia coli* k12 and *Escherichia coli* 25922.

**Methods:** In this descriptive study, silver nanoparticles were synthesized using *Prosopis farcta* seed exudates and analyzed by UV visible spectrophotometer, X-ray diffraction and transmission electron microscopy. Antibacterial effect of silver nanoparticles was evaluated using broth macro-dilution method. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles was determined on the standard strains of *Escherichia coli* k12 and *Escherichia coli* ATCC 25922.

**Results:** Transmission electron microscopy showed nanoparticles with diameters in the range between 5-35 nm with a maximum frequency range in 20-25 nm. The minimum inhibitory concentrations of bacteria, of *E. coli* k12 and *E. coli* 25922 respectively, were 1.56 and 0.39 µg/ml (ppm) and minimum bactericidal concentrations of 3.12 and 0.78 µg/ml wiring (ppm).

**Conclusion:** Biological synthesis using *P. farcta* seed is a inexpensive, method and require no energy. Due to the strong antibacterial activity of silver nanoparticles, can be a suitable alternative for disinfectants, disinfection and control of pathogens.

**Keywords:** Macro-dilution, Minimum bactericidal concentration, Transmission electron microscopy, Minimum inhibition concentration

---

\* Corresponding Author: Khatami M (M.Sc), E-mail: mehrdad7khatami@gmail.com

Received 20 Jul 2014

Revised 12 Nov 2014

Accepted 10 Jan 2015