بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره ایزوله اکتینومیست دریایی *Nocardiopsis* sp. AHA2 علیه پاتوژن‌های میکروبی

حسن علی‌جانی: دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دریا، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران. H.alijani@kmsu.ac.ir
* **سهیلا مطرودی:** استادیار و متخصص ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران (*نویسنده مسئول).s.matroodi@kmsu.ac.ir
* **علی شرفی:** استادیار و متخصص ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات زیست فناوری دارویی دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران (*نویسنده مسئول). sharafi.a@gmail.com
اسحاق زمانی: استادیار و متخصص میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران. Isaac_zf@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: نانوذرات نقره کاربردهای وسیعی در علوم دارویی و بهداشتی دارند. تولید زیستی نانوذرات نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی ساده، کم هزینه و عاری از خطرات زیست محیطی می‌باشد. هدف از این مطالعه سنتز بیولوژیکی نانوذرات نقره با استفاده از محیط کشت فاقد باکتری (سوپرناتانت) ایزوله نوکاریوپسیس AHA2 و بررسی فعالیت ضد میکروبی آن می‌باشد.

روش کار: رسوبات ساحل دیلم از عمق ۱۰ سانتی‌متری جمع‌آوری شد. رقت سازی صورت گرفت و برای جداسازی، اکتینومیست‌ها در محیط کشت SCA کشت داده شدند. پس از شناسایی ایزوله مورد نظر از محیط کشت فاقد باکتری آن برای سنتز زیستی نانوذرات نقره استفاده شد. بدین صورت که واکنش بین عصاره محیط کشت این ایزوله با نمک نیترات نقره ۰/۰۱ مولار در دمای اتاق انجام گرفت و تغییرات رنگ طی ساعات مختلف ثبت گردید. سنتز نانوذرات نقره با استفاده از اسپکتوفتومتری UV-vis و پتانسیل زتا تایید شد. اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده طی ساعات مختلف علیه میکروب‌های بیماری‌زا به روش چاهک بررسی شد.

یافته‌ها: نانوذرات نقره با استفاده از محیط کشت فاقد باکتری اکتینوباکتری نوکاریوپسیس AHA2 سنتز شد. سنتز این نانوذرات همراه با تغییر رنگ محلول از شفاف به قهوه‌ای تیره همراه بود. بیشترین میزان جذب در ۴۲۰-۴۵۰ مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: فعالیت ضدمیکروبی محلول نانوذرات نقره علیه تمام میکروب‌های بیماری زای مورد استفاده اثبات شد. اکتینوباکتری نوکاریوپسیس AHA2 می‌تواند کاندید مناسبی برای سنتز نانوذرات نقره با استفاده از نیترات نقره با اندازه بین ۳۰-۴۰ نانومتر باشد.

کلیدواژه‌ها: اکتینومیست، نانوذرات نقره، فعالیت ضدمیکروبی

مقدمه

امروزه از جمله مسائل مهمی که در درمان باکتری‌های بیماری‌زا مطرح می‌باشد به وجود آمدن سویه‌های مقاوم به دارو در بیمارستان‌ها است. بر همین اساس قسمت عمده تلاش محققان در زمینه داروسازی، کشف راه‌های جدید برای مبارزه با این پاتوژن‌ها می‌باشد. در سال‌های اخیر تعداد آنتی‌بیوتیک‌های جدید که مورد شناسایی و بهره‌برداری قرار گرفته‌اند، بسیار کم بوده و تقریباً هیچ‌کدام از آن‌ها فعالیت مناسبی علیه باکتری‌های مقاوم به چند دارو نداشته است. مطالعات نشان داده است که نانوذرات نقره دارای فعالیت ضدمیکروبی خوبی می‌باشد (۱ و ۲).

از نانوذرات نقره می‌توان به‌عنوان دارو در درمان بیماری‌های باکتریایی، قارچی، گوارشی و ... استفاده کرد (۳). نانوذرات نقره به دو روش فیزیکی و شیمیایی تولید می‌شوند. روش‌های فیزیکی و شیمیایی علاوه بر تحمیل هزینه‌های بالا، آلودگی‌های زیست‌محیطی بسیاری را به همراه دارند. امروزه تولید زیستی نانوذرات نقره، به دلیل خصوصیات منحصربه‌فرد نانوذرات تولید شده، تمایل به گسترش روش‌های سازگار با محیط‌زیست و صرف هزینه‌های کمتر، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۴). در این روش از گیاهان و میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و اکتینومیست‌ها جهت تولید نانوذرات

استفاده می‌شود. هنگامی‌که میکروارگانیسم‌ها در معرض نمک یون‌های فلزی قرار می‌گیرند، این مواد از طریق مکانیزم کاتالیستی احیا و به‌صورت داخل سلولی و یا خارج سلولی تولید می‌شوند (۸-۵).

اکتینومیست‌ها باکتری‌های غیرمتحرک، هوازی و گرم‌مثبت با محتوای گوانین و سیتوزین بالا (۸۰-۷۰٪) در ژنوم خود هستند. در همه اکوسیستم‌ها از جمله آب، خاک، رسوبات دریایی و ... حضور دارند. این میکروارگانیسم‌ها دارای پتانسیل بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، علف‌کش‌ها، مواد ضد سرطان و دیگر ترکیبات مفید می‌باشند (۹). از آنجا که شرایط محیط دریا با خشکی تفاوت زیاد دارد اکتینومیست‌های دریایی نسبت به همتایان زمینی خود آنتی‌بیوتیک‌های جدید و منحصربه‌فردی تولید می‌کنند (۱۰). نانوذرات نقره تولید شده از عصاره اکتینومیست‌ها خاصیت ضدمیکروبی و ضدسرطانی دارند و برخلاف نانوذرات نقره تولید شده به روش شیمیایی اثر سمی روی سلول‌های یوکاریوتی عالی ندارند (۱۱). هدف از این پژوهش بررسی پتانسیل عصاره محیط کشت ایزوله AHA2 در تولید نانوذرات نقره به روش خارج سلولی و همچنین بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره تولید شده علیه میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش می‌باشد.

روش کار

رسوبات بین جزر و مدی ساحل دیلم با موقعیت ۵۰ درجه و ۹ دقیقه شرقی و ۳۰ درجه و ۳ دقیقه شمالی از عمق ۱۰ سانتی‌متری توسط بیلچه جمع‌آوری شدند و در ظرف استریل و در کوتاه‌ترین زمان به آزمایشگاه منتقل شد.

برای جداسازی اکتینومیست‌ها، ۱۶ گرم از رسوب با ۱۰۰ میلی لیتر آب دریای استریل حل شد و به مدت ۱ ساعت روی شیکر قرار داده شد. نمونه‌ها تا 10^{-6} رقیق شدند و مقدار ۱ میلی لیتر از رقت‌های مختلف همراه با مقدار ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی‌بیوتیک نیستاتین و ۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر ریفامپیسین در کنار شعله، به محلول افزوده شد. از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌منظور جلوگیری از رشد باکتری‌ها و قارچ‌های احتمالی استفاده گردید. پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور به مدت ۱۰ روز قرار گرفتند. پس از گذشت ۱۰ روز، کلنی‌های متعددی بر روی همه پلیت‌ها با رقت‌های مختلف ایجاد گردید.

پس از جداسازی و شناسایی، به منظور سنتز نانوذرات نقره، ایزوله *Nocardiopsis sp. AHA2* درون ارلن حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه‌سانتی‌گراد کشت داده شد. سپس محیط کشت حاوی باکتری رشد کرده با دور ۱۲۰۰۰، در مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و از محلول رویی برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شد. مقدار ۱۰ میلی‌لتر از این محلول به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و پس از آن ۰/۰۱ مولار نمک نیترات نقره به آن افزوده شد. ارلن روی استیرر قرار گرفت تا محلول انکوبه شود و تغییرات رنگ محلول طی ۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۰۲ ساعت پس از انجام واکنش عکس برداری شد و نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از اسپکتوفتومتری UV-vis و پتانسیل زتا بررسی شد.

برای بررسی خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده از سه قارچ بیماری‌زا (آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نیجر و گونه‌ی پنیسیلیوم) و پنج باکتری بیماری‌زا (باسیلوس سرئوس، اشریشیا کلی، *کلبسیلا*، پروتئوس ولگاریس و سالمونلا تیفی) که از کلکسیون باکتری دانشگاه علوم پزشکی زنجان تهیه شد، استفاده گردید. نانوذرات ساخته شده در ساعات مختلف همراه با آب مقطر استریل و نیترات نقره ۰/۰۱ مولار (کنترل منفی) و پنی‌سیلین و نیستاتین هر کدام با غلظت‌های ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر (به‌عنوان کنترل مثبت) به ترتیب برای باکتری‌های بیماری‌زا و قارچ‌های بیماری‌زا به روش چاهک آزمایش شد.

یافته‌ها

در این تحقیق پس از جداسازی و شناسایی ایزوله اکتینومیست *AHA2* . گونه ی نوکاردیوز،

الف ب ج د ح ی

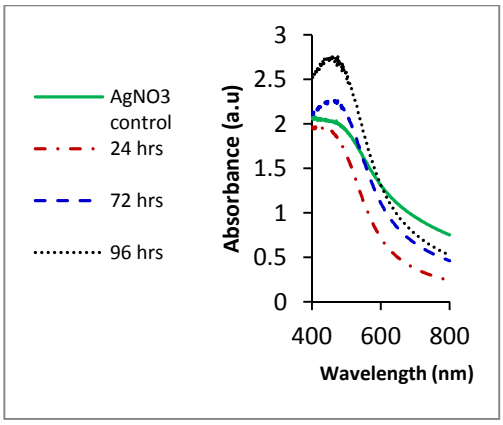
تصویر ۱- تغییر رنگ مشاهده شده در واکنش بین عصاره اکتینومیست و نیترات نقره ۰/۰۱ مولار. (الف) دو ساعت پس از انجام، (ب) ۲۴ ساعت پس از انجام، (ج) ۴۸ ساعت، (د) ۷۲ ساعت، (ح) ۹۶ ساعت و (ی) ۱۰۲ ساعت در دمای اتاق

نانوذرات نقره با اضافه کردن نمک نیترات نقره به آب مقطر حاوی عصاره ایزوله اکتینومیست *AHA2* گونه ی نوکاردیوز سنتز شد. دو ساعت پس از اضافه کردن نمک تغییر رنگ مشاهده شد. شدت تغییر رنگ با گذشت زمان افزایش یافته و همان گونه که در تصویر ۱ مشاهده می‌شود پس از ۱۰۲ ساعت از شروع آزمایش شدت تغییر رنگ به حداکثر می‌رسد. جهت تایید سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره ایزوله گونه ی نوکاردیوز *AHA2* از روش اسپکتوفتومتری UV-vis و اندازه‌گیری پتانسیل زتا استفاده شد.

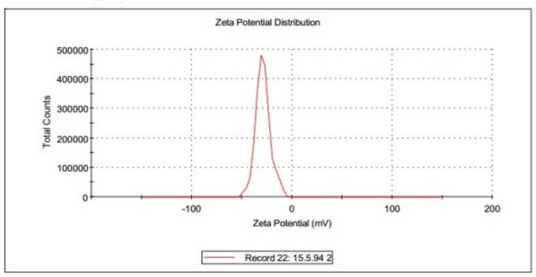
نتایج حاصل از آنالیز اسپکتروفتومتری با UV-vis نشان می‌دهد که میزان نانوذرات سنتز شده با افزایش زمان، میزان جذب محلول در طول موج حدود ۴۲۰ نانومتر افزایش می‌یابد (تصویر ۲). بر اساس آنالیز Zeta اندازه نانوذرات همان گونه که در تصویر ۳ مشاهده می‌شود، پتانسیل زتا اندازه واقعی نانوذرات سنتز شده را در حدود ۴۰-۳۰ نانومتر نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از آزمون ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده علیه پنج باکتری بیماری‌زای انسانی (اشریشیا کلی، کلبسیلا، باسیلوس سرئوس، پروتئوس ولگاریس، سالمونلا تیفی) و سه قارچ بیماری‌زای انسانی (آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نیجر و گونه ی پنیسیلیوم) به روش چاهک در جدول ۱ و تصویر ۴ نشان داده شده است.

بر اساس نتایج به دست آمده با غلظت ۰/۰۲ مولار طی ۷۲ ساعت، اثر بازدارندگی آن بر تمامی میکروارگانیسم‌ها مشاهده شد که بیشترین هاله ضد باکتریایی مربوط به کلبسیلا با اندازه ۱±۱۶/۵ میلی‌متر بود و علیه قارچ مربوط به قارچ گونه ی پنیسیلیوم با اندازه ۰/۵±۱۵/۷ میلی‌متر نشان داد. غلظت ۰/۰۱ مولار طی ۷۲ ساعت، اثر بازدارندگی آن بر تمامی میکروارگانیسم‌ها مشاهده شد که بیشترین هاله مربوط به کلبسیلا و گونه ی پنیسیلیوم به ترتیب با اندازه ۱±۱۶/۵ و ۱۶ میلی‌متر بود. همان گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، غلظت ۰/۰۱ مولار طی ۹۶ ساعت، اثر بازدارندگی آن بر تمامی میکروارگانیسم‌ها مشاهده شد که بیشترین هاله مربوط به گونه ی



تصویر ۲- طیف جذبی محلول سنتز نانوذرات نقره محیط کشت فاقد باکتری اکتینومیست AHA2 در طول موج ۴۰۰-۸۰۰ نانومتر در زمان‌های مختلف سنتز



تصویر ۳- نمودار پتانسیل زتا نانوذرات نقره سنتز شده

جدول ۱- نتایج آزمون ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده در ساعت‌های مختلف به روش چاهک ((Mean± S.D(mm)).

میکروارگانیسم	غلظت۰/۰۲ مولار-۷۲ساعت	غلظت۰/۰۱ مولار -۷۲ ساعت	غلظت۰/۰۱ مولار - ۹۶ ساعت	غلظت۰/۰۱ مولار - ۱۰۲ ساعت	غلظت۰/۰۱ مولار -نیترات نقره	آب مقطر	Pen	Nys
E. coli	۱۵±۱^{b}	۱۴±۱^{b}	۱۷±۱^{a}	۱۶/۵±۱^{a}	۱۱/۵±۰/۵^{c}	-	-	Nt
P. volgaris	۱۴^{b}	۱۲±۱^{c}	۱۲±۱^{c}	۱۲±۱^{c}	۱۲/۵±۰/۵^{c}	-	۲۰^{a}	Nt
B. cereus	۱۱/۵±۰/۵^{c}	۱۱/۵±۰/۵^{c}	۱۴±۰/۵^{ab}	۱۵±۰/۵^{a}	۱۱±۱^{c}	-	۱۳^{b}	Nt
Klebsiella sp.	۱۶/۵±۱^{b}	۱۶/۵±۱^{b}	۱۷±۰/۵^{b}	۲۱±۰/۵^{a}	۱۷/۵±۰/۵^{b}	-	-	Nt
S. typhi	۱۰/۵±۰/۵^{b}	۹/۵±۰/۵^{c}	۱۰^{bc}	۲۰±۰/۵^{a}		-	۱۰^{bc}	Nt
A. flavus	۹/۵±۰/۵^{b}	۹/۲±۰/۵^{b}	۱۰±۰/۵^{b}	۱۰/۵±۱^{b}	۷/۵±۰/۵^{c}	-	Nt	۱۲±۱^{a}
A. niger	۱۰/۷±۰/۵^{c}	۱۰/۲±۰/۵^{c}	۱۰/۵^{c}	۱۲/۷±۱^{b}	۹/۷±۰/۵^{c}	-	Nt	۱۷^{a}
Penicillium sp.	۱۵/۷±۰/۵^{c}	۱۶±۰/۵^{c}	۱۸/۵^{b}	۲۰±۱^{a}	۹/۷±۰/۶^{e}	-	Nt	۱۲±۱^{d}

Nys: نیستاتین، Pen: پنی‌سیلین، Nt: تیمار نشده است،حروف a، b و cدر هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است.

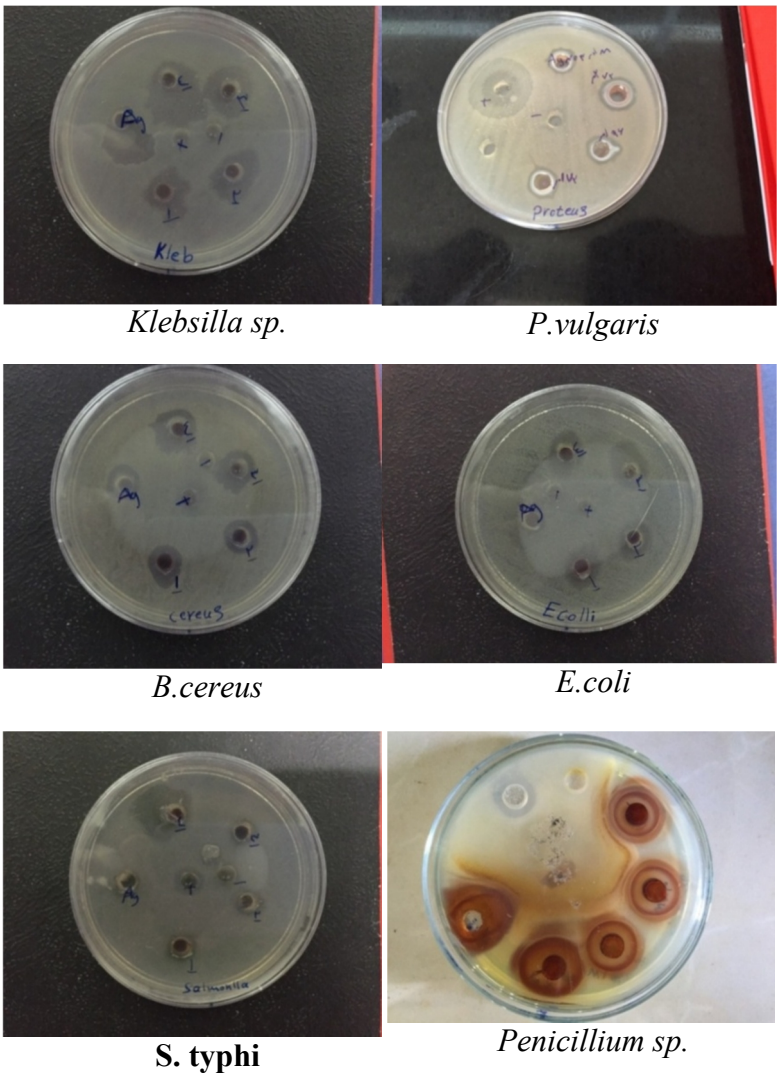
پنیسیلیوم، کلبسیلا و اشریشیا کلی به ترتیب با اندازه ۱۸/۵±۰، ۱۷±۰/۵ و ۱۷±۱ میلی‌متر بود. بر اساس نتایج به دست آمده با غلظت ۰/۰۱ مولار طی ۱۰۲ ساعت، اثر بازدارندگی آن بر تمامی میکروارگانیسم‌ها مشاهده شد که بیش‌ترین هاله مربوط به کلبسیلا، سالمونلا و گونه ی پنیسیلیوم به ترتیب با اندازه ۲۱±۰/۵، ۲۰±۰/۵ و ۲۰±۱ میلی‌متر بود. اثر باز دارندگی نانوذرات سنتز شده با غلظت ۰/۰۱ مولار نیترات نقره، اثر بازدارندگی آن بر تمامی میکروارگانیسم‌ها مشاهده شد که بیشترین هاله ضد باکتریایی مربوط به کلبسیلا با اندازه ۱۷/۵±۰/۵ میلی‌متر و ضد قارچی مربوط به قارچ‌های آسپرژیلوس نیجر و گونه ی پنیسیلیوم. به ترتیب با اندازه ۹/۷±۰/۵ و ۹/۷±۰/۶ میلی‌متر محاسبه شد.

بر اساس نتایج به دست آمده، نانوذرات سنتز شده در ۱۰۲ ساعت پس از انجام واکنش بیش‌ترین اثر مهاری را داشت و در میان باکتری‌های بیماری‌زا کلبسیلا، سالمونلا تیفی و باسیلوس سرئوس به ترتیب ۲۱±۰/۵، ۲۰±۰/۵، ۱۵±۰/۵ میلی متر بیشترین هاله‌های مهاری را نشان دادند و بیشترین اثر مهاری علیه قارچ‌های بیماری‌زا را در مقابل قارچ بیماری‌زای گونه ی پنیسیلیوم با ۱±۲۰ میلی‌متر مشاهده شد.

بحث و نتیجه گیری

در تحقیق حاضر از عصاره ایزوله AHA2 جهت سنتز نانوذرات نقره استفاده گردید. با اضافه کردن نمک نیترات نقره به آب مقطر حاوی عصاره *AHA2* در ابتدا تغییر رنگ به‌صورت ناچیز مشاهده شد و پس از طی دو ساعت محلول به رنگ قهوه‌ای تغییر یافت. این تغییر رنگ بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۰۲ ساعت شدت یافت و به حالت قهوه‌ای تیره در آمد. نتایج اسپکتوفتومتری طی ساعات ذکر شده بررسی شد و نتایج حاکی از آن بود که با افزایش زمان، افزایش میزان جذب محلول در طول موج ۴۵۰-۴۲۰ نانومتر به دلیل کاهش یون نقره و تجمع آن‌ها به‌صورت نانوذرات نقره مشاهده شد که با مطالعه چهاردولی و خدادادی روی سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره میوه بلوط مطابقت دارد.

فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده در تحقیق حاضر روی میکروارگانیسم‌های اشریشیا کلی، کلبسیلا، پروتئوس ولگاریس، سالمونلا تیفی، باسیلوس سرئوس، آسپرژیلوس نیجر، آسپرژیلوس فلاووس و گونه ی پنیسیلیوم به اثبات رسید که با نتایج چهاردولی و خدادادی که روی اشریشیا کلی انجام شده همخوانی دارد. در مطالعه Manivasagan و همکاران روی خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره *MBRC-1* گونه ی نوکاردیوز نشان داد که نانوذرات سنتز شده فعالیت ضد میکروبی علیه اشریشیا کلی (۱۳ میلی متر) و آسپرژیلوس نیجر (۱۶ میلی متر) را نشان می‌دهند (۱۱). همچنین در ابتدای سنتز نانوذرات نقره تغییر رنگ مشاهده نشد و بعد از ۲۴ ساعت تغییر رنگ به‌صورت قهوه-



Klebsilla sp. *P.vulgaris*

B.cereus *E.coli*

S. typhi *Penicillium sp.*

شکل ۴- تصاویر مربوط به فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده به روش چاهک

ای بود و نتایج اسپکتوفتومتری نشان داد که با افزایش زمان میزان جذب محلول در طول موج ۴۲۰ نانومتر افزایش یافت که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. مطالعات دیگری توسط Shirvastava و همکاران در سال (۲۰۰۷) و Gozmal و همکاران در سال (۲۰۱۲) روی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره علیه باکتری‌هایی مانند اشریشیا کلی، استافیلوکوک آرئوس و پسودوموناس آئورجینوزا نیز انجام شده و اعلام داشته‌اند که فعالیت نانوذرات نقره وابسته به غلظت بوده و برای باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت چشمگیرتر بوده است (۱۳ و ۱۴) که با تحقیق حاضر که نشان می‌دهد هاله عدم رشد باکتری‌های گرم منفی اشریشیا کلی، کلبسیلا و سالمونلا تیفی نسبت به باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس بیشتر است همخوانی دارد. این مطالعات ابراز داشته‌اند که تفاوت بین باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در مقابل نانوذرات نقره به ساختار دیواره سلولی آن‌ها مربوط می‌باشد. باکتری‌های گرم منفی دارای دیواره سلولی نازک تری هستند که استحکام کمی دارد و از طرف دیگر سطح بیرونی باکتری‌های گرم منفی لایه‌ای از لیپوپلی ساکارید وجود دارد که دارای بار منفی است. وجود بار منفی در سطح سلول باکتری بر هم کنش بین نانوذرات نقره که دارای بار مثبت ضعیف هستند را با سلول باکتری آسان‌تر می‌کند. این بر هم کنش در ابتدا باعث ایجاد منافذ در دیواره سلولی می‌شود و سپس با ورود نانوذرات به

درون سلول باکتری، در مسیر رشد سلولی باکتری تداخل ایجاد شده و در نهایت باعث مرگ باکتری می‌شود. در مطالعه Priyaragini و همکاران نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره اکتینومیست سویه *PSBVIT-13* جداسازی شده از خاک باغچه دانشگاه VIT با مشاهده تغییر رنگ از حالت شفاف به قهوه‌ای تیره و میزان جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت و در بررسی فعالیت ضد میکروبی به روش انتشار دیسک فعالیتی مشاهده نشد ولی با استفاده از روش چاهک فعالیت ضد میکروبی علیه باسیلوس سرئوسو سالمونلا تیفی هاله مشاهده شده به ترتیب ۶/۸ و ۸/۶۳ میلی‌متر گزارش شد (۱۶) که در مقایسه با نانوذرات سنتز شده طی زمان ۱۰۲ ساعت در تحقیق حاضر هاله عدم رشد کمتری را نشان می‌دهد. در مطالعه Sadhasivam در سال ۲۰۱۰ فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از استرپتومایسس هیگروسکوپیکوس علیه میکروب‌های بیمای‌زای اشریشیا کلی و کاندیدا آلبیکانز گزارش شده است. Singh و همکاران از عصاره باکتری (VDP-5) گونه ی استرپتومایسس نانوذرات نقره به روش سبز سنتز کردند و بیشترین جذب را در طول موج ۴۲۵ نانومتر مشاهده کرده و بیشترین هاله مهاری حاصل از فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری‌های بیماری زای اشریشیا کلی و باسیلوس سابتیلیس (*Bacillus subtilis*) مشاهده شده است (۱۷).

همچنین در سال ۲۰۱۵ Saminathan نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گونه ی استرپتومایسس را مورد مطالعه قرار داده و بیشترین میزان جذب را در طول موج ۴۵۰ نانومتر گزارش کرد. همچنین در این مطالعه بیشترین فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده علیه باکتری اشریشیا کلی گزارش شده است (۱۸).

بر اساس نتایج ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده در این تحقیق، با افزایش زمان، میزان جذب محلول در طول موج در حدود ۴۲۰ نانومتر افزایش یافت و همچنین فعالیت ضد میکروبی با افزایش زمان بیشتر شد. بین افزایش زمان انکوبه شدن محلول حاوی نانوذرات نقره و افزایش فعالیت ضد میکروبی ارتباط مستقیم وجود دارد که نشان می‌دهد با افزایش زمان، یون‌های نقره فرصت بیشتری برای تبدیل شدن به نانوذرات نقره دارند.

اختلافات بین نتایج فعالیت ضد میکروبی عصاره اکتینومیست‌های این تحقیق و نتایجی که در مطالعات قبل به دست آمده است می‌تواند تحت تاثیر چندین فاکتور مانند مکان و فصل جمع‌آوری اکتینومیست‌ها، اختلاف در جنس و گونه مورد مطالعه، اختلاف در روش‌های عصاره‌گیری که در این تحقیق فقط از محیط کشت القایی جهت عصاره‌گیری استفاده شد؛ در صورتی که در مطالعات دیگر از حلال‌های مختلفی برای عصاره‌گیری استفاده شده بود و در نهایت تفاوت در سنجش که می‌تواند حساسیت متفاوت سویه-های هدف را منجر شود، مربوط باشد.

منابع

1. Pourali P, Baseri Salehi M, Afsharnezhad S, Behravan J. Biological production and assessment of the antibacterial activity of gold nanoaprticles. JMW; 2013. 6(3).
2. Rai M, Yadav A, Gad A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnol Adv; 2009. 27:76-83.
3. Mahapatra SS, Karak N. Silver nanoparticles in hyper branched polyamine: Synthesis, characterization and antibacterial activity. Mater Chem Phys; 2008. 112(3):1114-9.
4. Sharma VK, Yangard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. Adv Colloid Interface Sci; 2009. 145(1 -2):83-96.
5. Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Islam Khan M, Kumar R, et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus Fusarium oxysporum. Colloids Surf B Biointerfaces; 2003. 28(4):313-8.
6. Kowshik M, Ashtaputre S, Kharrazi S, Vogel W, Urban J, Kulkarni SK, et al. "Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. Nanotech; 2003. 14(1):95-100.
7. Senapati S, Ahmad A, Khan MI, Sastry M, Kumar R. Extracellular biosynthesis of bimetallic Au–Ag alloy nanoparticles, Small; 2005. 1(5):517–520.
8. Shahverdi AR, Minaeian S, Shahverdi HR, Jamalifar H, Nohi AA. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: a novel biological approach. Process Biochem; 2007. 42(5):919-23.

9. Valli S, Suvathi SS, Aysha O, Nirmala P, Vinoth KP, Reena A. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. Asian Pac J Trop Biomed; 2012. 2(6):469-73.

10. Meiying Z, Zhicheng Z. Identification of marine actinomycetes S-216 strain and its biosynthetic conditions of antifungal antibiotic. J Xiamen Univ Nat Sci; 1998. 37:109-14.

11. Manivasagan P, Venkatesan J, Senthilkumar K, Sivakumar K, Kim SK. Biosynthesis, antimicrobial and cytotoxic effect of silver nanoparticles using a novel nocardiopsis sp. MBRC-1. Microbiol Res; 2013:1- 9.

12. Buchanan RE, Gibbuns NE. Bergey manual of determinative bacteriology. 8th edition. Baltimore: Williams and Wilkins; 1974.p.1268.

13. Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. Nanotechnol; 2007. 18(22):225103-11.

14. Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomed Nanotechnol Biol Med; 2012. 8:35-45.

15. Priyaragini S, Sathishkumar SR, Bhaskararao KV. Biosynthesis of silver nanoparticles using actinobacteria and evaluating its antimicrobial and cytotoxicity activity. Int J Pharm Pharm Sci; 2013. 5(2):709-12.

16. Sadhasivam S, Shanmugam P, Yun, KS. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces hygroscopicus* and antimicrobial activity against medically important pathogenic microorganisms. Colloids Surf B; 2010. 81:358-62.

17. Singh D, Rathod V, Fatima L, Kausar A, Vidyashree Anjum N, Priyanka B. Biologically reduced silver nanoparticles from *Streptomyces* sp. VDP-5 and its antibacterial efficacy, Int J Pharm Pharm Sci; 2014. 4(2):31-6.

18. Saminathan K. Biosynthesis of silver nanoparticles using soil Actinomycetes streptomyces sp. Int J Curr Microbiol App Sci; 2015. 4(3):1073-83.

# of marine actinomycete *Nocardiopsis* sp. AHA2 Antimicrobial activity against microbial pathogens synthesized silver nanoparticles

Hassan Alijani, MSc student of Marine Biotechnology, Department of Marine biology, Faculty of Marine Science, Khoramshahr University of Marine Science and Technology, Khoramshahr, Iran. H.alijani@kmsu.ac.ir
***Soheila Matroodi**, PhD, Assistant Professor of Molecular Genetics, Department of Marine biology, Faculty of Marine Science, Khoramshahr University of Marine Science and Technology, Khoramshahr, Iran (*Corresponding author). s.matroodi@kmsu.ac.ir
***Ali Sharafi**, PhD, Assistant Professor of Molecular Genetics, Zanjan Pharmaceutical Biotechnology Research Center, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran (*Corresponding author). sharafi.a@gmail.com
Isaac Zamani, PhD, Assistant Professor of Microbiology, Department of Marine biology, Faculty of Marine Science, Khoramshahr University of Marine Science and Technology, Khoramshahr, Iran. Isaac_zf@yahoo.com

Abstract

Background: Silver nanoparticles have been *widely used* in various biomedical applications and *drug* delivery systems. The biosynthesis of nanoparticles has been proposed as a cost effective environmental friendly alternative to chemical and physical methods. In the present study, synthesis of nanoparticles using a novel *Nocardiopsis* sp. AHA2 has been attempted. We used culture supernatant of *Nocardiopsis* sp. AHA2 for the biologically synthesis of silver nanoparticles and study of its antimicrobial activity.

Methods: Marine sediment samples were collected from depth of 10^{th} centimeter. Serial dilution was made for screening of marine actinomycetes using SCA medium. After isolation and characterization of *Nocardiopsis* sp. AHA2, the reduction of silver ions occurred when silver nitrate solution (0.01 M) was treated with the *Nocardiopsis* sp.AHA2 culture supernatant at room temperature. Nanoparticles were characterized by UV-visible, Zeta potential. Antimicrobial activity of the prepared silver nanoparticles against bacteria and fungi pathogens was assayed using well diffusion assay.

Results: Silver nanoparticles were successfully synthesized in the culture supernatant of *Nocardiopsis* sp. AHA2. During the experiment, the appearance of a dark brown color indicated the formation of silver nanoparticles. In the UV-visible spectrum, maximum peak was observed between 420 nm, indicating the presence of AgNPs.

Conclusion: AgNPs displayed antimicrobial activity against all used pathogenic microorganisms. *Nocardiopsis* sp. AHA2 can be a good candidate for the synthesis of the AgNPs using silver nitrate.

Keywords: Actinomycete, Nanoparticles, Antimicrobial activity