اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره ی تهیه شده به روش سنتز سبز گیاه خرمالو بر باکتری های دهان

دکتر بهاره ناظمی سلمان[۱]، دکتر حبیب ضیغمی[۲]، دکتر علی رضا یزدی نژاد[۳]، دکتر بهسان اصغر نژاد[۴]، دکتر سمیرا بصیرشبستری[۵*]

۱-دانشیار گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

۲-استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

۳-دانشیارگروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

۴-دندانپزشک عمومی، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

۵- دانشیار گروه بیماریهای دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۱۰/۱۹ اصلاح نهایی:۱۴۰۲/۱/۱۷ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۲/۷

Antibacterial effect of silver nanoparticles synthesized by green method using diospyros extract against the orodental bacteria

Bahareh Nazemi Salman[1], Habib Zeighami[2], Alireza Yazdinezhad[3] , Behsan Asghar Nejad [4], Samira Basir Shabestari [*5]

1. Associated Professor, Department of Pediatrics, School of Dentistry, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

2. Full Professor, Department of Microbiology and Virology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

3. Associated Professor, Department of Pharmacognosy and traditional pharmacy, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

4. General Dentist, School of Dentistry, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

5. Associated Professor, Department of Oral Medicine, School of Dentistry, Firoozgar Clinical Research Development Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran,*

Received:Dec 2023 ; Accepted: April 2023

Abstract

Background and Aim: Dental caries is the most widespread chronic disease.There are several medical procedures to prevent and control its extension.Based on side effects of chemical products and effectiveness of nanoparticles, this study done inorder to evaluate the antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by green synthesis using diospyros extract on oral bacteria.

Materials and Methods: In this experimental study the diospyros extract was produced by Maceration procedures at Zanjan university of medical sciences in 2019 .The effect of silver nanoparticles produced by green synthesis was determined on various concentrations of Enterococcus, Streptococcus Mutans, Streptococcus Subrinus, Streptococcus Salivarius, Lactobacillus micro organisms by cap plate method. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bacterial Concentration (MBC) factors was determined. The datas was imported to the SPSS 24 program and analysed by Wilcoxan , Mann-Withny, Kruskal-wallis tests.

Results:.the MIC factor for streptococcus mutans, enterococcus, streptococcus salivarius was determined 1024 µgr⁄mL and for streptococcus subrinus and lactobacillus 512 µgr⁄Ml. Although the antimicrobial resistance due to MBC factor is decreased from Enterococcus to, streptococcus mutans, lactobacillus, streptococcus salivarius, streptococcus subrinus sequentially (P=0.014). The finding showed that the antimicrobial resistance of streptococcus mutans, enterococcus, streptococcus salivarius due to MIC factor is more than streptococcus subrinus and lactobacillus.

Conclusion: The results showed the bacteriostatic effect of silver nanoparticles produced by green synthesis using Diospyros extract on oral pathogens.due to herbal source an being native, maybe this plant can be useful to produce mouthwashes and toothpastes.

Key words: Antimicrobial effect, Nanoparticles, herbal extract

***Corresponding Author: samira_bsh2@yahoo.com**

J Res Dent Sci.2023;20(2):104-113

نویسنده مسئول مکاتبات:دکتر سمیرا بصیر شبستری پست الکترونیک: **samira_bsh2@yahoo.com**

خلاصه:

سابقه و هدف: پوسیدگی دندانی شایعترین بیماری مزمن فراگیر در دنیاست. برای جلوگیری از گسترش پوسیدگی و کنترل آن روش های مختلف پیشگیری و درمانی وجود دارد. با توجه به عوارض محصولات شیمیائی و کارایی نانو ذرات، پژوهش حاضر به منظور تعیین اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره تهیه شده به روش سنتز سبز عصاره گیاه خرمالو بر برخی باکتری های دهان صورت گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه آزمایشگاهی عصاره گیاه خرمالو به روش ماسراسیون(خیساندن) در دانشگاه علوم پزشکی زنجان تهیه شد. تاثیر نانو ذرات نقره تهیه شده به روش سنتز سبز در رقت های مختلف نسبت به انتروکوک، استرپتوکوک موتانس، استرپتوکوک سوبرینی، لاکتوباسیل، استرپتوکوک سالیواریوس توسط چاهک پلیت تعیین گردید. متغیرهای حداقل غلظت مهار کنندگی(MIC: minimum inhibitory concentration) و حداقل غلظت کشندگی (MBC: minimum bacterial concentration) محاسبه شد. اطلاعات توسط نرم افزار SPSS24 وارد کامپیوتر و با تست های Wilcoxan, Mann-,withny Kruskal-wallis تحلیل شدند.

یافته ها: مقادیر MIC برای استرپتوکوک موتانس و سالیواریوس و انتروکوک µgr/mL ۱۰۲۴ و برای استرپتوکوک سوبرینی و لاکتوباسیل ۵۱۲µgr/mL برآورد گردید. لذا میزان مقاومت گونه های استرپتوکوک موتانس و سالیواریوس و انتروکوک نسبت به نانو ذرات نقره تولید شده به روش سنتز سبز گیاه خرمالو از گونه های استرپتوکوک سوبرینی، لاکتوباسیل بیشتر بود. (P=۰/۰۱۴) بر اساس نتایج هاله عدم رشد و آزمایش MBC، میزان مقاومت باکتری ها نسبت به نانو ذرات نقره تولید شده به روش سنتز سبز گیاه خرمالو به ترتیب انتروکوک، استرپتوکوک موتانس، لاکتو باسیل، استرپتوکوک سالیواریوس و سوبرینی کاهش یافت.

نتیجه گیری: نانو ذرات نقره تهیه شده به روش سنتز سبز گیاه خرمالو اثر باکتریواستاتیک بر باکتری های دهان داشتند. با توجه به زیست بوم این گیاه شاید بتوان از آن در تولید دهانشویه و خمیر دندان بهره برد.

کلید واژه‌ها: عوامل ضد عفونت ، باکتری، ، نانوپارتیکل ، عصاره گیاهی

مقدمه:

پوسیدگی دندانی به عنوان یک بیماری مسری ، شایع ترین بیماری مزمن در جهان و شایع ترین بیماری دندانی در کشورهای آسیایی میباشد[۱]. باکتری استرپتوکوک موتانس فاکتور اصلی در پوسیدگی اولیه می باشد.[۲] استرپتوکوک موتانس علاوه بر پوسیدگی دندانی در شقاق گوشه لب (انگولار چلایتیس) و التهاب غده پاروتید نیز نقش دارد. باکتری های رده لاکتو باسیل باعث پیشرفت پوسیدگی بخصوص در عاج میشوند. پوسیدگی همچنین می تواند توسط استرپتوکوک میتیس و سالیواریوس , انتروکوک فکالیس, اکتینومایسس, پروتلا, وایونلا, بیفیدو باکتریوم و سایر گونه ها ایجاد گردد.[۳] روش های رایج تولید نانو ذرات شامل روش های فیزیکی، شیمیایی، روش بیولوژیک می باشد[۴].

یکی از بهترین روش‌ها تولید بیولوژیکی ذرات با استفاده از ارگانیسم ها می باشد.گیاهان، بهترین کاندید برای بیوسنتز ذرات نانو می باشند. مزایای روش زیستی مانند هزینه کمتر، سرعت بیشتر، مقیاس بالای تولید و تهدید محیط زیست باعث شده که در حال حاضر توجه بیشتری به تولید نانوذرات به روش سنتز سبز شود. سنتز سبز روشی است که در آن نانو ذرات با استفاده از ترکیبات پلی فنولیک موجود در عصاره آبی یا الکلی گیاهان بدون پسماند و زیست سازگار تولید میشوند[۴-۶]. نظر به پیشرفت های اخیر شیمی سبز، مطالعاتی در زمینه تولید ذرات نانو انجام گرفته که اثرات بیولوژیک و خواص فیزیکی و شیمیایی این ذرات را گزارش کرده اند.امروزه نانو ذرات نقره در طیف وسیع به عنوان ضد باکتری مورد استفاده قرار میگیرند[۷].

گزارش شده که نانو ذرات نقره برای بدن انسان، غیر سمی است و بیشترین تاثیر را در غلظت های اندک و بدون هیچ عارضه جانبی دارد[۸].

در دو دهه اخیر، فعالیت های گسترده ای برای پیشرفت دارو های جدید از محصولات طبیعی به علت مقاومت میکرو ارگانیسم ها به دارو های موجود انجام گرفته است[۹]. در مطالعات متعدد از گیاهانی همچون به لیمو، بارانک برگ‌شانه‌ای، رز پرچین، گل داودی گونه موریفولیوم، دارچین،زردچوبه و خرمالو جهت سنتز نانو ذرات نقره استفاده شده است. واکنش های شیمیایی سنتز سبز نانو ذرات و همچنین عوامل دخیل در این فرایند به خوبی شناخته نشده است. در هر کشوری تلاش شده است تا با استفاده از عصاره گیاهان بومی آن منطقه به روشی آسان و سازگار با محیط زیست، نانو ذرات نقره با ویژگیهای مناسب تهیه نمایند[۱۰و۱۱].

خرمالو شامل ۴۰۰ گونه می باشد که در آسیا، آفریقا، آمریکای جنوبی و مرکزی وجود دارد[۱۲]. این میوه در تمام نقاط ایران یافت می شود[۱۳]. خرمالو از خانواده Ebenacea، درختانی دارای برگ های ساده با گل هایی عموما تک جنسی هستند [۱۴]. میوه خرمالو منبع سرشاری از آنتی اکسیدان ها، کاروتنوئید، پلی فنول ها و مقدار کمی تانن می باشد و همچنین ریشه خرمالو خاصیت آنتی باکتریال و ضد قارچی دارد[۱۵-۱۷]

تا به امروز راه های گوناگون زیستی برای تهیه زیستی نانو ذرات فلزی شناخته شده است، اما استفاده از بسترهای گیاهی برای تهیه نانو مواد یک روش جدید و طبق اصول شیمی سبز است. گیاهان ظرفیت بسیاری برای استفاده با هزینه اولیه اندک در صنعت و در عین حال استفاده ساده در روش های زیست سازگار دارند که قابلیت استفاده در ساخت نانو ذرات را دارند، ولی هنوز مطالعات علمی جهت استفاده از آنها جهت تولید نانو مواد انجام نگرفته است و توانایی آنها جهت استفاده در شیمی سبز شناخته نشده است. بنابراین، در بسیاری از کشورهای پیشرفته فعالیت های پژوهشی در جهت گسترش فناوری نانو و استفاده از آن در مسیر تولیدات بیشتر با روش های شیمی سبز و سازگار با محیط زیست در جریان است[۱۹و۱۸]. با توجه به اینکه گیاه خرمالو یک گیاه بومی است و می توان آن را به راحتی و با هزینه های اندک پرورش داد شاید بتوان از این گیاه در ابداع شیوه های نوین تولید مواد ضد میکروبی بهره یافت. لذا این مطالعه با هدف تعیین اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره ی تهیه شده به روش سنتز سبز گیاه خرمالو (Diospyros) بر پاتوژن های دهان انجام گرفت.

مواد و روش ها

این آزمایش در دو مرحله تهیه نانوذرات نقره به روش سنتز سبز گیاه خرمالو در آزمایشگاه فارماگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی زنجان و مشاهده تاثیر آن بر روی باکتری های مورد آزمایش در آزمایشگاه باکتری شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زنجان انجام شد.

در این مطالعه آزمایشگاهی پس از تایید کمیته اخلاق (IR.ZUMS.REC.1396.79)شناسایی گونه گیاهی، میوه خرمالو از محل رویش آن در زنجان جمع آوری شد و در سایه به دور از نور آفتاب و در دمای اتاق خشک گردید نمونه های خشک شده تا زمان عصاره گیری در یخچال دانشکده داروسازی نگهداری شدند. از نمونه گیاهی پودر شده به روش ماسراسیون (خیساندن) عصاره آبی تهیه شد. بدین نحو که ۵ گرم از گیاه به کمک هاون چینی پودر گردید و سپس جهت عصاره‌گیری آبی بدون حذف حلال، به داخل بالون دستگاه تقطیر در خلاء(مدل ۴۰۰۳ Laborota شرکت Heidolph آلمان، محدوده خلاء mbar1000-1 جهت تبخیر حلال ها با استفاده از خلاء) منتقل شد. سپس حلال(۱۲۵ میلیلیتر آب دیونیزه) به آن اضافه گردید و با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و دور متوسط به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد و عصاره آبی تهیه شد .عصاره گیری مشابه دردمای ۵۰ و ۸۰ درجه سانتی گراد نیز انجام شد. با استناد به مطالعات قبلی دمای اتاق بهترین دما برای عصاره گیری میباشد.[۱۸] پس از گذشت ۳۰ دقیقه، عصاره گیاهی در دستگاه سانتریفیوژ (مدل ۳۳۰ kشرکت Sigmaآلمان) قرار داده شد و با دور ۶۰۰۰ بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس محتویات فالکون توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شد و در نهایت عصاره به

دست آمده در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد .

روش تهیه نانو ذرات

تولید نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره میوه گیاه خرمالو به روش احیاء نیترات نقره انجام شد. به منظور بهینه سازی تولید نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه خرمالو و به دست آوردن حداکثر میزان غلظت نانو ذرات از نسبت های مختلفی از عصاره گیاه استفاده شد. بدین صورت که ابتدا ۵ لوله شماره گذاری شد و توسط سمپلر (Extragene) مقادیر ۵۰-۱۰۰-۲۰۰-۴۰۰-۸۰۰ میکرولیتر به ترتیب در لوله های شماره ۱ تا ۵ منتقل شدند. سپس میزان ۸ میلی لیتر از نمک نیترات نقره ۱ میلی مولار به هر یک از لوله ها اضافه شد تا نسبتهای ۱ به ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و۱۶۰ به دست آید.(شکل۱) بر اساس آزمایشات قبلی، بهترین نسبت در تولید نانو ذرات نقره سنتز شده به روش سنتز سبز نسبت ۱ به ۴۰ بود. بعد از هم زدن نمونه ها با دست، نمونه ها در اتاقک تاریکی قرار داده شدند تا اثر نور در سنتز به حداقل برسد. با گذشت زمان رنگ محلول ها به قهوه‌ای می گراید اما در لحظه سنتز، محلول حاصل، بی رنگ است. نهایتا عصاره صاف شده درمجاورت املاح نقره قرار داده شد و بررسی های بعدی جهت تولید نانو ذرات نقره با استفاده از روش های مناسب دستگاهی بدین شرح انجام شد.[۱۸]

آنالیز اسپکتروفتومتری

از لوله ازمایش ۱ به ۴۰ به میزان ۱ میلی لیتر به وسیله سمپلر برداشته و به میکروتیوب منتقل شد. سپس نمونه به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۶۰۰۰ بر دقیقه سانتریوفیوژ گردید. رسوب به دست امده ۲ مرتبه با آب دیونیزه شستشو داده شد و در نهایت ۱ میلی لیتر آب دیونیزه به رسوب حاصل افزوده شد و نمونه به دست آمده به مدت ۵ دقیقه ورتکس(مخلوط کردن نمونه های ازمایشگاهی در لوله های ازمایشگاهی در حجم کم) شد. سپس حدود ۱ میلی لیتر از محلول آماده شده و به داخل سل مورد نظر ریخته شد و میزان ۳ میلی لیتر آب دیونیزه به آن اضافه گردید. برای خواندن جذب نمونه ابتدا با استفاده از آب دیونیزه، دستگاه blank شد. سپس نمونه در سل کوارتز ریخته شد و جذب آن در بازه طول موج ۷۰۰-۳۰۰ نانومتر بررسی گردید. نتایج نشان دادند که بیشترین جذب نانو ذرات نقره تهیه شده به این روش در محدوده ۴۵۰-۴۱۵ نانومتر خصوصا ۴۲۰ نانومتر بود.[۱۸]

استاندارد نمودن عصاره با استفاده از تعیین جذب نوری انجام شد. بدین صورت که پس از بررسی میزان جذب نانو ذرات تولید شده در طول موج ۷۰۰-۳۰۰ نانومتر، سایز نانو ذرات تولید شده توسط دستگاه زتاسایزر اندازه گیری شد. به این صورت که ابتدا ضریب شکست محلول سنتزی با دستگاه رفراکتومتر (مدل ۱ Tشرکت ATAGO ژاپن) سنجیده شد که مقادیر ضریب شکستی نزدیک صفر را نشان داد. سپس دستگاه اسپکتروفتومتر دوپرتویی (مدل۸۰ UV–Vis T شرکتJENWAY انگلستان) برای سنجش جذب محلول در nm633بکار رفت. پس از بررسی تولید نانو ذرات نقره با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، اندازه ذرات تولید شده با استفاده از دستگاه زتاسایزر مورد بررسی قرار گرفت و سایز ذرات در نسبت ۱به ۴۰ به علت غلظت بیشتر نانو ذرات نقره و بازده بالای این نمونه اندازه گیری شد .

در این مطالعه جهت روایی آزمایش ها از ۲ نمونه کنترل مثبت و منفی (عصاره خرمالو و نانو ذرات نقره احیا شده به روش شیمیایی) استفاده شد. در ادامه مطالعه انتقال نمونه ها به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی انجام شد. معیار انتخاب میکروارگانیسم ها، شایع و موثر بودن این میکروب ها در بیماری های دهان بود. لذا سویه های استاندارد باکتریها شامل موارد زیر ارزیابی گردیدند.

Streptococcus mutans 1683(ATCC 35668)و
Streptococcus salivarius 1448(CIP53.158)و
Streptococcus sobrinus1601
Lactobacillus acidophilus و(ATTC27607)

Enterococcus faecalis1237 و 1643(DSM20079)
(NCTC8213)

محیط کشت برای استرپتوکوک ها، انتروکوک ها و لاکتوباسیل ها به ترتیب (TSB Trypticase soy agar Agar) ، مولر هینتون آگار و (MRS MAN, ROGOSA and SHARPE Agar)[merck,Germany]بود. کشت میکروبی به صورت pour plate method یا triplicate انجام گردید بدین نحو که برای ارزیابی رشد باکتری ، آنها در محیط مایع حل و سپس در پتری دیش ریخته شدند. اثر ضد میکروبی (خاصیتی که میکروارگانیسمها را از بین برده یا رشد آنها را متوقف میکند Merriam-Webster Online Dictionary) غلظت های مختلف نانو ذرات نقره تهیه شده به روش سنتز سبز گیاهی، عصاره خرمالو و نانو ذرات نقره با غلظت ۱۰۰ µgr/mL بصورت جداگانه روی سویه های فوق الذکر در محیط آزمایشگاهی بررسی شدند[۲۱-۱۹]. در این مطالعه متغیرهای (MIC) حداقل غلظت مهار کنندگی (MBC) حداقل غلظت کشندگی و قطر هاله عدم رشد به ترتیب برای نانو ذرات نقره تهیه شده به روش سنتز سبز عصاره خرمالو ، نانو ذرات نقره برای بررسی تاثیر یا عدم تاثیر و میزان تاثیر نانو ذرات نقره تهیه شده به روش سنتز سبز گیاه خرمالو در مقایسه با نانو ذرات نقره و عصاره خرمالو به تنهایی محاسبه شدند.

MIC

به منظور تهیه باکتری از نمونه ها ابتدا نمونه ها در محیط کشت مایع به صورت (یک شبانه روز در دمای اتاق) کشت داده شدند، بعد از ایجاد کدورت در محیط مایع، نمونه ها بر روی محیط کشت به منظور اطمینان از خلوصشان ایزوله شدند. سپس رقیق سازی عصاره ها در ۱۲ لوله حاوی محیط کشت مایع به روش رقیق سازی ۱/۲ بدین صوت که ۱/۲ از غلظت اولیه برداشته شد و به محیط کشت مایع اضافه شد و غلظتی معادل نصف غلظت اولیه بدست آمد و به همین صورت تا غلظت های پایین تر این کار ادامه پیدا کرد و از غلظت آخر برداشته شده و دور ریخته شد تعداد باکتری ها در همه لوله ها ثابت و برابر 1.5×10^5 CFU/ml بود. پس از این مراحل و اضافه کردن مواد و گرما گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق انجام شد. بعد از وقوع رشد، با بررسی کدورت لوله ها رشد و یا عدم رشد باکتری ها ارزیابی گردید. ازآنجایی که حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC: Minimum Inhibity Concentrating)عبارت است از کمترین میزان ماده ای که مانع فعالیت میکرو ارگانیسم ها می شود لذا غلظت آخرین لوله ای که رشد در آن مشاهده نشد بعنوان MIC منظور گردید که برای باکتری های مورد آزمایش بر حسب میکروگرم بر لیتر و با روش ماکروتیتر تعیین گردید.

MBC

این آزمایش در واقع معادل محیط کشت جامد آزمایش MIC می باشد بطوریکه همان غلظت های آزمایش MIC بر روی دیسک های محیط کشت جامد مورد بررسی قرار میگیرد و ۱۲ چاهک دقیقا مشابه آزمایش MIC آماده شده و حداقل غلظت کشندگی مواد تعیین میشود. غلظت آخرین چاهکی که رشد میکروبی در آن مشاهده نشد بعنوان حداقل غلظت کشندگی یا MBCدر نظر گرفته شد. در این مطالعه MBCو قطر هاله عدم رشد به ترتیب توسط روش رقیق سازی و چاهک گذاری (Disc Diffusion)تعیین و بر حسب میلیمتر بررسی شدند. حساسیت باکتری های استاندارد و گونه های مقاوم به آنتی بیوتیک نیز به روش چاهک پلیت تعیین گردید. در روش چاهک گذاری که در آزمایشهای میکروبی مورد استفاده قرار میگیرد، باکتری ها روی محیط کشت جامد و در چاهک های جداگانه تحت تاثیر مواد آنتی باکتریال کشت داده میشوند .

محاسبه قطر هاله عدم رشد

در آزمایش دیگری پلیت های حاوی هر کدام از سویه های باکتریایی، تهیه شدند و سپس با افزودن رقت های مختلف از عصاره گیاه خرمالو و نانو ذرات تولیدی، پلیت ها به مدت ۲۴

ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند و قطر هاله عدم رشد باکتری با استفاده از خط کش اندازه گیری شد.

برای درک بهتر تاثیر ضد میکروبی نانو ذرات تولید شده به روش سنتز سبز گیاه خرمالو در این آزمایشات، عصاره خرمالو تهیه شد و نانو ذرات نقره تهیه شده به روش شیمیایی نیز به صورت جداگانه مورد آزمایش قرار گرفتند تا تاثیر این روش در بهینه سازی و افزایش اثر ضد میکروبی بیشتر از پیش قابل مشاهده باشد و عصاره خرمالو و نانو ذرات نقره تهیه شده به روش شیمیایی نیز به عنوان گروه کنترل در مقایسه با این نانو ذرات بررسی گردند.

در این مطالعه آزمایشات در سه رده نانو ذرات تولید شده به روش سنتز سبز گیاه خرمالو و رده عصاره خرمالو و رده نانو ذرات نقره احیا شده به روش شیمیایی و سه آزمایش تعیین قطر هاله عدم رشد و MIC و MBC صورت گرفت. داده ها در نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ ثبت شدند. تستهای Kruskal wallis H , جهت مقایسه کلی داده های سه گروه بدون در نظر گرفتن باکتری و غلظت و از تستهای Mann -U- Whitney و Wilcoxon جهت مقایسه گروه های کنترل با گروه آزمایش نانو ذرات نقره سنتز شده استفاده شد. سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها:نتایج آزمایش قطر هاله عدم رشد و حداقل غلظت مهار کنندگی به ترتیب در جداول ۱ و۲ نمایش داده شدند:

جدول ۱- اندازه قطر هاله عدم رشد بر حسب میلیمتر بر باکتری های مختلف در غلظت های متفاوت

استرپتوکوک موتانس		لاکتوباسیل		انتروکوک		استرپتوکوک سوبرینی		استرپتوکوک سالیواریوس		رقت ($\mu gr/mL$)
عصاره خرمالو	نانوذرات نقره	نانوذرات نقره خرمالو	عصاره خرمالو	نانوذرات نقره	نانوذرات نقره خرمالو	عصاره خرمالو	نانوذرات نقره	نانوذرات نقره خرمالو	عصاره خرمالو	نانوذرات نقره	نانوذرات نقره خرمالو	
۷	۱۷	۱۲	۷	۱۱	۱۳	۹	۱۴	۱۱	۷	۱۵	۱۳	۱۰۰
۶	۱۶	۹	۶	۱۰	۱۰	۷	۱۳	۹	۵	۱۴	۱۲	۵۰
۰	۱۶	۸	۶	۱۰	۹	۷	۱۲	۷	۰	۱۰	۱۰	۲۵
۰	۱۲	۷	۵	۸	۶	۰	۱۰	۶	۰	۹	۸	۱۲.۵
۰	۱۰	۰	۰	۷	۰	۰	۱۰	۰	۰	۹	۷	۶.۲۵

جدول ۲- MIC بر روی باکتری های مورد ازمایش بر حسب µgr/mL

نانوذرات نقره شیمیایی	نانوذرات نقره خرمالو	عصاره خرمالو	باکتری
۸	۱۰۲۴	۱۰۲۴	استرپتوکوک موتانس
۶۴	۱۰۲۴	۲۰۴۸	استرپتوکوک سالیواریوس
۸	۵۱۲	۱۰۲۴	استرپتوکوک سوبرینی
۱۶	۱۰۲۴	۱۰۲۴	انتروکوک
۳۲	۵۱۲	۱۰۲۴	لاکتوباسیل

میانگین قطر هاله عدم رشد نانوذرات نقره خرمالو در مورد تمامی باکتریها و در اکثر رقت ها بیشتر از قطر هاله عدم رشد عصاره خرمالو بود. اما نحوه عملکرد نانو ذرات نقره خرمالو، عصاره خرمالو و نانوذرات احیا شده به روش شیمیایی بدون در نظر گرفتن متغیر (نوع باکتری و رقت) تفاوت معناداری (P=۰/۰۰۱) داشتند. مقایسه اثر عصاره خرمالو و نانو ذرات نقره تولید شده با استفاده از عصاره ی خرمالو بر اساس میزان رقت و مستقل از نوع باکتری،حاکی از این بود که در رقت ۶/۲۵ تقریبا مشابه هم عمل کردند.(P =۰/۳۱۰)

مقایسه اندازه قطر هاله عدم رشد عصاره خرمالو و نانو ذرات نقره تولید شده با استفاده از عصاره ی خرمالو ، بر اساس نوع باکتری و مستقل از رقت، حاکی از تاثیر معنادار بر استرپتوکوک سالیواریوس و سوبرینی بود. مقایسه تاثیر میزان رقت دو ماده بر میزان قطر هاله عدم رشد ، فارغ از نوع باکتری حاکی از این بود که عصاره خرمالو صرفا در رقت ۶.۲۵ تاثیر معناداری داشت. (P=۰/۰۰۸)

بحث:

در مطالعه حاضر به بررسی تاثیر نانو ذرات نقره سنتز شده به روش سنتز سبز گیاه خرمالو بر ۵ پاتوژن دهان پرداخته شد زیرا مطالعاتی که در زمینه نانو تکنولوژی و شیمی سبز انجام شده نشان دادند که میتوان با کمک گرفتن از شیمی سبز محصولات نانویی تولید کرد که هم از نظر اقتصادی به صرفه است و محصولات زیست سازگار تری تولید میشود.[۲۲-۲۷]

Hanumantarau و همکاران اثر ضد باکتریایی مهاری نانو ذرات نقره تولید شده به روش سنتز سبز گیاه خرمالو نوع paniculata را بر روی طیف گسترده ای از میکروارگانیسمها تایید کردند بعلاوه دوز های بالاتر بر رشد میکروارگانیسمها نسبت به دوز های پایین تر تاثیر بیشتری میگذارد که این یافته ها همسو با نتایج این مطالعه بود. همچنین آنها نتیجه گرفتند که نانوذرات نقره تولید شده به روش سنتز سبز گیاه خرمالو اثر ضد میکروبی مشابه آنتی بیوتیک ها در کاهش فعالیت بیماری زایی باکتری ها دارد. شاید این فرضیه به دلیل تاثیراتی باشد که نانو ذرات نقره بر دیواره باکتریها دارد و باعث از هم گسستگی دیواره باکتری مشابه اثر عمل آنتی بیوتیک میگردد.[۱۹]

مطالعه Taranth و همکاران حاکی از اثر مهاری نانو ذرات نقره تولید شده با استفاده از عصاره برگ گیاه خرمالو گونه malabarica را بر روی ۲ باکتری گرم منفی اشرشیاکولی و سودوموناس آیریژینوزا بود. با توجه به اینکه با روشی مشابه این تحقیق و انجام آزمایش قطر هاله عدم رشد صورت گرفت لذا میتواند نتایج مطالعه پیش رو مبنی بر اثر بخش بودن نانو ذرات تهیه شده با استفاده از عصاره گیاه خرمالو را تایید کند. عدم انجام آزمایشات (MIC) و (MBC) و عدم بررسی جداگانه اثر ضد میکروبی عصاره گیاه خرمالو از نقاط ضعف مطالعه ایشان بود.[۲۸]

این نتایج در زمینه تاثیر نانو ذرات نقره می تواند بدین دلیل باشد که این ذرات با کاهش پتانسیل غشای پلاسما و ناپایداری آن، آدنوزین تری فسفات درون سلول را کاهش میدهند. این عمل با تحت تاثیر قرار دادن عملکرد غشاء سلول باکتری و کاهش سطح پتاسیم درون سلول فرآیند تبادل سدیم پتاسیم سلولی را تحت تاثیر قرار داده و باکتری را تضعیف میکند و باعث مرگ باکتری می‌گردد. سلولهای باکتری در pH بیولوژیکی به دلیل فراوانی گروه های اسیدی، بار منفی دارند این تفاوت بار باکتری ها و نانو ذرات نقره باعث چسبندگی و افت فعالیت‌های زیستی باکتری ها، ناشی از نیروهای جاذبه الکترواستاتیکی است. نانو ذرات نقره با گسستن اجزای ممانعت کننده موجود در غشاء خارجی باکتری منجر به آزاد شدن تصاعدی مولکولهایی نظیر لیپوپلی ساکارید و پورینها از غشاء سیتوپلاسمی می شود. نقره به گروه های عاملی پروتئین ها متصل شده و باعث از بین رفتن خواص اصلی (Denaturation) پروتئین ها می شود.[۲۹] نانو ذرات نقره تنها به سطح غشاء سلولی نمی‌چسبد و به درون سلول ها هم نفوذ میکند. نانو ذرات نقره پس از نفوذ به داخل سلول باکتری

با غیر فعال کردن آنزیم های آن و تولید هیدروژن پراکسید باکتری را از بین میبرد. فعالیت بالای نانو ذرات نقره مربوط به انواع گونه‌هایی است که یونهای نقره را آزاد می کنند و بواسطه متصل شدن به سطح غشاء سلولی، واکنشهای آنزیمی رخ میدهد که سیستم تنفس سلولی باکتریایی را تخریب می‌کنند بعلاوه.$+Ag$ با گروههای تیولی آنزیمهای حیاتی واکنش داده و آنها را غیرفعال میکند. همچنین یونهای نقره با تاثیر بر DNA باکتری، مانع از تکثیر DNA می‌شود.[۳۰]

Attar و همکارانش نشان دادند که نانو ذرات پالادیوم تولید شده توسط عصاره برگ گیاه خرمالو نوع kaki اثر مهاری بر رشد اشرشیاکولی و استافیلوکوک اورئوس دارد. با توجه به اینکه روش آزمایش آنها مشابه مطالعه حاضر بود یافته های تحقیق آنها نیز همسو با نتایج مطالعه حاضر، دال بر تولید محصولات زیست سازگار و جدید و امکان پذیر بودن استفاده از عصاره گیاه خرمالو در تولید نانو ذرات ضد میکروبی بود. عدم انجام آزمایشات حداقل غلظت (MIC) و (MBC) و عدم بررسی اثر جداگانه عصاره خرمالو بر باکتری ها از نقاط ضعف مطالعه ایشان بود[۳۱]. از آنجایی که برای مقایسه میزان اثر ضد میکروبی عناصر مختلف با گیاه خرمالو در تولید نانو ذرات نقره، می بایست از انواع باکتری های یکسان استفاده نمود و چون در مطالعه بررسی شده اخیر باکتری ها بررسی شده با باکتری های مطالعه حاضر متفاوت بودند نمی توان در زمینه ارجحیت کدام عنصر نسبت به دیگری اظهار نظر قطعی نمود [۳۲].

Tahir L و همکاران فعالیت ضد باکتریایی خرمالو گونه blanco، خرما و شاه توت علیه پاتوژن های پوسیدگی زا را در یک محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند و اذعان داشتند که گیاهان با متابولیت های ثانویه ای که تولید می کنند تاثیر زیادی بر رشد استرپتوکوک موتانس دارند که همسو با نتایج مطالعه حاضر بود همچنین پیشنهاد کردند که می توان از ترکیبات به جای آنتی بیوتیک ها استفاده کرد که بنظر می رسد این فرضیه نیاز به آزمایشات بیشتر و طولانی تر دارد و مطالعه پیش رو نمی تواند صحت و سقم این فرضیه را تایید یا رد بکند [۳۳].

Ghassan و همکارانش عصاره گیاه خرمالو بی رنگ را بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی به روش چاهک گذاری آزمایش کردند و بیان کردند که عصاره گیاه خرمالو اثر مهاری بر رشد باکتری ها دارد که مشابه نتایج مطالعه حاضر می باشد اما این مطالعه نمی تواند در مورد باکتری های گرم منفی اظهار نظر کند.برای مقایسه میزان اثر ضد میکروبی گیاهان مختلف با گیاه خرمالو در تولید نانو ذرات نقره، می بایست از انواع باکتری های یکسان استفاده نمود و چون در دو مطالعه اخیر باکتریهای بررسی شده با باکتری های مطالعه حاضر متفاوت می باشند، نمی توان در جهت ارجحیت کدام گیاه نسبت به دیگری اظهار نظر نمود.[۳۴]

جهت رفع مشکلات این مطالعه (محدودیت رویش گیاهان بومی، نامحلول بودن ذرات نانو،دشواری در کشت بی هوازی باکتریها،تاخیر در پروژه بدلیل وابستگی به برخی وسایل آزمایشگاهی در سایر مراکز علمی) برای تعیین روائی وپایائی از نمونه کنترل استفاده گردید و همچنین کشت بصورت pour plate method یا triplicate (برای ارزیابی رشد باکتری میتوان باکتری ها را در محیط حل کرد و سپس در پتری دیش ریخت) انجام شد.

در این مطالعه علاوه بر تعیین اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده به روش سنتز سبز گیاه خرمالو، نانوذرات نقره احیا شده و عصاره خرمالو نیز جداگانه مورد آزمایش قرار گرفتند. ارزیابی و مقایسه گروه نانو ذرات نقره تولید شده به روش سنتز سبز گیاه خرمالو با گروه عصاره خرمالو و نانو ذرات نقره احیا شده شیمیایی به عنوان گروه کنترل در مطالعات مشابه مشاهده نشد که این مورد از نقاط قوت طرح حاضر میباشد چرا که امکان یک مقایسه اجمالی و بررسی نحوه تاثیر استفاده از نانوذرات نقره سنتز سبز شده در مقایسه با عصاره خرمالو و نانو ذرات نقره احیا شده شیمیایی را فراهم کرده و امکان ارزیابی و درک بهتر اثرات ضد میکروبی نانوذرات تهیه شده به روش

سنتز سبز گیاه خرمالو را فراهم مینماید. بررسی اثرات مهاری غلظت های مختلف عصاره خرمالو بر سویه های مختلف پاتوژن های دهانی از دیگر نکات قوت مطالعه حاضر بود. این مطالعه تنوع زیستی باکتریایی نسبتا بالایی را دارا بود که در مقایسه با نمونه مطالعات مشابه از نقاط قوت آن محسوب میشود ولی بدلیل اینکه تمامی باکتریهای مورد بررسی از نوع گرم مثبت بی هوازی بودند نمی تواند در مورد باکتریهای گرم منفی یا هوازی اظهار نظر کند بنابراین پیشنهاد میشود در مطالعات آینده تاثیر بر باکتری های گرم منفی و هوازی نیز بررسی شوند.

نتیجه گیری:

نانو ذرات نقره تهیه شده به روش سنتز سبز عصاره خرمالو بر روی فعالیت عوامل پوسیدگی زای دندانی تاثیر گذاشته ،و به نظر میرسد این گیاه میتواند در تولید محصولاتی اعم از دهانشویه، خمیردندان، یا نخ دندان آغشته به نانوذرات نقره تولید شده به روش سنتز سبز گیاه خرمالو به کار رود.

تضاد منافع: هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

تقدیر و تشکر: بدینوسیله تشکر خود را از آزمایشگاه فارماسیوتیک دانشکده داروسازی و گروه باکتری شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زنجان و تمام کسانی که در به ثمر رسیدن این مقاله همکاری داشته اند اعلام مینماییم.

Referecnes:

1-Lima SLA, Santana CCP, Paschoal MAB, Paiva SM, Ferreira MC. Impact of untreated dental caries on the quality of life of Brazilian children: population-based study. Int J Paediatr Dent 2018; 28(4):390-399.

2-Marchant GE, Sylvester D.Transnational Models for Regulation of Nanotechnology.J Law Med Ethic 2006;34(4):714-25.

3- Barani KF, Hossenzadeh H, Fazli BS, Velayatipour H, Ghazvini K, Ajami BM. Evaluation of Antimicrobial effects of Aqueous and Alcoholic Extracts of Saffron on Oral Pathogenic Microbes (Streptococcus Mutans, Lactobacillus, Candida Albicans).J Mash Dent Sch 2016; 40(3): 203-12.

4- Nazemi Salman B, Sallah S, Abdi F, Salahi S, Rostamizadeh K, Basir Shabestari S. The Comparison of Antimicrobial Effect of Nigella sativa Nanoparticle and Chlorhexidine Emulsion on the Most Common Dental Cariogenicic Bacteria. Med J Islam Repub Iran. 2021;35:149-154.

5- Sukumaran P, Eldho K , Poulose A.Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. Int Nano Letters 2012;2:32-9.

6- Kasani M, Shahouri M, Ahamadimoghdam M, Maleki R. Determination of Organophosphorous and Carbamat Pesticides Residue in Drinking Water Resources.Int J Hydro Ene 2010; 2 (4) :250-257.

7-Bystrzejewska GJ, Goliomowski P, Urban L. Nanoparticles: their potential toxicity, waste amd environmental. Waste manag J 2009; 29(9): 2587-95.

8-Mirzaee R, Masoum S,Abbasi N.Green synthesis of iron oxide nanoparticles by extract of aerial organs of Russian knapweed [dissertation].Pharmacology. Kahashan Uni Med; 2018.

9-Antariksh S,Tripathia RM, Fahmina Z, Priti S. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous solution ofFicus benghalensisleaf extract and characterization of their antibacterial activity. Math letters 2012; 67:91-94

10- Naiwa HS. Hand Book of Nanostructural Materials and Nanotechnology. 4 th ed. New York: WB sunders; 2000.P.1-52.

11-Crooks RM, Lemon BI, Sun L, Yeung LK, Zhao T,Curr D. Dendrimer-Encapsulated Metals and Semiconductors: Synthesis, Characterization, and Applications. Chem Res 2001; 34 (3):181–190

12- Toumey CP. Reading Feyman into nanotechnology. Techne: Res Phil Tech 2008; 12(3): 133-168

13-Swihart MT,Ganes Z. Vapor phase synthesis of nanoparticles .Current Opinion in Colloid. Inter Sci 2003; 8(1): 127-133

14- Matsumoto T, Mochida K, Itamura H, Sakai A. Cryopreservation of persimmon (Diospyros kaki Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. Plant Cell Rep 2001;20(5):398-402.

15-Liu HF, Zhang JG, Guo LP.Study on technology of storage and fresh keeping of ‘Mopan-persimmon (in Chinese). Tianjin SciTechnol. Agric. Iran Food Sci Technol Res J 2007;1:23-29.

16-.Loo YY, Rukayadi Y, Nor-Khaizura M-A-R, Kuan CH, Chieng BW, Nishibuchi M , et al. In Vitro Antimicrobial Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles Against Selected Gram-negative Foodborne Pathogens. Front Microb 2018;9:155-9.
17-García-Cayuela T, Nuño-Escobar B, Welti-Chanes J, Cano MP. In vitro bioaccessibility of individual carotenoids from persimmon (Diospyros kaki, cv. Rojo Brillante) used as an ingredient in a model dairy food. J Sci Food Agri 2018; 98(9):3246-54.
18-Persic M, Jakopic J, Hudina M. The effect of post-harvest technologies on selected metabolites in persimmon (Diospyros kaki Thunb) fruit. J Sci Food Agric 2019; 99(2):854-860
19-Hanumanta R,Lakshmidevi N, PratapK,Ganapaty S, Lakshmi P. Green synthesis of silver nanoparticles using methanolic root extracts of *Diospyros paniculata* and their antimicrobial activities. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2016; 62:553-7
20- Raisi R. Biosynthesis of nanoparticles and evaluation the cellular toxicity on Huh7 of carcinoma and HFFF2 of human cellular [dissertation].Pharmacology.Zanjan Uni Med Sci. 2018.
21-Naz S, Tabassum S, Freitas FN, Mujahid M, Zia M, Carcache EJ. Anticancer and antibacterial potential of *Rhus punjabensis* and CuO nanoparticles. Nat Prod Res 2020;34(5):720-725.
22-Vahid-Dastjerdi E, Sarmast Z, Abdolazimi Z, Mahboubi A, Amdjadi P, Kamalinejad M. Effect of Rhus coriaria L. water extract on five common oral bacteria and bacterial biofilm formation on orthodontic wire. Iran J Microb 2014; 6(4):269-75.
23-Ghorbani F, Abbasi F, Bakhtiari R, Norouzi XM, Bafandeh M, shayegh S,et al. Effect of Aqueous Extract Mixture of Rhus Coriaria L.-Punica Garanatum-Rosa Damanscene on Streptococcus Mutans Compared to Chlorhexidine: An In-Vitro Study. J Mash Dent Sch 2020; 44(4): 373-383.
24- Featherstone JD. Dental caries: a dynamic disease process. Aust Dent J 2008;53(3):286-91.
25- Chandra J, Gouri H, Vijayan S. Effect of methanolic and ethyl acetate leaf extract of Diospyros discolor against gram positive and gram negative bacteria. J Pharm Sci 2015; 8(2):389-392.
26-Awwad AM, Nidá M , Salem A, Abdeen O. Green synthesis of silver nanoparticles using carob leaf extract and its antibacterial activity.Int J Industrial Chem 2013;4:29.
27-Harekrishna B,Bhui K, Gobinda P, Priyanka S, Sankar P,Ajay M, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using latex of-Jatropha curcas Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng Aspects 2009; 339:134–9
28-Taranath TC, Rhedaginal B,Rajani P, Sindhu M. Phytosynthesis of silver nanoparticles using the leaf extract of diospyros malabarica (Desr) kostel and its antibacterial activity against human pathogenic gram negative escherichia coli and pseudomonas aeruginosa**.** Nt J Pharm Sci Rev Res 2015 ;18(2):109-114
29-Mostafa MH,Eman H, Khaled I, El-Baghdady Z, Doaa M. Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity.Arab J Chem 2014;7(6):1131–9.
30- Hadilu H, Habibi B,Yazdinejad AR.Evaluation the chemical components in extracted plants and photosynthesis of nano silver with use of aqoua extracts [dissertation].Chemistry: Azar Shahid Madani Uni ; 2013.
31-Attar A, Altikatoglu Yapaoz M. Biosynthesis of palladium nanoparticles using *Diospyros kaki* leaf extract and determination of antibacterial efficacy Prep. Biochem Biotechnol 2018;14:1-6.
32-Nazemi Salman B, Basir Shabestari S, Shaboyi Jam M, Alizadeh Tari S, Shirinbak I. Periodontal parameters and oral hygiene in diabetic and nondiabetic adolescents in Zanjan. Med J Islam Repub Iran. 2020;34:12-19.
33-Tahir L, Aslam A, Ahmed S,Pak A. Antibacterial activities of Diospyros blancoi, Phoenix dactylifera and Morus nigra against dental caries causing pathogens: An in vitro study**.** J Pharm Sci 2017; 30(1):163-169.
34-Ghassan MS, Wasnaa HM, Thorria R, Ahmed A, Al-Amiery A, Amir H, et al. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Eucalyptus chapmaniana* leaves extract. Asian Pac J Trop Biomed 2013; 3(1): 58–63.