مقاله اصیل

مطالعه‌ی خواص آنتی باکتریال نانوذرات نقره‌ی تولید شده توسط آنزیم آلفاآمیلاز باکتریایی

نسرین ملانیا[1]*، فرنگیس غریب[2]، رامین رستمی تقی دیزج[3]، میترا خیرآبادی[4]

[1] استادیار بیوشیمی، دکتری بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

[2] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

[3] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

[4] استادیار بیوفیزیک، دکتری بیوفیزیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

* **نشانی نویسنده مسئول:** سبزوار، دانشگاه حکیم سبزواری، نسرین ملانیا

E-mail: mollania_n@yahoo.com

وصول:۹۴/۹/۱، اصلاح:۹۴/۱۰/۱۱، پذیرش:۹۴/۱۲/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: **باظهوروافزایش ارگانیسم‌های میکروبی مقاوم به آنتی بیوتیک‌های متعدد، و همچنین ضرورت برکاهش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی، تولید مواد ضد میکروبی با هزینه‌های کمتر به نیازی گریز ناپذیر برای جوامع بشری امروزی تبدیل شده است. ما در این مطالعه سنتز نانو ذره نقره را با استفاده از آنزیم آلفا آمیلاز باکتریایی انجام داده و به بررسی خواص آنتی باکتریال این نانوذرات سازگار با محیط زیست پرداختیم. از دوران باستان، فلزاتی مثل مس و نقره به عنوان یک فلز ضد انگل شناخته شده بود.**

روش‌ها: **نانوذرات نقره به روش زیستی با استفاده از آنزیم آلفاآمیلاز باکتریایی سنتز شدند، سپس نانوذرات سنتز شده به منظور بررسی اثر ضدباکتریایی، به محیط کشت LB حاوی سویه‌های مختلف باکتری بیماریزا مطالعه شدند و کمترین غلظت مهارکنندگی آن‌ها محاسبه شد.**

یافته‌ها: **نانوذرات تولید شده با این روش بر اساس مطالعات DLS و SEM اندازه ای حدود ۲۰ تا ٤٠ نانوکتر را نشان دادند و فعالیت خوبی بر ضدباکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت وگرم منفی داشتند, به طوری که در غلظت $۲۰۰\frac{\mu g}{ml}$ تمام باکتری‌های ما از بین رفتند.**

نتیجه‌گیری: **روش بیوسنتز ذرات نانو نسبت به سایر روش‌های شیمیایی و فیزیکی دارای هزینه‌ی کمتری و پایداری بالاتری است(۱). نانوذرات نقره با توجه به فعالیت خوب آنتی باکتریال، می‌توانند کاربرد پزشکی خوبی داشته باشند.**

کلمات کلیدی: ***نانوذره نقره ؛ اثرات آنتی باکتریال ؛ آنزیم آلفا آمیلاز ؛ سنتز زیستی***

مقدمه

نقره عنصری سفید و براق فلزی می‌باشد. پودر نقره به نظر هیپوکراتیس (Hippocrates)، پدر علم پزشکی نوین، دارای اثرات شفادهندگی و ضدمریضی بوده و در لیست درمانی برای زخم‌ها قرار داشت. ترکیبات نقره به عنوان سلاح اصلی در مقابل زخم‌های عفونی در جنگ جهانی اول بود تا اینکه آنتی بیوتیک‌ها تولید شدند. در سال ۱۸۸٤ پزشکان متخصص آلمانی، محلول چشمی یک

درصد نیترات نقره را برای جلوگیری از Gonococcal Ophthalmia Neonatorum معرفی نمودند که گفته می-شود، اولین مقاله‌ی علمی مستند برای کاربردهای پزشکی نقره می‌باشد. از زمان امپراطوری‌های گذشته، نقره برای محافظت آب آشامیدنی از آلودگی استفاده می‌شد. در قرن ۱۸، مهاجران به آمریکا تکه‌های نقره را برای جلوگیری از آلودگی شیر در آن می‌انداختند.طی جنگ جهانی اول، برای حفاظت جراحات از عفونت، ورقه نقره به کار می-رفت(۱). روشی که کماکان استفاده می شود.در دهه ۱۹۷۰، ناسا مخازن نقره‌ای را برای حفظ پاکیزگی آب آشامیدنی در سفینه فضایی به کار می‌برد، این کاربردها خواص آنتی‌بیوتیک و ضد باکتری نقره را نشان می‌دهند. با کشف آنتی‌بیوتیک‌ها در قرن ۲۰، از نقره کمتر در اهداف پزشکی استفاده شد، تماس طولانی مدت با نقره و ترکیبات نقره سبب ایجاد لکه‌های برگشت‌ناپذیر در پوست و چشم گردید و عدم توانایی در از بین بردن این مشکلات باعث شد که استفاده از نقره به فراموشی سپرده شود(۱).

طی قرن اخیر به خاطر استفاده بیش از حد آنتی بیوتیک ها،برخی باکتری‌ها نظیر MRSA وVRSA که از استافیلوکوک‌ها هستند، نسبت به آن‌ها مقاومت پیدا کرده-اند.آسیب پذیری آنتی بیوتیک‌های زیستی به عنوان دارو،دوباره علاقه به خواص آنتی‌بیوتیکی نقره را زنده کرده است.و با پیشرفت علم نانو و ایجاد نانوذرات نقره با داشتن خواص و مورفولوژی جدید، نقره توانست جایگاه از دست رفته خود را بازیابد و نگاه‌ها بار دیگر به سمت نقره و خواص ضد باکتری آن معطوف گردد(۲, ۳). با افزایش نسبت سطح به حجم نانوذرات فلزی نقره، می-توان خواص فیزیکی و شیمیایی آن را تغییر داد و کارایی-شان را در نابودی باکتری‌ها افزایش بخشید. به نظر می رسد که نانوذرات فلزی نقره، نقش مهم و رو به جلوییدر مبارزه علیه میکروب‌ها درآینده بازی خواهند کرد(٤).

نانوذرات نقره از روش‌های شیمیایی و فیزیکی مختلفی سنتز می‌شوند، اما اکثر این روش‌ها می‌توانند برای سلامتی انسان و محیط زیست به علت تولید مواد جانبی مضر،آسیب رسان باشند و معمولا روش‌هایی پرهزینهای نیزهستند. بیوسنتز نانوذرات توسط روش‌های زیستی می توانندجایگزین مناسبی برای غلبه بر مشکلات ناشی از سایر روش‌های سنتزیباشندو به نظر می‌رسد که سازگاری بهتری با بدن داشته باشند(۵, ٦).

روش کار

۱,۲. سنتز زیستی نانوذرات نقره و تعیین ویژگی های نانوذرات تولید شده

ابتدا مقداری از آنزیم آلفاآمیلاز خالص حاصل از باکتری Bacillus sp. ASM1, که با کد KC693767.1 در پایگاه بانک ژنی در ncbi ثبت شده است, را همراه با غلظت نهایی یک میلی مولار از نیترات نقره ($AgNo_3$) در انکوباتور در دمای۸۰ درجه به مدت ٤۰ ساعت قرار دادیم در حالیکه به شاهد نیترات نقره اضافه نشد. باید در اینجا بیان نمود که آنزیم آمیلاز خالص شده در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد هم هنوز قسمت عمده ای از فعالیت خود را حفظ میکند. با مشاهده اولین تغییر رنگ نمونه ها نسبت به شاهد با دستگاه اسپکتروسکوپی UV-vis خوانده شد. تغییر رنگ محلول از زرد کمرنگ به قهوه ای نشان دهنده تشکیل نانوذرات نقره و احیا Ag^+ به Ag^0 است. پس از تکمیل فرایند تولید نانوذرات, محلول کلوئیدی حاصل با استفاده از سانتریفیوژ در ۱۸۰۰۰rpm جدا و محلول رویی دور ریخته شد. بعد با آب دیونیزه سه بار سانتریفیوژ را تکرار نمودیم تا نانوذرات ته نشین شده پراکنده شوند. در نهایت سوسپانسیون تولید شده خشک شد و برای مطالعات بیشتر استفاده شد.

برای شناسایی نانوذرات در ابتدا به کمک طیف سنجی جذبی دربازه ی 400 nm تا 500 nm که ناحیه¬ی جذب نانوذره ی نقره است، تولید زیستی نانوذرات را بررسی نمودیم. در ادامه برای تعیین اندازه نانوذرات نقره

از روش روش پراکنـدگی دینامیـکی نور (DLS) استفاده نمودیم. با استفاده از تابش نور مرئی با طول موج ٦٣٣ نانومتر به نمونه که در آب حل شده، اندازه¬ی ذرات بدست آمد. همچنین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) شکل و اندازه نانو ذرات، از سوی شرکت سازنده بررسی و تعیین گردید.

۲,۲. آزمون ضد میکروبی نانوذرات نقره

باکتریهای مورد استفاده جهت انجام آزمایشات ضد باکتریایی شامل اشرشیاکلای (ATCC 25922) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) بودند که بصورت فریز خشک نگهداری شده بودند. این باکتریها از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی تهیه شده بودند. نمونه های باکتریایی بر روی محیط های کشت اختصاصی مانیتول سالت آگار و بلاد آگار مجددا کشت شدند. پس از طی مدت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، از نمونه باکتریای برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی استفاده شد (۷, ۸). اشریشیاکلی باسیل گرم منفی است که عامل بسیاری از عفونت ها و مسمومیت ها به ویژه عفونت ادراری می باشد. استافیلوکوک اورئوس کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که به عنوان یکی از ۵ عامل شایع ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت‌های زخم پس از جراحی است.

برای تعیین پارامتر MIC (حداقل غلظت بازدارنده‌ی رشد) از روش Broth Microdilution در این تحقیق استفاده گردید. بدین منظور ابتدا محلول نیم مک-فارلند (۱۰۸× ۱/۵-۱ عدد باکتری در هر میلی لیتر (Colony-Forming Unit (CFU) تهیه گردید. به این ترتیب که محلول شماره‌ی ۱ یعنی ۱,۱۷۵٪ از باریوم-کلراید دوآبه ($BaCl_2.2H_2O$) و محلول شماره‌ی۲ یعنی ۱٪ اسیدسولفوریک (H_2SO_4) تهیه شد. سپس ۰,۵ میلی-لیتر از محلول شماره‌ی ۱ به ۹۹,۵ میلی‌لیتر از محلول شماره‌ی ۲ اضافه شد. محلول حاصل محلول نیم‌مک‌فارلند است و از مقایسه‌ی جذب نمونه‌ی پیش‌کشت با این محلول در ٦٢٠ نانومتر می‌توان برای تخمین تعداد سلول-های باکتری در حین القا استفاده کرد و میزان جذب در محدوده ۰/۱ – ۰/۰۸ تنظیم شد (۹, ۱۰). پس از تهیه‌ی محیط‌های مورد نیاز در لوله‌های آزمایش و ایجاد غلظت-های مختلف نانوذره‌ی نقره با استفاده از روش رقیق-سازی، با اضافه‌کردن محیط کشت فاقد باکتری به پیش-کشت، کدورت پیش‌کشت به کدورت محلول نیم مک-فارلند رسانده شد. سپس از این محیط به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر به محیط‌های کشت اضافه شد. یک لوله‌ی فاقد نقره هم به عنوان کنترل، کشت داده شد. سپس این لوله‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷°C و هوادهی ۱۸۰ rpm به مدت ٢٤ ساعت قرار داده شدند. پس از گذشت این زمان، رشد قابل رویت باکتری‌ها در هرکدام از این لوله به عنوان معیاری از حداقل غلظت متوقف کننده‌ی رشد در نظر گرفته شدند.

نتایج

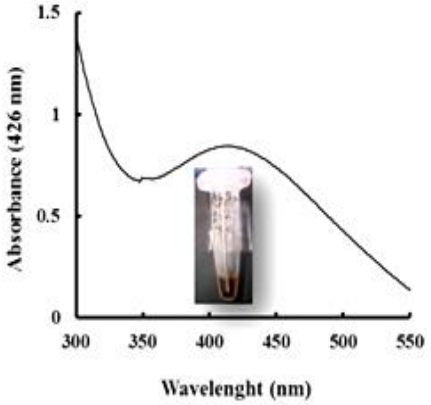
۱,۳. تولید نانو ذرات نقره

تولید نانوذرات نقره توسط آنزیم آلفا آمیلاز خالص مورد بررسی قرار گرفت. برای اینکار از UV-Visible استفاده شد که نتایج آن با گزارشات جهانی مطابقت دارد. طیف جذبی نانوذرات نقره دارای یک قله پلاسمونی سطحی پهن درطول موج جذب ۵۰۰-۴۰۰ نانومتر می باشند. جذب تشدید پلاسمون سطحی در ٤٢٦ نانومتر برای نانوذرات نقره رخ میدهد.

پراکندگی نور دینامیکی روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول ها و سوسپانسیون استفاده می شود. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده ی چند نانومتر تا میکرون به کار می رود. در فناوری های اخیر، ذراتی با قطر کمتر از نانومتر نیز با این روش قابل اندازه گیری هستند.این روش به برهمکنش نور با ذره بستگی دارد.

جدول ۳-۱: تعیین MIC و MBC نانوذره نقره بر دو گونه‌ی باکتری مورد آزمایش

سویه‌ی باکتری	MIC(µg/ml)	MBC(µg/ml)
Staphylococcus aureus	۲۰۰	۲٤۰
Echerishia Coli	۲۰۰	۲۳۰



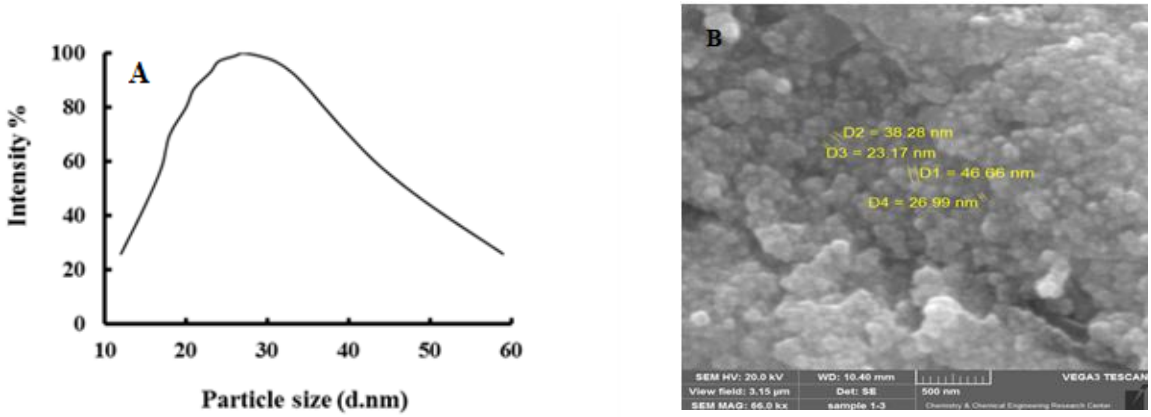
شکل ۳-۱: بررسی پتانسیل تولید ناموذرات نقره توسط آنزیم آمیلاز استخراج شده از سویه ASM1 . قله پلاسمونی سطحی پهن درطول موج جذب ٤۲٦ نانومتر نشان دهنده تولید نانوذره نقره می باشد.

نور پراکنده شده بوسیله نانوذرات موجود در سوسپانسیون با زمان تغییر می کند که می تواند به قطر ذره ارتباط داده شود. نتایج بدست آمده از DLS به اندازه ذرات ما بین ۲۰ تا ٤۰ نانومتر را به خوبی به ما نشان داد. امروزه روش های مختلفی جهت شناسایی و آنالیز مواد نانو وجود دارد که یکی از معروف ترین آنها، روش های میکروسکوپی می باشد. میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM که از گروه میکروسکوپ های الکترونی است، از معروف ترین روش های میکروسکوپی به شمار می رود. در تصاویر میکروسکوپی نشان داده شده است که نانوذرات نقره به صورت مجزا و کمپلکس ساخته شده¬اند. نانوذرات تولیدی دارای مورفولوژی یکسان کروی هستند. محدوده ی اندازه ی ذرات ما بین ۲۰ تا ٤۰ نانومتر می¬باشد. بر مبنای تصاویر مشاهده شده متوسط اندازه¬ی ذرات ۲۵ نانومتر است. نتایج این بخش با نتایج حاصل از آنالیز DLS مطابقت دارد.

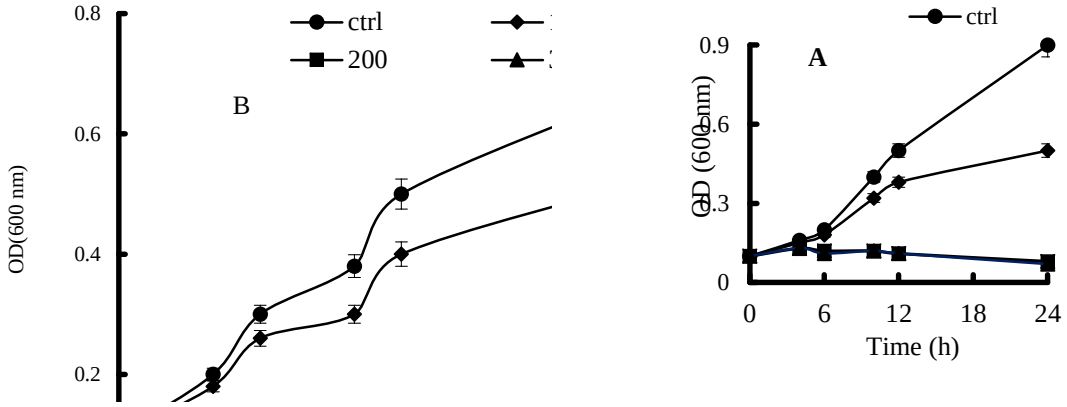
۲,۳. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی

غلظت‌های مختلف نانوذره (۱۰۰-۲۰۰-۳۰۰) که بر اساس مقدار MIC بدست آمد، انتخاب شد.بعد از اضافه نمودن نانوذرات به سلول‌های باکتری، در زمان‌های مختلف میزان جذب سلول‌ها خوانده شد و نمودار رشد باکتری‌ها نسبت به زمان بدست آمد. در این مرحله از یک لوله به عنوان کنترل نیز استفاده گردید که فاقد نانوذره نقره بود. مقدار MICو MBC بدست آمده در جدول۳-۱ نشان داده شده است. بر اساس مقدار MIC بدست آمده منحنی رشد باکتری‌های فوق بدست آمد (شکل ۳-۳, A و B).

منحنی رشد سلول‌های باکتری تیمارشده با نانوذره نقره نشان می‌دهد که نانوذرات می‌توانند رشد و تولید سلول‌های باکتری را مهار کنند. منحنی رشد باکتری *S.aureus* نشان می‌دهد رشد سلول‌های باکتری با ۲۰۰ و ۳۰۰ ماکروگرم بر میلی لیتر نانوذره نقره مهار شده و بعد از ۱۰ ساعت تقریبا همه‌ی سلول‌های باکتری از بین رفته-اند. منحنی رشد سلول‌های باکتری با ۱۰۰$\frac{\mu g}{ml}$ نانوذره نقره کاهش سرعت رشد را در مقابل گروه کنترل به خوبی نشان می‌دهد. در مورد منحنی رشد باکتری E.Coli مشاهده شد که بعد گذشت ۱۲ ساعت تقریبا تمامی باکتریها از بین رفته اند و مقدار۲۰۰$\frac{\mu g}{ml}$ و ۳۰۰ $\frac{\mu g}{ml}$ مهار رشد یاکتری را نشان می‌دهد و در حضور مقدار ۱۰۰$\frac{\mu g}{ml}$ نانوذره نقره، رشد سلول‌های باکتری نسبت به گروه کنترل



شکل۳ -۲: نتایج حاصل از اندازه گیری اندازه نانوذرات نقره به کمک تکنیک (A) DLS و (B) SEM



شکل ۳- ۳ : منحنی رشد (A) باکتری اشرشیاکلای و (B) باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در عدم حضور و حضور نانوذرات نقره (غلظت ها بر حسب µg/ml است).

کاهش یافته است. در مجموع منحنی رشد سلول‌های باکتری تیمار شده با نانوذره‌ی نقره نشان می‌دهد که باکتری E.Coli نسبت به S. aureus سریعتر مهار شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

باظهور و افزایش ارگانیسم‌ها ی میکروبی مقاوم به آنتی بیوتیک‌های متعدد، وهمچنین ضرورت برکاهش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی، تولید مواد ضد میکروبی با هزینه‌های کمتربه نیازی گریز ناپذیر برای جوامع بشری امروزی تبدیل شده است اثرات ضدباکتریایی نقره قدمتی به اندازه دوران باستان تا به امروز دارد.نقره درحال حاضربرای کنترل رشد باکتری در موارد مختلفی،ازجمله دهان ودندان وزخم وسوختگی مورد استفاده قرار می-گیرد(۱۱, ۱۲). این نانوذرات معدنی نسبت به سایر مواد شیمیایی ضدمیکروبی مزیت دارند، چون مواد شیمیایی دارای مقاومت دارویی هستند. به طور کلی مکانیسم عمل این مواد به نحوه‌ی اتصال این ذرات به سطح باکتری و متابولیسم داخل ارگانیسم مرتبط است. هر چند استفاده از این ذرات هم محدودیت‌های ویژه‌ای را به همراه دارد (۱۱).

ما در این تحقیق از دو باکتری گرم مثبت و منفی

که دارای تفاوت در ساختارغشایی هستند و آن هم تفاوت در ضخامت لایه‌ی پپتیدوگلیکانی‌شان است، استفاده نمودیم. به طور کلی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به مواد آنتی باکتریال دارای حساسیت کمتری هستند. زیرا لایه‌ی پپتیدوگلیکان در آن‌ها در مقابل نفوذ نانوذرات نقره، حفاظ مستحکم تری است که این مسئله را می توان با مقایسه اثر نانوذره نقره بر روی منحنی رشد Staphylococcus aureus به عنوان یک باکتری گرم مثبت در مقابل Escherichia Coli به عنوان یک باکتری گرم منفی به خوبی قابل مشاهده کرد.

مکانیسم ضدباکتریایی یون نقره به خوبی مشخص شده است. بار مثبت یون نقره در این فعالیت بسیار مهم است، زیرا امکان واکنش‌های الکترواستاتیکی با بارهای منفی موجود در غشا را خواهد داشت و از این طریق به غشا متصل می‌گردد. یونهای نقره سبب آزاد شدن یون‌های K+ از باکتری می‌شود. بنابراین پلاسما باکتری و غشای پلاسمی باکتری که مرکز تجمع آنزیم‌ها و DNA است، هدف یون‌های نقره قرار می‌گیرد. هنگامی که رشد باکتری مهار شد، یون‌های نقره در واکوئل و دیواره‌ی سلولی مانند گرانول رشد می‌کنند. آن‌ها تقسیم سلولی را مهار و به دیواره‌ی سلولی و محتوای سلولی آسیب می‌رسانند. اندازه‌ی سلول کوچک می‌شود و ساختار دیواره‌ی سلولی وغشای پلاسمایی و محتوای سلولی دچار اختلال می‌گردد. خاصیت آنتی‌باکتریال نانوذره نقره در باکتری‌های گرم منفی به غلظت نانوذره و تجمع به صورت Pits در دیواره‌ی سلولی بستگی دارد. این نانوذرات تجمع یافته در غشا سبب نفوذپذیری غشا و مرگ تدریجی سلول می-شوند.

امرو(Amro) و همکارانش نشان دادند که کاهش فلزی ممکن است سبب ایجاد چاله‌هایی در غشا خارجی و تغییرنفوذپذیری غشا گردد که این امر خود باعث افزایش تصاعدی مولکول‌های لیپوپلی‌ساکاریدها و پروتئین‌های غشا می‌شود. البته هنوز نحوه‌ی اتصال نقره به ترکیبات دیواره‌ی سلولی درحال بررسی است. البته گزارشات جدید توسط Danilczuk و همکارانش توسط تشدید پارامغناطیسی الکترون، از آزادسازی رادیکال‌های آزاد توسط نانوذرات نقره اطلاع می دهد و بیان میکنند که آسیب غشایی دیواره ممکن است به خاطر اثرات تخریبی این رادیکال‌های آزاد باشد. رادیکال‌های آزاد ترکیبات حدواسط با طول عمر کوتاه بوده که دارای یک یا چند الکترون جفت نشده در لایه‌ی آخر الکترونی خود هستند. به همین علت بسیار واکنش‌پذیر بوده و برای بدست اوردن الکترون به مولکول‌های پایدار مجاور خود حمله کرده وسبب اکسایش آن‌ها می‌شوند. مولکولی که الکترون خود را از دست داده، خود تبدیل به یک رادیکال آزاد شده و این چرخه همچنان ادامه می‌یابد(۱۲).

مطالعات in vitro نشان میدهد مکانیسم اصلی عملکردآن‌ها برپایه تغییردادن سطح ROS درون سلول هااست. بعضی از محققان گزارش داده‌اند که ROS به طور طبیعی در داخل یا خارج سلولی می‌تواند وجود داشته باشد. در شرایط خاص افزایش مقدار ROS می-تواند استرس اکسیداتیو در سلول ایجاد کند. استرس اکسیداتیو نه تنها می‌تواند سبب آسیب غشای سلولی گردد. بلکه می‌تواند سبب آسیب به DNA و پروتئین‌ها سیستم‌های درون سلولی از قبیل زنجیره‌ی تنفسی گردد، نانوذرات قادرند تا سطحROS درون سلول را تغییردهند ورشدوتمایزانواع سلولها راتحت تاثیرقراردهند مطالعات مختلف در محیط‌های in vitro و in vivo پیشنهاد می-کنند که آن‌ها قادرند گونه‌های فعال اکسیژن ROS را تولید کنند و بنابراین می‌توانند بر روی غلظت کلسیم درون سلولی، فعال نمودن فاکتورهای رونویسی و ایجاد تغییر در سایتوکین‌ها نقش داشته باشند. ROS از طریق روش-های مختلفی نظیر: آسیب رساندن به DNA، تداخل با مسیرهای سیگنالینگ سلولی، تغییرات در روند رونویسی ژن‌ها و... غیره می‌توانند به سلول‌ها آسیب وارد کنند(۱۳). به طورکلی نانوذرات سنتز شده از طریق زیستی دارای

پایداری بالاترنسبت به سایر نانوذراتبوده و همچنین ترکیبات سازگار با محیط زیست می باشند و هزینه‌ی کمتری برای تولید نسبت به سایر روش‌های سنتزی شیمیایی و فیزیکی نیاز دارند(۱٤, ۱۵) و با توجه به خاصیت آنتی باکتریال خوبی که از خود نشان می‌دهند، می‌توانند جایگزین‌های مناسبی برای انواع آنتی بیوتیک‌ها باشند.

References

1. Tolaymat TM, El Badawy AM, Genaidy A, Scheckel KG, Luxton TP, Suidan M. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. Sci Total Environ. 2010;408(5):999-1006.
2. Ahamed M, AlSalhi MS, Siddiqui MK. Silver nanoparticle applications and human health. Clin Chim Acta. 2010;411(23-24):1841-8.
3. Abou El-Nour KM, Eftaiha A, Al-Warthan A, Ammar RA. Synthesis and applications of silver nanoparticles. Arab J chem. 2010;3(3):135-40.
4. Stark WJ. Nanoparticles in biological systems. Angewandte Chemie International Edition. 2011;50(6):1242-58.
5. Aiad I, El-Sukkary MM, Soliman E, El-Awady MY, Shaban SM. In situ and green synthesis of silver nanoparticles and their biological activity. J Ind Eng Chem. 2013; 20(5): 3430-9.
6. Vidhu V, Aromal SA, Philip D. Green synthesis of silver nanoparticles using Macrotyloma uniflorum. Spectrochim Acta A. 2011;83(1):392-7.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. Document M26-A. Wayne, PA: NCCLS; 1999.
8. FDA. Division of Antiinfective and Ophthalmology Drug Products (HFD-520)—Microbiological data for antibacterial drug products—development, analysis, and presentation. 2005.
9. McFarland J. Nephelometer: an instrument for media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines, JAMA. 1907; 14:1176-8.
10. Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttagupta SP, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta Biomater. 2008;4(3):707-16.
11. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J-H, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine: Nanomedicine. 2007;3(1):95-101.
12. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. Clin Pharmacol Ther. 2008;83(5):761-9.
13. Kim S-H, Lee H-S, Ryu D-S, Choi S-J, Lee D-S. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Korean J Microbiol Biotechnol. 2011;39(1):77-85.
14. Mishra A, Sardar M. Alpha-amylase mediated synthesis of silver nanoparticles. Science of Advanced Materials. 2012;4(1):143-6.
15. Kalishwaralal K, Gopalram S, Vaidyanathan R, Deepak V, Pandian SRK, Gurunathan S. Optimization of α-amylase production for the green synthesis of gold nanoparticles. Colloids Surf B Biointerfaces. 2010;77(2):174-80.

Original Article

Study on the antibacterial effects of silver nanoparticles produced by α-amylase enzyme

***Nasrin Mollania**
Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.

Farangis gharib
MSc student of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.
Ramin Rostami- Taghi Dizaj
MSc student of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.

Mitra kheirabadi
Assistant Professor of Biophysic, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.

Received:22/11/2015**, Revised:**01/01/2016**, Accepted:**04/02/2016

Corresponding auther:
Nasrin Mollania,
Sabzevar, Hakim Sabzevari University
E-mail: mollania_n@yahoo.com

Abstract

Background: With the advent and increasing microbial organisms that resistant to multiple antibiotics, as well as the necessity of decrease the cost of health care, the production of broad range of anti-microbial materials has become unavoidable for human societies. In this study, we synthesized the silver nanoparticles using bacterial α-amylase enzyme and evaluated the antibacterial properties of this eco-friendly nanoparticles.

Methods: Silver nanoparticles were synthesized biologically using bacterial α-amylase enzyme, then the effects of antibacterial nanoparticles synthesized in LB medium containing various strains of pathogenic bacteria were investigated and then the minimal inhibitory concentration was calculated.

Results: Nanoparticles produced by this method, based on DLS and SEM analysis, have the size of 20-40 nm and have good activity against Gram-positive bacteria and gram negative pathogenic bacteria. In the 200 $\frac{\mu g}{ml}$ of Ag-NPs, the all of pathogenic bacteria was killed.

Conclusion: Biological nanoparticles synthesis relative to other physical and chemical methods has lower cost and higher durability (1). Due to good antibacterial activity of silver nanoparticles, this material has good medical applications.

Keywords: *Silver Nanoparticles, Antibacterial properties, α-amylase enzyme, Biological synthesis*