

Original article

Green Synthesis of Silver Nanoparticles by *Hypericum perforatum* extract and Berberine and Evaluation of Their Antibacterial Effects

Askarifar F¹, Shafaie E¹, Sedighi M^{2,3}, Tavakoli kareshk A^{*1,4}

1. Infectious Diseases Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

2. Department of Pharmaceutics and Nanotechnology, School of Pharmacy, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

3. Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

4. Student Research Committee, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.

* **Corresponding author.** Tel: +985632381525, Fax: +985632381525, E-mail: a.tavakoli@bums.ac.ir

Article info

Article history:

Received: Jun 18, 2023

Accepted: Sep 20, 2023

Keywords:

Silver,
Nanoparticle,
Hypericum perforatum,
Berberine,
Minimum Inhibitory
Concentration

ABSTRACT

Background: Bacterial infections are a major cause of chronic infections and mortality, and antibiotics are the preferred treatment for bacterial infections. However, studies show that widespread use of antibiotics has led to the emergence of multidrug-resistant bacterial strains. Hence, the need to develop new and alternative strategies for the production of effective drugs has become an important issue. Recently, the use of nanotechnology has been widely common in various fields. Materials in the nanoscale have unique physical and chemical properties. Silver nanoparticles have different applications and their antimicrobial properties have been confirmed in several studies. This study aimed to investigate the antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized by berberine and *Hypericum perforatum* extract.

Methods: In this experimental study, the antibacterial effects of synthesized nanoparticles on standard strains of *Escherichia coli* [ATCC 25922], *Pseudomonas aeruginosa* [ATCC 27853], *Klebsiella pneumoniae* [ATCC 9997], and *Staphylococcus aureus* [ATCC 29212] were investigated. The MIC content of silver nanoparticles alone and in combination with berberine and *Hypericum perforatum* extract was investigated for the studied bacteria using the broth microdilution method.

Results: The results of the evaluation of the minimum inhibitory concentration [MIC] of the synthesized compounds on the studied bacteria showed that the nanoparticles synthesized by berberine and *Hypericum perforatum* extract had the highest antibacterial effects. However, each of the compounds Berberine and *Hypericum perforatum* extract alone did not show significant antibacterial properties. The results of this study also showed that the highest inhibitory concentration of nanoparticles synthesized by berberine and *Hypericum perforatum* extract was related to *Pseudomonas aeruginosa* [0.0375 mg / ml] and the lowest inhibitory concentration was related to *Enterococcus faecalis* [0.185 mg/ml].

Conclusions: The results of the present study showed that silver nanoparticles synthesized with berberine and *Hypericum perforatum* extract have significant antibacterial effects. As a result, nanoparticles, including silver nanoparticles, can become one of the most important alternatives to antibiotics due to their unique properties in targeting bacteria. However, achieving definitive results requires further studies in this area.

How to cite this article: Askarifar f, Shafaie E, Sedighi M, Tavakoli kareshk A. Green Synthesis of Silver Nanoparticles by *Hypericum perforatum* extract and Berberine and Evaluation of Their Antibacterial Effects. J Ardabil Univ Med Sci. 2023;23(2):262-277.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

Extended Abstract

Background: infectious diseases are one of the most important topics and challenges in the 21st century. The high prevalence of infectious diseases and the indiscriminate administration of antibiotics have led to the creation of antibiotic resistance, difficulty in the treatment of diseases, and an increase in the costs of the health care system. Increasing drug resistance is an important global health challenge, as it is predicted that infections caused by resistant bacteria will cause more than 10 million deaths and 100 million trillion dollars in financial losses by 2025. Bacterial infections are a major cause of chronic infections and mortality, and antibiotics are the preferred treatment for bacterial infections. However, studies show that widespread use of antibiotics has led to the emergence of multidrug-resistant bacterial strains. Hence, the need to develop new and alternative strategies for the production of effective drugs has become an important issue. Recently, the use of nanotechnology has been widely common in various fields. The materials in the nanoscale have unique physical and chemical properties. Silver nanoparticles have different applications and their antimicrobial properties confirmed in several studies. One of the desirable medicinal plants in this area is raei flower with the scientific name of Hypericum Perforatum, a plant from the Hypericaceae family, that grows in Western Europe, Asia and North Africa. This is an herbaceous and permanent plant whose flowering branches are the valuable part of the plant in terms of medicine and it is one of the most widely used medicinal plants in the world. The effective ingredient of this plant includes: pseudohypericin, precursor of hypericin, flavonoids such as kaempferol, quercetin, hyperoside, isoquercetin, rutin, aminoflavone, cations, biflavonoids, adihyperforin tannins, caffeic, chlorogenic and volatile oils such as geraniol, myrcene, limonene, humiolene, caryophyllene., myristic, palmitic, stearic, carotenoids, choline and nicotinamide.

Today, this plant has a significant use for the treatment of mild to moderate depression. It has also been shown that this plant has antiviral, antibacterial and wound- healing properties. Therefore, this study aimed to investigate the antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized by berberine and Hypericum perforatum extract.

Methods: In this experimental study, silver nanoparticles were produced using the green synthesis method and various methods including DLS, FTIR, XRD and vis-UV spectroscopy were used to characterize them. The antibacterial effects of synthesized nanoparticles on standard strains of *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997), and *Staphylococcus aureus* (ATCC 29212) were investigated. The MIC content of silver nanoparticles alone and in combination with berberine and Hypericum perforatum extract was investigated for the studied bacteria using the broth microdilution method.

In the broth microdilution method, a sterile 96-house plate was used to determine the MICs. First, 100 microliters of successive dilutions of each compound of berberine, gerbera extract, chemically synthesized silver nanoparticles, silver nanoparticles synthesized with gerbera extract, and silver nanoparticles synthesized with gerbera extract and berberine in Mueller Hinton Broth medium. Each well was poured and 100 µl of microbial suspension with a final concentration of 10^5 CFU/ml was added to each well. Then the plate was incubated at 37 degrees Celsius for 18 to 24 hours. Culture medium alone and bacterial suspension alone were used as negative control and positive control, respectively. It should be mentioned that the antibiotic tetracycline was used to compare its antibacterial effects with the studied compounds and to check and control the bacterial strains. The minimum concentration of the compound that inhibits the growth of the bacterial agent was reported as MIC µg/ml.

Results: Synthesized silver nanoparticles with *Hypericum perforatum* extract have maximum plasmonic absorption at 440 nm. The zeta potential of the samples was 10/08 and the average hydrodynamic diameter of nanoparticles after 1 month of storage was around 140 nm. FTIR spectroscopy confirmed the presence of biological compounds around silver nanoparticles as stabilizers. The diffraction peaks in the XRD pattern confirmed the fcc crystal structure of the nanoparticles. The exact size of nanoparticles based on TEM results was about 30 nm. The results of the evaluation of MIC of the synthesized compounds on the studied bacteria showed that the nanoparticles synthesized by berberine and *Hypericum perforatum* extract had the highest antibacterial effects. However, each of the compounds Berberine and *Hypericum perforatum* extract alone did not show significant antibacterial properties. Based on the results of the present study, the MICs of the nanoparticle synthesized by berberine and gerbil for *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* and *K. pneumoniae* bacteria were equal to 0.15, 0.075, 0.0375, 0.185 and 0.039 mg/ml respectively. The study of Gudari and his colleagues was conducted on the antimicrobial effects of gerbil on food-borne bacteria. The findings of this study showed MIC values of 0.0078, 0.5, and 0.001 mg/ml for *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*, respectively, which were not consistent with our study. This inconsistency can be due to various reasons, including the use of methanol compounds in this study.

Results of this study also showed that the highest inhibitory concentration of nanoparticles synthesized by berberine and *Hypericum perforatum* extract was related to *P. aeruginosa* (0.0375 mg/ml) and the lowest inhibitory concentration was related to *E. faecalis* (0.185 mg/ml).

Conclusions: In this study, a simple one-step green synthesis method for stable silver nanoparticles using extracts of gerbera and

berberine is presented. The preparation and synthesis of nanoparticles showed more efficiency in terms of stability as well as time and the use of additional stabilizing/regenerating agents compared to chemical synthesis. It was confirmed that this synthesis method is environmentally friendly and a fast approach for synthesis and provides a cost-effective and efficient solution for the synthesis of silver nanoparticles. The silver nanoparticles synthesized in this method were monodisperse, spherical, with a size of about 30 nm and a crystalline structure. The XRD study confirmed the FCC crystal structure in them and the TEM analysis showed that the particles have a spherical shape and good dispersion. The prepared nanoparticles are surrounded by the natural compounds found in the extract of gerbera and berberine and are protected by a protective layer made of molecules in the plant extract [containing hydroxyl functional groups]. The results of the present study showed that silver nanoparticles synthesized with berberine and *Hypericum perforatum* extract have significant antibacterial effects. As a result, nanoparticles, including silver nanoparticles, can become one of the most important alternatives to antibiotics due to their unique properties in targeting bacteria. However, achieving definitive results requires further studies in this area.

سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گل راعی و بربرین و بررسی اثر ضدباکتریایی آنها

فاطمه عسکری فر^۱، ابراهیم شفائی^۱، مهسا صدیقی^{۲،۳}، امیر توکلی کارشک^{۱،۴*}

۱. مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۲. گروه فارماسیوتیکس و نانوفناوری، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۳. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۴. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۵۶۳۲۳۸۱۵۲۵ فاکس: ۰۵۶۳۲۳۸۱۵۲۵ پست الکترونیک: a.tavakoli@bums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به اینکه مواد در ابعاد نانو خواص منحصر به فرد فیزیکی و شیمیایی پیدا می کنند، در سال های اخیر استفاده از فناوری نانو در حوزه های مختلف از جمله داروسازی کاربرد فراوانی پیدا کرده است. در این میان، نانوذرات نقره، در مطالعات متعددی از نظر خواص ضد میکروبی آن مورد تایید قرار گرفته اند. هدف مطالعه حاضر، بررسی خواص ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گل راعی و بربرین می باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گل راعی به تنهایی و همچنین در ترکیب با بربرین سنتز شده و توسط روش های میکروسکوپ الکترونی عبوری [TEM]، پراش نور پویا [DLS]، اسپکتروسکوپی انتقال فوری مادون قرمز [FTIR] و تفرق اشعه ایکس [XRD] مشخصه یابی شدند. اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده بر روی سویه های استاندارد باکتری های اشیرشیاکلای، سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا نوموניה، استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوکوس فکاليس مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظت مهاری [MIC] نانوذره نقره به تنهایی و در ترکیب با گل راعی برای باکتری های مورد مطالعه با استفاده از روش میکرودايلوشن براث مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج مشخصه یابی نانوذرات نقره سنتز شده نشان داد اندازه ذرات حدود ۳۰ نانومتر بوده و ساختار کریستالی کوپیک داشتند. همچنین حضور گروه های عاملی شاخص با استفاده از FTIR مورد تایید قرار گرفت. ارزیابی مقادیر MIC نانوذرات سنتز شده بر روی باکتری های مورد مطالعه نشان داد نانوذره سنتز شده بوسیله بربرین و گل راعی دارای بیشترین اثرات ضد باکتریایی بود در صورتیکه هر کدام از ترکیبات بربرین و گل راعی به تنهایی خواص ضدباکتریایی قابل توجهی نشان ندادند. براساس نتایج این مطالعه نانوذرات سنتز شده با گل راعی و بربرین بیشترین اثر مهارکنندگی را بر سودوموناس آئروژینوزا با MIC ۰/۰۳۷۵ mg/ml و کمترین اثر مهارکنندگی را بر باکتری انتروکوکوس فکاليس با MIC ۰/۱۸۵ mg/ml نشان دادند.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گل راعی و بربرین دارای اثرات ضدباکتریایی قابل توجهی نسبت به عصاره گل راعی و بربرین به تنهایی هستند. در نتیجه نانوذرات نقره مورد مطالعه با توجه به ویژگی های منحصر به فردی که در هدف قرار دادن باکتری ها دارند می توانند در کاربردهای پزشکی و داروسازی با انجام مطالعات بیشتر مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: نانوذرات، نقره، گل راعی، بربرین، ضد باکتریایی، حداقل غلظت مهاری رشد

دریافت: ۱۴۰۲/۳/۲۸ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۲۹

مقدمه

امروزه بیماری‌های عفونی از مهمترین مباحث و چالش‌های موجود در قرن ۲۱ هستند. شیوع بالای بیماری‌های عفونی و تجویز بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی شده و درمان بیماری‌ها را با مشکل مواجه نموده است و از سوی دیگر منجر به افزایش هزینه‌های سیستم بهداشتی درمانی شده است [۱]. افزایش روزافزون مقاومت دارویی یک چالش بهداشتی مهم در سطح جهان به شمار می‌رود، به طوری که پیش بینی می‌شود عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم تا سال ۲۰۲۵، بیش از ۱۰ میلیون مرگ و میر و ۱۰۰ میلیون تریلیون دلار خسارت مالی به بار خواهند آورد [۲].

از روش‌های جایگزین، استفاده از گیاهان دارویی به عنوان ترکیبات ضدباکتریایی است که از گذشته‌های دور [۳،۴] در تشخیص، پیشگیری و درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است [۵،۶]. از سویی دیگر بیماران استقبال بیشتری از گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی دارند، بطوریکه بر طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت بیش از ۸۰ درصد از مردم دنیا از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند [۷]. استفاده از داروهای شیمیایی در مقایسه با گیاهان دارویی همراه با عارضه جانبی بیشتر بوده و مقرون به صرفه نیست؛ به همین علت استفاده از سایر روش‌های درمانی مانند طب مکمل و گیاهی جهت درمان بیماری‌های عفونی پیشنهاد می‌شود [۸-۱۰].

یکی از گیاهان دارویی مطلوب در این حوزه، گل راعی با نام علمی *Hypericum Perforatum* گیاهی از خانواده *Hypericaceae* است که در غرب اروپا، آسیا و شمال آفریقا می‌روید. این گیاه علفی و دائمی است که سرشاخه‌های گلدار آن، قسمت با ارزش گیاه از نظر دارویی می‌باشد و از پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی در دنیا است [۱۱،۱۲]. ماده موثره این گیاه شامل: سودوهیپریسین، پیش ماده هیپریسین، فلاونوئیدهایی نظیر کامپفرول، کوئرستین، هیپروزید،

ایزو کوئرستین، روتین، آمنتوفلاون، کاتیشن‌ها، بی‌فلاونوئیدها، ادهیپرفورین‌تان‌ها، کافئیک، کلروژنیک و روغن‌های فرار مانند ژرانیول، میرسن، لیمون، هیومیولن، کاریوفیلین، میریستیک، پالمیک، استئاریک، کارتنوئیدها، کولین و نیکوتین آمید است [۱۳]. امروزه این گیاه جهت درمان افسردگی ملایم تا متوسط کاربرد قابل توجهی دارد. همچنین نشان داده شده است که این گیاه دارای خاصیت ضد ویروسی، ضدباکتریایی و ترمیم‌کنندگی زخم می‌باشد [۱۰،۱۴].

بربرین نوعی ماده موثره گیاهی با خواص بسیار زیاد می‌باشد. این آلکالوئید علاوه بر اینکه در گیاهان خانواده بربریداسه وجود دارند، در خانواده‌های گیاهانی مانند راتونکولاسه‌ها، پاپاوراسه‌ها و روتاسه نیز یافت می‌شوند. تاکنون مطالعات زیادی اثرات درمانی و مؤثر بربرین را نشان داده‌اند [۱۵-۱۸]. از آن جمله می‌توان به اثرات بسیار قوی آنتی اکسیدانی، فعالیت ضدباکتریایی گسترده و دارا بودن سمیت کم در دوزهای بالا بربرین اشاره نمود [۱۹،۲۰].

امروزه فناوری نانو با دستکاری در سطح اتم و مولکول‌ها، ترکیبات و مواد با خواص جدیدی تولید کرده است. مقیاس نانو منحصر به فرد بوده و خصوصیات ذاتی از قبیل استحکام، مقاومت در مقابل حرارت، نفوذ گرما، رطوبت را افزایش می‌دهد. همچنین اندازه ذره در مقیاس نانو منجر به افزایش سطح به ازای یک حجم ثابت از ماده و افزایش تماس و واکنش‌پذیری نانوذرات می‌شود [۲۱]. مطالعات نشان داده‌اند که نانوذرات نقره دارای خاصیت ضدباکتریایی هستند. این نانوذرات علاوه بر داشتن اثرات کشندگی علیه باکتری‌ها، ویروس‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها ترکیبی بی خطر، مؤثر، با توانایی بالا در جذب و پراکنده کردن نور، سازگاری بالا با بدن موجودات زنده و نیز با قابلیت میانکنش با مولکول‌های زیستی بوده و کاربردهای زیادی دارند

¹Nanoparticle

که بیش از ۶۵۰ گونه میکروارگانیزم از قبیل ویروس و باکتری را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۲۲].

روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی جهت تولید نانوذرات وجود دارد. سنتز شیمیایی معمولاً شامل احیا نمک‌های یونی در محیط مناسب با استفاده از احیاکننده مانند سیترات سدیم است و جهت ممانعت از واکنش‌پذیری و حفظ خواص مطلوب آن‌ها یک پایدار کننده به آن‌ها اضافه می‌شود [۲۳]. این روش سنتز اقتصادی بوده ولی اثرات نامطلوب زیستی و زیست محیطی ایجاد می‌کند [۲۴-۲۶]. بدینوسیله محققان استفاده از میکروارگانیزم‌ها، آنزیم‌ها، گیاهان و بخصوص عصاره‌های گیاهی را به عنوان روش زیست‌سازگار جایگزین روش‌های شیمیایی و فیزیکی تحت عنوان سنتز سبز نانوذرات پیشنهاد کرده‌اند. باتوجه به مطالب ذکر شده فوق هدف از انجام این مطالعه بررسی سنتز سبز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گل راعی و بربرین و پس از مشخصه یابی نانوذرات با استفاده از روش‌های مختلف مانند میکروسکوپ الکترونی عبوری [TEM]، طیف سنجی انتقال فوریه مادون قرمز [FTIR] پراش نور پویا [DLS]، و پراش اشعه ایکس [XRD]، بررسی اثرات ضدباکتریایی آن‌ها بود.

روش کار

تهیه عصاره گیاه گل راعی

گیاه گل راعی در ابتدا به خوبی شسته شده و پس از خشک شدن در دمای اتاق به خوبی آسیاب شد. جهت تهیه عصاره گل راعی ۱ گرم از پودر آن را به ۱۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر اضافه کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و دور ۵۰۰ rpm بر روی حرارت قرار داده شد. در مرحله بعد محلول را از گاز استریل و سپس از کاغذ صافی عبور داده و در مرحله آخر فیلتراسیون با استفاده از فیلتر سرسنگی ۰/۴۵ میکرومتر انجام شد تا عصاره کاملاً شفاف به دست آمده و ذرات درشت جداسازی

شوند. جهت تهیه پودر عصاره برای انجام آزمایشات، عصاره حاصل در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد کاملاً خشک گردید.

سنتز سبز نانوذرات نقره

در ابتدا محلول نیترات نقره ۱۰ میلی مولار تهیه نموده و سپس با نسبت ۲:۱۰ نیترات نقره:عصاره مخلوط شدند. سنتز در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد و همزدن با دور ۵۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. سپس نانوذرات با استفاده از سانتریفوژ جداسازی شده و با آب دوبار تقطیر شستشو داده شدند. جهت سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گل راعی و محلول بربرین شرایط واکنش همانند روش سنتز بدون بربرین حفظ شد. محلول بربرین ۱ میلی مولار تهیه شده و به مخلوط واکنش اضافه گردید. در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد پس از مدت ۳۰ دقیقه تغییر رنگ مشاهده شده و با استفاده از سانتریفوژ نانوذرات جداسازی شدند.

مشخصه یابی نانوذرات

نانوذرات سنتز شده در مرحله قبل با استفاده از روش‌های زیر از نظر خواص فیزیکی و شیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند.

تعیین اندازه نانو ذرات با استفاده از پراکندگی نور پویا

جهت تعیین اندازه نانو ذرات از دستگاه DLS [NanoBrook 90plus PALS analyzer, Brookhaven, USA] استفاده شده است. آنالیز DLS برای اندازه‌گیری قطر هیدرودینامیک ذرات [متوسط Z]، شاخص پراکندگی [PDI] و پتانسیل زتا سطحی نانوذرات نقره سنتز شده استفاده شد.

اندازه و شکل نانو ذرات با استفاده میکروسکوپ الکترونی عبوری [TEM]

تصویربرداری جهت تعیین اندازه، مورفولوژی و ریخت شناسی نانو ذرات نقره سنتز شده با

¹ Dynamic Light Scattering

عصاره‌های مختلف با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری [مدل دستگاه: Zeiss - EM10C - 100 KV] انجام شد.

آنالیز طیف سنجی انتقال فوریه مادون قرمز [FT-IR]

طیف FTIR نمونه‌ها با استفاده از طیف‌سنج FTIR مجهز به سیستم ATR به دست آمد که گروه‌های شیمیایی سطحی در نمونه‌های نانو ذرات سنتز شده با استفاده از عصاره گل راعی، نانوذرات سنتز شده با استفاده از عصاره و بربرین به همراه پودر عصاره به تنهایی، بربرین و نانو ذرات سنتز شده به روش شیمیایی را مشخص می‌کند. طیف جذبی در دامنه $4000-550\text{ cm}^{-1}$ با رزولوشن 4 cm^{-1} ثبت شدند.

آنالیز پراش اشعه ایکس [XRD]

فاز کریستالی نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه XRPD با قدرت تفکیک بالا مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، پرتو $\text{Cu K}\alpha$ با ولتاژ و جریان عملیاتی 45 kV و 20 mA استفاده شد. پروفایل پراش نانوذرات نقره در دمای اتاق با زاویه پراش $10-80^\circ$ و فواصل 0.01° جمع‌آوری شدند.

بررسی اثر ضد باکتریایی

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) در روش میکرودايلوشن برات، از پلیت ۹۶ خانه استریل استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از رقت متوالی از هر یک از ترکیبات بربرین، عصاره گل راعی، نانوذره نقره سنتز شده به روش شیمیایی، نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گل راعی و نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گل راعی و بربرین در محیط مولر هینتون برات درون هر چاهک ریخته شد و ۱۰۰

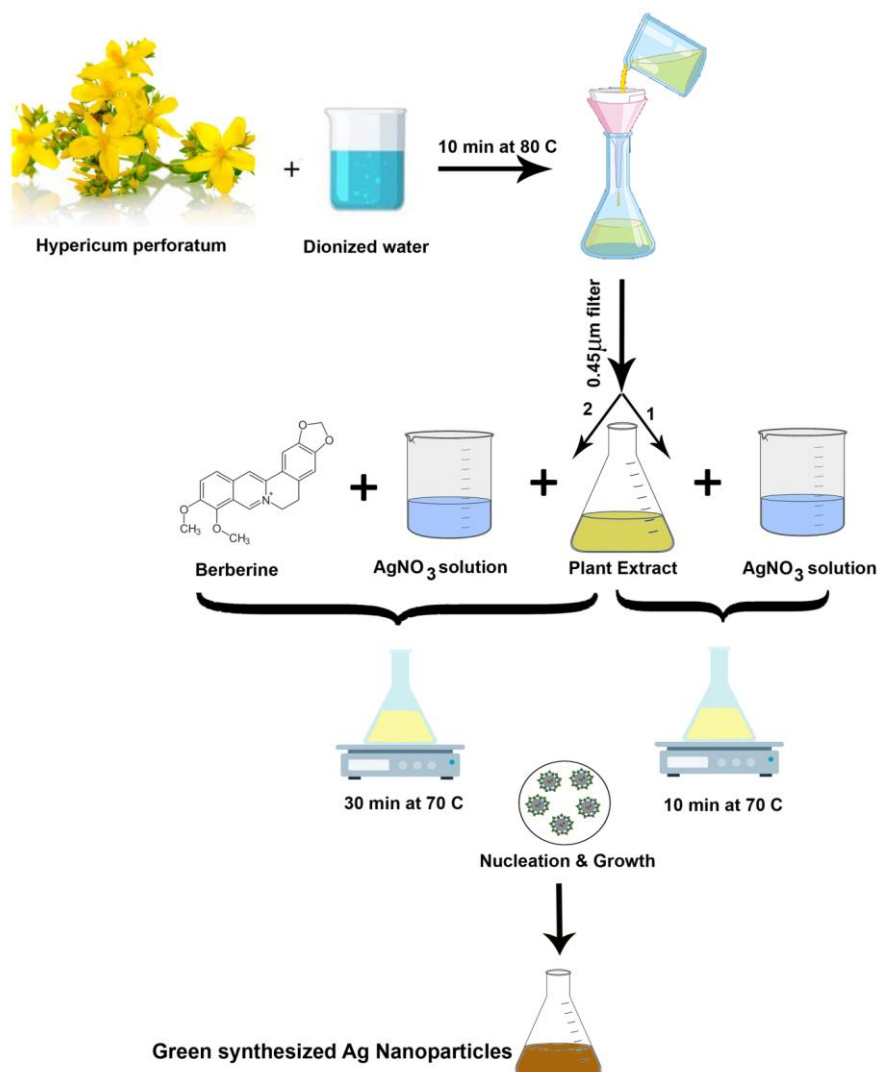
میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی باغلظت نهایی 10^5 CFU/ml به هر چاهک اضافه شد. سپس پلیت در دمای 37°C درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت انکوبه گردید. از محیط کشت به تنهایی و سوسپانسیون باکتریایی به تنهایی به ترتیب به عنوان کنترل منفی و کنترل مثبت استفاده شد. قابل ذکر است از آنتی بیوتیک تتراسایکلین برای مقایسه اثرات ضدباکتریایی آن با ترکیبات مورد مطالعه و بررسی و کنترل سویه‌های باکتریایی استفاده شد. حداقل غلظتی از ترکیب که سبب مهار رشد عامل باکتریایی شود به عنوان $\mu\text{g/ml MIC}$ گزارش گردید.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های مربوط به اندازه نانوذرات نقره سنتز شده به وسیله دستگاه DLS با سه بار تکرار اندازه‌گیری و میانگین حاصل به عنوان نتیجه در این مطالعه ثبت گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه نانوذرات نقره به روش سبز با استفاده از عصاره گل راعی و بربرین سنتز شدند و فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها در مقابل ۵ سویه باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. در روش سنتز سبز ترکیبات موجود در عصاره گیاهی به عنوان احیاکننده عمل کرده و موجب تشکیل خوشه‌های اولیه طی فرایند هسته‌زایی و رشد از اتم‌های نقره می‌شود که در نهایت نانو ذرات نقره را به وجود می‌آورد. مراحل سنتز سبز نانوذرات نقره در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. تصویر شماتیک سنتز سبز نانوذرات نقره با عصاره گل راعی و بربرین.

پس از سنتز نانوذرات به منظور اطمینان از انجام موفقیت آمیز سنتز و بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی نانوذرات به دست آمده از روش‌های مشخصه‌یابی مختلف FTIR، DLS، TEM، و XRD استفاده شد. سپس خواص ضدباکتریایی نانوذرات مقایسه با نانوذرات سنتز شده به روش شیمیایی مورد بررسی قرار گرفت.

مشخصه‌یابی فیزیکی و شیمیایی ساختار نانوذرات

نقره

تعیین اندازه نانو ذرات با استفاده از پراکندگی نور

پویا

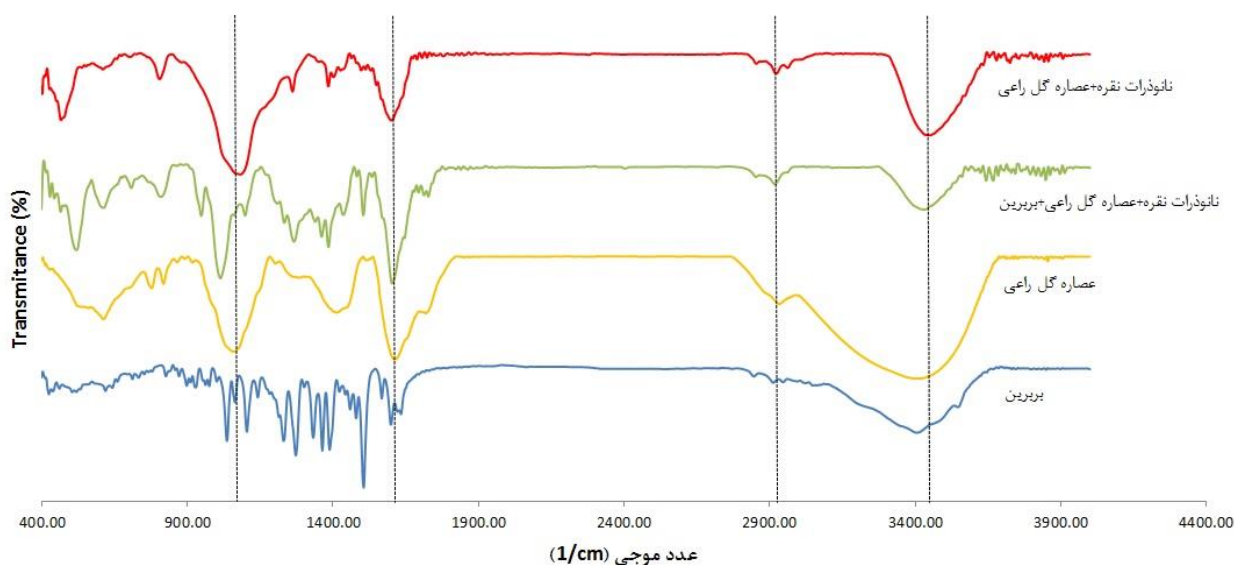
قطر هیدرودینامیک و پراکندگی ذرات در سوسپانسیون با استفاده از DLS بررسی شد. نتایج نشان داد که قطر هیدرودینامیک نانوذرات سنتز شده با گل راعی برابر با $138/17 \pm 4/59$ نانومتر و شاخص پراکندگی [PDI] آن‌ها در سوسپانسیون $0/157 \pm 0/003$ بود. از آنجایی که آنالیز DLS اندازه ذرات را در سوسپانسیون و با در نظر گرفتن لایه آبی اطراف آن‌ها اندازه‌گیری می‌کند مسلماً اندازه واقعی ذرات کوچکتر از قطر هیدرودینامیک به دست آمده می‌باشد و میکروسکوپ الکترونی عبوری می‌تواند اندازه واقعی را در حالت خشک نشان دهد. PDI

به دست آمده نیز نشان دهنده پراکندگی مناسب ذرات در سوسپانسیون می باشد.

آنالیز طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز FT-IR

طیف سنجی FTIR به منظور اثبات حضور لایه های از ترکیبات آلی بر روی سطح نانوذرات و به دست آوردن اطلاعاتی از گروه های عملکردی بر سطح نانوذرات استفاده می شود. طیف سنجی FTIR وجود ترکیبات زیستی اطراف نانوذرات نقره به عنوان پایدار کننده را مورد تأیید قرار می دهد. مولکول های زیستی

و متابولیت های ثانویه منشأ گرفته از عصاره گیاهی و همچنین حضور بربرین پایداری نانوذرات نقره را به وسیله اثرات الکترواستاتیک و فضائی القا می کنند. مولکول های زیستی حاوی گروه هیدروکسیل ذرات را برای مدت زمان طولانی تری محافظت می کنند [۲۵]. شکل ۲ طیف مادون قرمز بربرین، عصاره گل راعی، AgNPs سنتز شده با گل راعی و بربرین را نشان می دهد.



شکل ۲. نتایج طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز عصاره گل راعی، بربرین، نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گل راعی و نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گل راعی و بربرین

عصاره یک جذب را در حدود $3000-3500 \text{ cm}^{-1}$ نشان داد که متعلق به ارتعاش کششی گروه های هیدروکسیل است، و باند جذب در حدود 1200 cm^{-1} متعلق به ارتعاش خمشی گروه های هیدروکسیل است. تغییر جزئی در میزان باند ارتعاشات گروه هیدروکسیل در طیف مربوط به نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گل راعی و نانوذرات سنتز شده با عصاره و بربرین امری محتمل می باشد که مربوط به شرکت گروه های هیدروکسیل در پوشش دهی و محافظت اطراف نانوذرات می باشد. نوار ارتعاش حلقه های بنزن در $1620-1420 \text{ cm}^{-1}$ ظاهر شد. ارتعاش کششی گروه کربونیل در حدود 1600 cm^{-1}

بعنوان شاخص هیپرپسین در عصاره می باشد. بعد از تشکیل کلئید، تعدادی از ارتعاشات تغییر کرده یا ناپدید شدند که به دلیل تشکیل کلئید می باشد. پیک مربوط به گروه های هیدروکسیل فنلی بعد از تشکیل کلئید حفظ شد [۲۷].

در طیف مربوط به بربرین، جذب در حدود 3400 cm^{-1} متعلق به N-H stretch بوده و پیک های موجود در محدوده $2800-3000 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند C-H در گروه های CH_3 و CH_2 می باشد. بعلاوه، پیک در حدود 1600 cm^{-1} مربوط به پیوند ایمینیوم $[\text{C}=\text{N}^+]$ است [۲۸]. پیک های شاخص مربوط به عصاره و بربرین در نانوذرات نقره مشاهده می شود ولی با

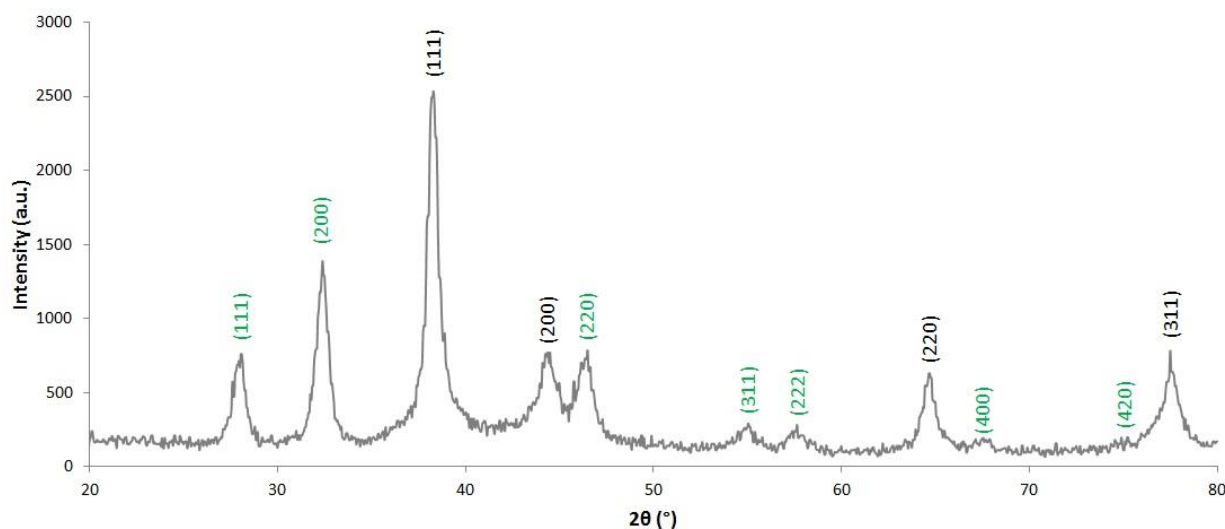
نتیجه گرفت که درجه کریستالیت و خلوص نانوذرات بسیار بالاست. فاز ثانویه مربوط به حضور ساختار AgCl نیز در این الگوی پراش نمایان است. پیک‌های XRD در زوایای 2θ 28.04° ، 32.39° ، 38.49° ، 39.09° ، 46.75° و 54.59° که مربوط به 111 ، 200 ، 220 ، 311 ، 200 و 220 به ترتیب هستند به وضوح نشان داده شده‌اند. AgCl فاز ثانویه شناخته شده‌ای می‌باشد که بطور رایج در زمان سنتز با استفاده از عصاره‌های گیاهی تولید می‌شود [۳۰]. ولیکن، این فاز ثانویه معمولاً در گزارش‌های منتشر شده ذکر نمی‌شود. طبق گزارشات موجود الگوی XRD نشان می‌دهد که روش سنتز و شرایط مورد استفاده بطور وسیعی بر نسبت فاز ثانویه Ag/AgCl اثر می‌گذارد.

توجه به حضور ترکیبات بسیار در عصاره و تداخل پیک‌ها شناسایی تمامی آن‌ها به تفکیک مشکل می‌باشد.

آنالیز پراش پرتو X و بررسی ساختار کریستالی نانوذرات

الگو XRD نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گل راعی در شکل ۳ نشان داده شده است. ساختار کریستالی کوپیک نانوذرات نقره در الگوی XRD مشخص است که پیک‌های پراش بر روی نمودار در زوایای 2θ 38.49° ، 46.75° و 54.59° متعلق به 111 ، 200 ، 220 و 311 به ترتیب مشخص شده‌اند. این پیک‌های پراش ساختار کریستالی fcc^1 نانوذرات را تأیید می‌کنند. در مواد با ساختار fcc حداکثر پراش باید از صفحه 111 باشد که در نمونه نانوذرات سنتز شده با عصاره مشاهده شد و می‌توان

¹ Face-centered Cubic

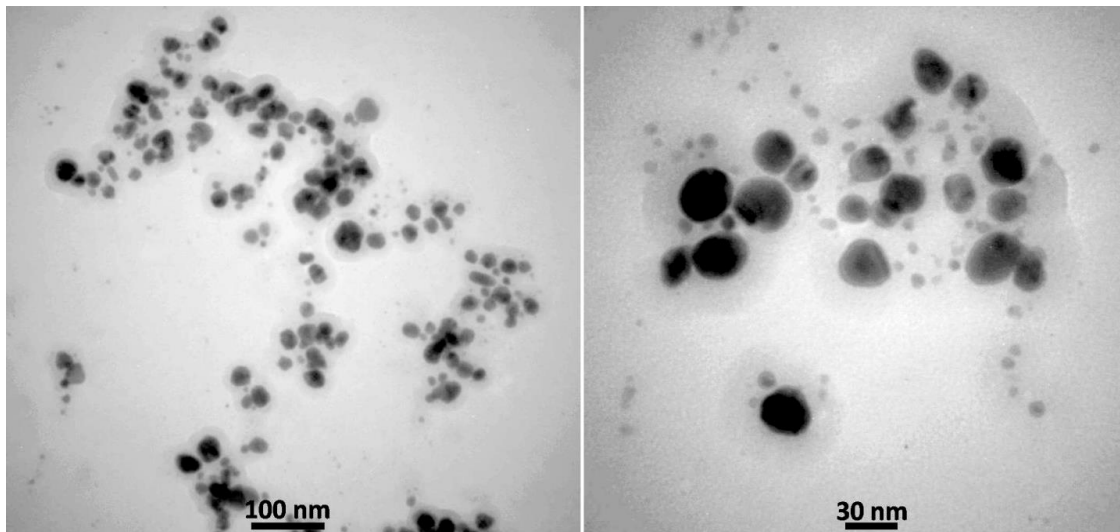


شکل ۳. الگوی XRD نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گل راعی

دقیق نانوذرات براساس نتیجه TEM حدود ۳۰ نانومتر می‌باشد. تجمعاتی از نانوذرات در تصویر مشاهده می‌شود که می‌تواند به دلیل رسوب در حین آماده‌سازی نمونه و در زمان فرایند شستشو باشد. اندازه نانوذرات در آنالیز TEM برخلاف DLS بدون در نظر گرفتن لایه هیدراسیون می‌باشد و اندازه مرکز فلزی اندازه‌گیری می‌شود.

مشخصه یابی نانو ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری

مورفولوژی و اندازه نانوذرات نقره با استفاده از TEM مطالعه شدند. میکروگراف‌های الکترونی عبوری در شکل ۴ نمایی از نانوذرات نقره را نشان می‌دهند. مطالعه TEM پراکندگی و پایداری مناسب نانوذرات کروی سنتز شده را نشان می‌دهد و اندازه



شکل ۴. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گل راعی.

یافته‌های حاصل از تعیین اثرات ضد باکتریایی

تعیین اثرات ضد باکتریایی ترکیبات سنتز شده در این مطالعه تجربی با استفاده از تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد [MIC] بر روی سویه‌های *اشریشیا کلای*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *انتروکوکوس فکالیس* و *کلبسیلا پنومونیه* مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج ارزیابی مقادیر حداقل غلظت مهار کننده رشد [MIC] ترکیبات سنتز شده بر روی باکتری‌های مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود نانوذره سنتز شده بوسیله بربرین و گل راعی دارای بیشترین اثرات ضدباکتریایی می‌باشد در صورتی که هر کدام از ترکیبات بربرین و گل راعی به تنهایی خواص ضد باکتریایی قابل توجهی

نشان ندادند. نتایج این مطالعه همچنین نشان داد بیشترین غلظت مهارکنندگی مربوط به سودوموناس آئروژینوزا (۰/۰۳۷۵ mg/ml) و کمترین غلظت مهارکنندگی مربوط به باکتری *انتروکوکوس فکالیس* (۰/۱۸۵mg/ml) بودند. مقایسه نتایج MIC در سویه‌های مختلف مورد مطالعه نشان می‌دهد که اثر نانوذره سنتز شده بوسیله بربرین و گل راعی بر روی باکتری‌های گرم منفی و باکتری‌های گرم مثبت متغیر نمی‌باشد. در واقع شدت اثر نانوذرات با تفاوت باکتری‌ها متفاوت می‌باشد؛ البته این تفاوت را می‌توان با ساختار و ترکیب شیمیایی دیواره سلولی و مکانیسم‌های موثر در فعالیت میکروارگانیسم‌های مختلف مورد مطالعه مرتبط دانست [۲۹].

جدول ۱. مقایسه مقادیر حداقل غلظت مهار کننده رشد [MIC] ترکیبات سنتز شده بر روی باکتری‌های مورد مطالعه

بربرین	گل راعی	گل راعی + نانوذره	بربرین + گل راعی + نانوذره	نانوذره شیمیایی
۱۰	۱۰	۰/۱۵	۰/۱۵	۱/۲۵
۱۰	۱۰	۰/۳۱	۰/۰۷۵	۲/۵
۵	۱۰	۰/۰۷۵	۰/۰۳۷۵	۱/۲۵
۰/۶۲۵	۱/۲۵	۰/۰۹	۰/۱۸۵	۲/۵
۱/۲۵	۵	۰/۰۷۸	۰/۰۳۹	۵

اشریشیا کلای

استافیلوکوکوس اورئوس

سودوموناس آئروژینوزا

انتروکوکوس فکالیس

کلبسیلا پنومونیه

بحث

در این مطالعه روش سنتز سبز ساده تک مرحله‌ای برای نانوذرات نقره پایدار با استفاده از عصاره گل راعی و بربرین ارائه شده است. آماده‌سازی و سنتز نانوذرات از نظر پایداری و نیز زمان و استفاده از عوامل پایدارکننده/ احیاکننده اضافی نسبت به سنتز شیمیایی کارایی بیشتری نشان داد. این مسئله تایید شد که این روش سنتز دوستدار محیط زیست و رویکردی سریع برای سنتز می‌باشد و راهکاری مقرون به صرفه و کارا برای سنتز نانوذرات نقره ارائه می‌دهد. نانوذرات نقره سنتز شده در این روش مونودیسپرس، کروی، با اندازه حدود ۳۰ نانومتر و ساختار کریستالی بودند. مطالعه XRD ساختار کریستالی FCC را در آن‌ها تایید کرده و آنالیز TEM نشان داد که ذرات شکل کروی و پراکندگی مناسبی دارند. نانوذرات تهیه شده با ترکیبات طبیعی موجود در عصاره گل راعی و بربرین احاطه شده و به وسیله لایه محافظتی تشکیل شده از مولکول‌های موجود در عصاره گیاهی [حاوی گروه‌های عملکردی هیدروکسیل] محافظت می‌شوند.

گروه‌های هیدروکسیل در پلی فنل‌های موجود در عصاره گل راعی از قبیل فلاونوئیدها می‌توانند مسئول احیای یون‌های نقره به نانوذرات نقره باشند. این ممکن است که ترانسفورماسیون توتومری این ترکیبات از فرم انول به کتو، الکترون‌های آزاد واکنش گر آزاد کند که توانایی کاهش یون‌های نقره به نقره فلزی را دارند. داده‌های موجود در این مطالعه نشان داد که این مولکول‌ها از عصاره گل راعی مسئول پایداری نانوذرات نقره هستند و در طیف FTIR نانوذرات و عصاره به تنهایی حضور گروه‌های عملکردی مشابه نشان داده شده است. مولکول‌های زیستی پایدار کننده اغلب حاوی بیش از یک جایگاه اتصال می‌باشند که می‌تواند پروتون‌ها را ایجاد کنند از قبیل کوئرتستین: آلفا-هیدروکسی-کربونیل، بتا-هیدروکسی-کربونیل، و کاتکول با داشتن دو گروه

هیدروکسیل در موقعیت‌های ارتو، می‌توانند دو پروتون تولید کنند و با آنیون‌های نیترات واکنش دهند یعنی هر مولکول کوئرتستین دو یون نقره را احیا می‌کند. عصاره گل راعی حاوی مقادیر زیادی از پلی‌فنل‌ها (فیتوشیمیایی‌ها یا متابولیت‌های ثانویه) است که گروه‌های هیدروکسیل و کتونی دارند. این ترکیبات که یک گروه کربوکسیل متصل به اتم‌های کربن در حلقه آروماتیک دارند با یون‌های نقره به عنوان اسید واکنش می‌دهند و یون‌های نقره را به فلز نقره در اندازه نانو احیا می‌کنند و از آن در برابر تجمع و رسوب محافظت می‌نمایند. این فرایند تا زمان رشد اختصاصی همه صفحات کریستالی نقره ادامه می‌یابد، یعنی، پایدار کننده از عصاره رشد صفحات اتمی با انرژی بالا را مهار خواهد کرد. این نانوذرات نقره تمایل به تجمع و رسوب داشته، به همین جهت مولکول‌های زیستی موجود در عصاره گیاهی به صفحات کریستالی با انرژی بالا جذب شده و به عنوان عامل محافظت کننده برای ممانعت از رشد بیشتر عمل می‌کنند. بنابراین، حضور غلظت‌های بالاتر از عوامل احیاکننده و محافظت کننده رسوب نانوذرات را مهار می‌کند و منجر به اندازه کوچکتر از نانوذرات نقره می‌شود [۳۰].

تا به حال مکانیسم ضدباکتریایی نانوذرات به صورت قطعی کشف نشده است اما مکانیسم‌های احتمالی عملکرد آن‌ها مورد پذیرش قرار گرفته است. به طور کلی عملکرد ضد باکتریایی نانوذرات با شکل و اندازه آن‌ها در ارتباط بوده به طوری که هر چقدر نانوذرات اندازه کوچکتر و نسبت سطح به حجم بیشتری داشته باشند به احتمال بیشتری می‌توانند به میکروارگانیسم متصل شده و اثرات خود را بر روی آن بگذارند [۳۱]. نانوذرات به دلیل اندازه کوچکی که دارا می‌باشند می‌توانند به راحتی وارد میکروارگانیسم شوند و پس از ورود به آن با اتصال به بخش‌های عملکردی پروتئین‌های ضروری و همچنین اتصال به اسیدهای نوکلئیک موجب اختلال در عملکرد آن‌ها شوند.

همچنین نانوذرات می‌توانند موجب ایجاد استرس اکسیداتیو در میکروارگانیسم شده که این استرس اکسیداتیو نیز می‌تواند موجب تغییر در عملکرد پروتئین‌های ضروری میکروارگانیسم شود. در ادامه با افزایش اختلالات در میکروارگانیسم عملکرد و نفوذپذیری غشا تغییر یافته و میکروارگانیسم از بین می‌رود [۳۲].

بر اساس نتایج مطالعه حاضر میزان MIC نانوذره سنتز شده بوسیله بربرین و گل راعی برای باکتری‌های *اشریشیا کلای*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *انتروکوکوس فکالیس* و *کلبسیلا پنومونیه* به ترتیب برابر ۰/۱۵، ۰/۰۷۵، ۰/۰۳۷۵ و ۰/۱۸۵ و ۰/۰۳۹ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. مطالعه قدرتی و همکاران بر روی اثرات ضد میکروبیال گل راعی بر روی باکتری‌های غذازاد انجام گرفت. یافته‌های این مطالعه بیانگر مقادیر MIC ۰/۰۷۸، ۰/۰۵ و ۰/۰۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب برای باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بود که با مطالعه حاضر همخوانی نداشت. این عدم همخوانی می‌تواند به دلایل مختلف از جمله استفاده از ترکیبات متانولی در این مطالعه باشد [۳۳].

در مطالعه گیتی^۱ و همکاران فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گل راعی بر روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلای* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار گرفت که نتایج این مطالعه نشان داد قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* برابر ۸ میلی متر و قطر هاله عدم رشد سویه *اشریشیا کلای* برابر ۱۱ میلی متر بود. در نتیجه نانوذرات نقره بر روی سویه *اشریشیا کلای* اثربخشی بیشتری نسبت به دو سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* نشان دادند که با

نتایج مطالعه حاضر همخوانی نداشت [۳۴]. از جمله علل این تفاوت می‌توان به تفاوت در محل رشد و جمع‌آوری گیاه و همچنین تفاوت در روش عصاره‌گیری اشاره نمود.

در مطالعه سرانو-نینو^۲ و همکاران بیان شد که میزان MIC نانوذرات سنتز شده بر روی باکتری *اشریشیا کلای* (۶/۲۵ μg/mL) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (۶/۲۵ μg/mL) بود که این اعداد کمتر از نتایج گزارش شده در مطالعه حاضر بود [۳۵]. علت اصلی این عدم همخوانی را می‌توان مرتبط با نوع نانوذره سنتز شده در این دو مطالعه دانست.

در مطالعه‌ی اوزگن^۳ و همکاران بیان شد که در غلظت یکسان (۵ μg/disc) هاله عدم رشد اطراف سویه *اشریشیا کلای* (۱۰ mm) کمتر از هاله عدم رشد سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۱/۵ mm) بود در نتیجه نشان‌دهنده اثربخشی کمتر این نانوذرات بر روی سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به سویه *اشریشیا کلای* می‌باشد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد [۳۶].

در مطالعه آل خمیس و همکاران خواص ضد باکتریایی بربرین علیه باکتری *اشریشیا کلای* اثبات گردید که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت [۳۷]. در مطالعه عمرخیام^۴ و همکاران فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات بربرین علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده شده است. در این مطالعه نانوذرات نقره بربرین توسط دو روش مختلف (APSP و EPN)^۵ سنتز گردیدند. نتایج بررسی MIC بربرین در این مطالعه نشان داد برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلای* و *سودوموناس آئروژینوزا* مقدار MIC به ترتیب برابر ۵۱۲، ۵۱۲ و ۲۵۶ μg/mL و برای نانوذرات بربرین با روش سنتز APSP مقدار MIC

² Serrano-nino

³ Ozgen

⁴ Umar Khayam

⁵ Anti-solvent Precipitation with a Syringe Pump, and Evaporative Precipitation of Nanosuspension

¹ Gitea

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گل راعی و بربرین دارای اثرات ضدباکتریایی قابل توجهی هستند در نتیجه نانوذرات نقره با توجه به ویژگی‌های منحصر به فردی که در هدف قرار دادن باکتری‌ها دارند، می‌توانند به عنوان یکی از مهم‌ترین گزینه‌های تحقیقاتی جهت یافتن جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشند. البته انجام مطالعات مشابه و استفاده از غلظت‌های مختلف عصاره گل راعی و بربرین و نانوذرات نقره جهت دستیابی به غلظت مناسب و قطعی در راستای کاربردی نمودن استفاده از این نوع نانوذرات با فعالیت‌های ضد باکتریایی پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه مقطع پزشکی با کد اخلاق IR.BUMS.REC.1399.507 می‌باشد. نویسندگان مقاله از کارشناسان آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند جهت همکاری در انجام آزمایشات کمال تشکر و قدردانی را دارند.

برابر ۱۲۸، ۶۴ و ۱۲۸ $\mu\text{g/mL}$ بودند. مقدار MIC نانوذرات بربرین سنتز شده با روش EPN برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* برابر ۳۲، ۶۴ و ۶۴ $\mu\text{g/mL}$ بودند. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده خواص ضدباکتریایی بربرین و نانوذرات بربرین سنتز شده با هر دو روش بود که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت [۳۸].

مقایسه نتایج MIC در سویه‌های مختلف مورد مطالعه نشان می‌دهد که اثر نانوذره سنتز شده بوسیله بربرین و گل راعی بر روی باکتری‌های گرم منفی و باکتری‌های گرم مثبت متغیر نمی‌باشد. در واقع میزان اثر نانوذرات با تفاوت باکتری‌ها متفاوت می‌باشد؛ البته این تفاوت را می‌توان با ساختار و ترکیب شیمیایی دیواره سلولی و مکانیسم‌های موثر در فعالیت میکروارگانیسم‌های مختلف مورد مطالعه مرتبط دانست [۳۹].

References

- 1- Zare Bidaki M, Arab M, Khazaei M, Afkar E. Anti-bacterial effect of *Mentha spicata* L. essential oil on eight standard species of gastrointestinal pathogens. J Birjand Univ Med Sci. 2014; 21 (3) :274-282. [Full text in Persian]
- 2- Dakhili M, Zahraei T, Torabi M, Khavari A. Evaluation of antimicrobial effects of 4 medicinal plants against *Salmonella typhimurium* and comparison them with common antibiotics in veterinary medicine. J Med Plants. 2006; 5(20): 21-6. [Full text in Persian]
- 3- Mohammadi Sichani M, Amjad L, Mohammadi-Kamalabadi M. Antibacterial activity of methanol extract and essential oil of *Achillea wilhelmsii* against pathogenic bacteria. Zahedan J Res Med Sci. 2011;13(3): e94008. [Full text in Persian]
- 4- Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food control. 2007;18(5):414-20.
- 5- Rezaeizadeh H, Alizadeh M, Naseri M, Shams M. The traditional iranian medicine point of view on health and disease. Iran J Public Health.2009; 38(1):169-172.
- 6- Sarhadynejad Z, Sharififar F, Pardakhty A, Nematollahi MH, Sattaie-Mokhtari S, Mandegary A. Pharmacological safety evaluation of a traditional herbal medicine "Zereshk-e-Saghir" and assessment of its hepatoprotective effects on carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. J ethnopharmacol. 2016;190:387-95.

- 7- Serrentino J. How natural remedies work: Hartley & Marks; 1991.
- 8- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J food microbiol.* 2004;94(3):223-53.
- 9- Mardaninejad S, Janghorban M, Vazirpour M. Collection and identification of medicinal plants used by the indigenous people of Mobarakeh (Isfahan), southwestern Iran. *J Herb Drugs.* 2013;4(1): 23-32.
- 10- Tabibnejad M, Arjomandzadegan M, Alikhani MY, Sadrnia M, Habibi G, Naseri Z. Comparison of the effects of *Hypericum perforatum* extract and its microemulsion with *Aloe vera* extract on *Brucella melitensis*. *Avicenna J Clin Med.* 2018;24(4):336-44.
- 11- Houghton PJ. The role of plants in traditional medicine and current therapy. *J Alter Complement Med.* 1995;1(2):131-43.
- 12- Mašković PZ, Mladenović JD, Cvijović MS, Aćamović-Đoković G, Solujić SR, Radojković MM. Phenolic content, antioxidant and antifungal activities of acetonic, ethanolic and petroleum ether extracts of *Hypericum perforatum* L. *Hemijska industrija.* 2011;65(2):159-64.
- 13- Farahani HA, Valadabadi SA, Daneshian J, Shiranirad AH, Khalvati MA. Medicinal and aromatic plants farming under drought conditions. *J Hortic For.* 2009;1(6):086-92.
- 14- Naghdi Badi H, Amin G, Makkizadeh M, Ziai S. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): A Review. *J. Med. Plants* 2005; 4 (16) :1-14. [Full text in Persian]
- 15- Affuso F, Mercurio V, Fazio V, Fazio S. Cardiovascular and metabolic effects of Berberine. *World j Cardiol.* 2010;2(4):71-77.
- 16- Imanshahidi M, Hosseinzadeh H. Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. *Phytother Res.* 2008;22(8):999-1012.
- 17- Wang K, Feng X, Chai L, Cao S, Qiu F. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects. *Drug Metab Rev.* 2017;49(2):139-157.
- 18- Yin J, Ye J, Jia W. Effects and mechanisms of berberine in diabetes treatment. *Acta Pharm Sin B.* 2012;2(4):327-34.
- 19- Birdsall TC, Kelly GS. Berberine: Therapeutic potential of alkaloid found in several medicinal plants. *Alt Med Rev.* 1997;2(2):94-103.
- 20- Pinto-Garcia L, Efferth T, Torres A, Hoheisel JD, Youns M. Berberine inhibits cell growth and mediates caspase-independent cell death in human pancreatic cancer cells. *Planta med.* 2010;76(11):1155-61.
- 21- Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, de Aberasturi DJ, de Larramendi IR, Rojo T, et al. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends biotechnol.* 2012;30(10):499-511.
- 22- Nickols-Richardson SM. Nanotechnology: implications for food and nutrition professionals. *J Am Diet Assoc.* 2007;107(9):1494-7.
- 23- Azzazy HM, Mansour MM, Samir TM, Franco R. Gold nanoparticles in the clinical laboratory: principles of preparation and applications. *Clin Chem Lab Med.* 2011;50(2):193-209.
- 24- Singh M, Manikandan S, Kumaraguru A. Nanoparticles: a new technology with wide applications. *Res J Nanosci Nanotechnol.* 2011;1(1):1-11.
- 25- Song JY, Kim BS. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2009;32(1):79-84.
- 26- Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine.* 2010;6(2):257-62.
- 27- Elshafie HS, Camele I, Mohamed AA. A Comprehensive Review on the Biological, Agricultural and Pharmaceutical Properties of Secondary Metabolites Based-Plant Origin. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4):3266.
- 28- Basavaraja S, Balaji S, Lagashetty A, Rajasab A, Venkataraman A. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Mater Res Bull.* 2008;43(5):1164-70.
- 29- Mulvaney P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir.* 1996;12(3):788-800.

- 30- Durán N, Nakazato G, Seabra AB. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(15):6555-70.
- 31- Soleimani F, Saleh T, Shojaosadati SA, Poursalehi R. Green synthesis of different shapes of silver nanostructures and evaluation of their antibacterial and cytotoxic activity. *Bio Nano Sci*. 2018;8(1):72-80.
- 32- Dangi S, Gupta A, Gupta DK, Singh S, Parajuli N. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous root extract of *Berberis asiatica* and evaluation of their antibacterial activity. *Chem Data Collect*. 2020;28:100411.
- 33- Ghodrati L, Ataie Kachoei M, Mousavi-Fard S, Moattar F. Study the antimicrobial effects of methanolic extract of *Hypericum perforatum* on foodborne bacteria. *J Food Microbiol*. 2021; 8(4):56-66.
- 34- Gitea D, Teodorescu A, Pantis C, Tit DM, Bungau AF, Bogdan M, et al. Green Synthesis of silver nanoparticles using *Hypericum perforatum* L. extract and evaluation of their antibacterial activity. *Rev Chim*. 2020;71(2):273-9.
- 35- Serrano-Niño J, Contreras-Martínez C, Solis-Pacheco J, Zamudio-Ojeda A, Aguilar-Uscanga B, Cavazos-Garduño A. Optimization of the biosynthesis of gold nanoparticles using *Hypericum perforatum* and evaluation of their antimicrobial activity. *Rev Mex Ing Quím*. 2020;19(2):889-902.
- 36- Ozgen A, Bilgic E, Aydin SG, Nizamlioglu M. Characterization of biosynthesized silver nanoparticles using *Hypericum perforatum* leaf and determination of their antibacterial activity. *Med Sci*. 2019;8(3):503-7.
- 37- Alkhamis Z, Mostafavi M, Hassani L, Mohammadi F, Mohammadi K. Antibacterial effect of Berberin and Curcumin complexes on *Escherichia coli* and *Bacillus pedillus* bacteria and comparison of their cytotoxicity on the cell line of bladder and stomach cancer cells. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2018;20(3):82-9.[Full text in Persian]
- 38- Sahibzada MUK, Sadiq A, Faidah HS, Khurram M, Amin MU, Haseeb A, et al. Berberine nanoparticles with enhanced in vitro bioavailability: characterization and antimicrobial activity. *Drug Des devel ther*. 2018;12:303.
- 39- Ma XY, Zhang WD. Effects of flower-like ZnO nanowhiskers on the mechanical, thermal and antibacterial properties of waterborne polyurethane. *Polym Degrad Stab*. 2009;94(7):1103-9.