

Investigating Synergistic Effect of Silver Nanoparticles and Nisin on *Escherichia coli* Genome

Samrand Karkon

M.Sc, Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University Branch Urmia, Urmia, Iran, samrand.karkon@gmail.com

Bahram Golestani Eimani *

Assistant professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University Branch Urmia, Urmia, Iran, golestani_bahram@yahoo.com

Abstract

Introduction: Considering increasing concern about the resistance of microbial infections to antibiotics and nisin peptide reducing effect (AMP) due to resistance growth in bacterial strains; extensive researches were implemented based on nanotechnology. The aim of current research was to investigate synergistic effect of silver nanoparticles conjugated with nisin on genome of *Escherichia coli* as a gram negative bacteria model.

Materials and methods: After culturing the bacteria in a Nutrient Broth medium; treatments were performed at concentrations of 50, 75, 100, 125 µg/ml of silver nanoparticles; concentrations of 25, 50, 75, 100, 150, 200 µg/ml of nisin and concentrations of 30, 50, 75 µg/ml of silver nanoparticles conjugated with nisin solution. After reading the optical density at 600 nm of control samples and treated at concentrations of 50 and 75 µg/ml of silver nanoparticles; 50 and 75 µg/ml of nisin, 50 and 75 µg/ml of silver nanoparticles conjugated with nisin, DNA was extracted and RAPD-PCR was used to investigate genomic effect. Analysis of the results of RAPD-PCR was performed by NTSYS-PC software based on Dice coefficient to calculate the similarity matrix and UPGMA.

Results: The results showed that the growth inhibitory effect of silver nanoparticles conjugated with nisin was higher than of individual application of nisin and silver nanoparticles and the genomic effect of the above mentioned conjugates was higher and lower than nisin and silver nanoparticles, respectively. Therefore, the mentioned conjugated nanoparticles and nisin had no synergistic effect on the bacterial genome.

Discussion and conclusion: These conjugated nanoparticles with nisin can be used as proper and strong antibacterial with the least genomic and mutation effect.

Key words: AgNPs, Nisin, *Escherichia coli*, Chain Reaction (RAPD-PCR)

* Corresponding author

Received: April 28, 2018 / **Accepted:** July 2, 2018

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هشتم، شماره ۲۹، بهار ۱۳۹۸، صفحه ۲۳-۱۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۰۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۱۱

بررسی آثار سینرژیستی نانوذرات نقره و نایسین روی ژنوم باکتری *اشریشیا کلی*

سامرند کارکن: کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاداسلامی، ارومیه، ایران، samrand.karkon@gmail.com
بهرام گلستانی ایمانی*: استادیار گروه زیست‌شناسی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاداسلامی، ارومیه، ایران، golestani_bahram@yahoo.com

چکیده

مقدمه: با توجه به نگرانی روزافزون مقاومت عفونت‌های میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌ها و کاهش اثر پپتید (AMP) نایسین به علت افزایش مقاومت سویه‌های باکتریایی، پژوهش‌های گسترده‌ای طی سال‌های اخیر با محوریت نانوفناوری انجام شده است. هدف پژوهش حاضر، بررسی آثار سینرژیستی نانوذرات نقره متصل به نایسین روی ژنوم باکتری *اشریشیا کلی* (مدلی از باکتری‌های گرم منفی) است.

مواد و روش‌ها: پس از کشت باکتری در محیط مایع Nutrient Broth، تیمار با غلظت‌های ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره، غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نایسین و غلظت‌های ۵۰، ۳۰ و ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره متصل به نایسین انجام شد. پس از خواندن جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر، DNA نمونه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت‌های ۵۰ و ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره، نایسین، نانوذرات نقره متصل به نایسین استخراج و از RAPD-PCR برای بررسی اثر ژنومی استفاده شد. نتایج RAPD-PCR با نرم‌افزار NTSYS-PC بر مبنای ضریب Dice برای محاسبه ماتریکس تشابه و UPGMA تجزیه و تحلیل شد.

نتایج: نشان دادند اثر مهارکنندگی رشد نانوذرات نقره متصل به نایسین بیشتر از کاربرد انفرادی نایسین و نانوذرات نقره و اثر ژنومی اتصالات یادشده نسبت به نایسین و نانوذرات نقره به ترتیب بیشتر و کمتر است؛ بنابراین نانوذرات یادشده و نایسین به طور متصل باهم اثر سینرژیستی روی ژنوم باکتری ندارند.

بحث و نتیجه‌گیری: امکان استفاده از نانوذرات نقره در حالت متصل به نایسین به عنوان ماده ضدباکتری مناسب و قوی با کمترین اثر ژنومی و جهش‌زایی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات نقره، نایسین، باکتری *اشریشیا کلی*، RAPD-PCR

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

ظهور و گسترش سویه‌های مقاوم باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها اغلب از ویژگی‌های ژنتیکی باکتری‌ها، افزایش جمعیت، مسافرت و مصرف زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها ناشی می‌شود (۱). پپتیدهای ضد میکروبی تکثیر عوامل بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های متعارف را مهار می‌کنند و از این رو، توجه پژوهشگران را به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های یادشده به خود معطوف کرده‌اند. نایسین پپتید آمفی‌فیلیک کوچکی (۳۵۱۰ دالتون و حاوی ۳۴ آمینواسید) است که سویه‌های ویژه‌ای از لاکتوکوکوس لاکتیس^۱ آن را تولید می‌کنند. اثر نایسین در صنایع غذایی به‌علت افزایش مقاومت باکتری‌هایی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*^۲، *استرپتوکوکوس بوویس*^۳ و *لاکتوباسیلوس*^۴ کاهش و مقاومت مبتنی بر آنزیم در باکتری‌ها به‌علت حضور آنزیم نایسیناز افزایش یافته است. نایسین در غلظت‌های نانومولار فعالیت ناچیزی در برابر باکتری‌های گرم منفی (به‌علت وجود لایه لیپوبلی ساکاریدی اضافی در این باکتری‌ها) نشان می‌دهد. مقاومت مبتنی بر غشا به‌وسیلهٔ اتخاذ فرمولاسیون بر اساس نانوذرات بی‌اثر می‌شود (۲). نایسین فعالیت ضدباکتریایی خود را از طریق اتصال به غشای باکتریایی، ورود به درون غشا، تشکیل منفذ موقتی و برهم‌کنش با لیپید II اعمال می‌کند (۳). نانوذرات نقره خوشه‌هایی از اتم‌های نقره در اندازه‌های ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند که به‌علت ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد به‌طور گسترده در زمینه‌های مختلف استفاده می‌شوند (۴). فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره تابعی از اندازه آنهاست اما ویژگی‌های دیگری مانند نسبت سطح به

حجم زیاد، اشکال بلوری غیرمعمول و محل‌های واکنش نیز مهم هستند. اندازهٔ کوچک و سطح بزرگ این ذرات موجب واکنشی می‌شود که حساسیت را افزایش می‌دهد و نانوذرات به‌علت مطلوب بودن شکل با ریز موجودات واکنش می‌دهند (۵). سازوکارهای کلی و مهم برای عملکرد نانوذرات نقره شامل ناپایدار کردن پتانسیل غشا، کاهش سطح ATP و ایجاد اختلال در عملکرد پروتئین‌ها و تغییر در توالی ژنوم هستند (۶). اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره و نانوذرات نقره متصل به نایسین در ریز موجودات عامل فساد غذایی مانند *لیستریا مونوسیژنوزنز*^۵، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *پسودوموناس فلورنس*^۶، *آسپرژیلوس نیگر*^۷ و *فوزاریوم مونیلیفورم*^۸ در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی و مشخص شده است پتانسیل ضد میکروبی نایسین پس از اتصال به نانوذرات نقره افزایش می‌یابد (۷). یافتن درمان‌های ترکیبی و داروهای ضدباکتریایی جدید جایگزین به شرط نداشتن سمیت و ویژگی جهش‌زایی برای انسان و سایر جانوران به‌علت مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های بیماری‌زای شایع دارای اهمیت است. پژوهش حاضر با هدف بررسی فعالیت ضدباکتریایی و اثر ژنومی سینرژیک نانوذرات نقره و نایسین روی باکتری *شریشیا کلی*^۹ انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ محلول‌های استوک: برای تهیهٔ محلول استوک نانوذرات نقره، ۰/۰۱ گرم از آن در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با اسیدیتهٔ ۷ (حلال نانوذرات نقره) ریخته و به غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسانده شد؛ سپس به مدت ۵ دقیقه با جریان ۷۰ ولت و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد سونیکه شد.

آگارز ۱ درصد و اسپکتروفوتومتری از نظر کیفی و کمی تجزیه و تحلیل شد. اثر ژنومی سه محلول آزمایش شده به روش RAPD-PCR با استفاده از ۸ آغازگر ۱۰ جفت بازی تصادفی RAPD بررسی شد (ویژگی های آغازگرها در جدول ۱ آمده است). برای انجام واکنش ۲۵ میکرولیتری RAPD-PCR مقدار ۱ میکرولیتر آغازگر، ۱ میکرولیتر DNA ژنومی، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (سیناژن) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استفاده شد. برنامه دمایی PCR شامل واسرشت شدن اولیه DNA الگو در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ چرخه در دماهای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۵ ثانیه، ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه برای اتصال آغازگرها به رشته های الگو، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه برای سنتز رشته جدید و ۷ دقیقه گسترش نهایی رشته های ناقص در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد.

جدول ۱- آغازگرهای تصادفی به کاررفته در RAPD-PCR

نام آغازگر	توالی نوکلئوتید آغازگر
OPC-09	CTCACCGTCC
OPT-14	AATGCCGCAG
OPS-13	GTCGTTCCCTG
OPA-10	GTGATCGCAG
OPS-05	TTTGGGGCCT
OPA-11	CAATCGCCGT
OPB-07	GGTGACGCAG
OPA-09	GGGTAACGCC

تجزیه و تحلیل نتایج RAPD-PCR: پس از انجام PCR، محصولات آن روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند؛ سپس داده های حاصل از ۸ آغازگر استفاده شده بر اساس الگوی باندهای و عدم آن روی ژل به ترتیب با یک و صفر امتیازدهی شدند، ماتریکس تشابه بین ژنوم ها با نرم افزار NTSYS-PC محاسبه و دندروگرام مربوط به تفاوت ژنومی رسم شد.

محلول استوک نایسین هم طبق روش یادشده تهیه شد. برای تهیه محلول استوک نانوذرات نقره متصل به نایسین، ۵ میلی لیتر محلول استوک نقره با ۵ میلی لیتر محلول استوک نایسین مخلوط و به مدت یک شب در انکوباتور شیکردار با ۱۷۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد؛ سپس به منظور خارج کردن نانوذرات متصل نشده سه مرتبه با بافر فسفات شستشو و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و غلظت نهایی آن مشابه دو محلول یادشده تعیین شد.

کشت باکتری و تیمار آن: باکتری اشریشیا کلی

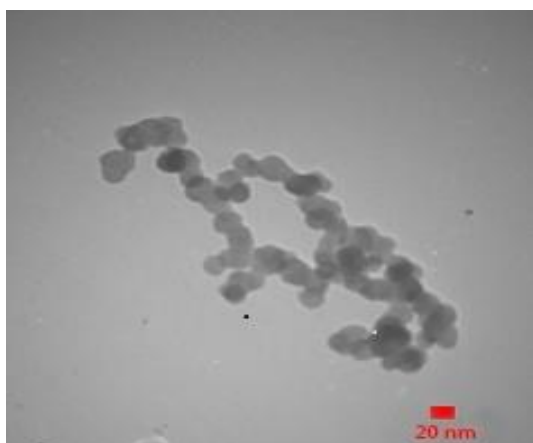
سوش *O157:H7* ابتدا در محیط جامد Nutrient Agar کشت و سپس یک کلنی تک به محیط مایع Nutrient Broth پاساژ داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، جذب نوری (OD) محیط در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۴ رسید. در ادامه، باکتری ها با غلظت های ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات نقره، غلظت های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نایسین و غلظت های ۳۰، ۵۰ و ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات متصل به نایسین تیمار شدند و جذب نوری آنها در زمان های ۲، ۴، ۶ و ۲۴ ساعت پس از تیمار در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده و ثبت شد. بر اساس نتایج این مرحله، قدرت مهارکنندگی رشد و اثر ژنومی سه محلول یادشده در غلظت های مشترک ۵۰ و ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر به منظور ارزیابی اثر سینرژیستی نانوذرات نقره متصل به نایسین مقایسه شد.

استخراج DNA و انجام RAPD-PCR: DNA

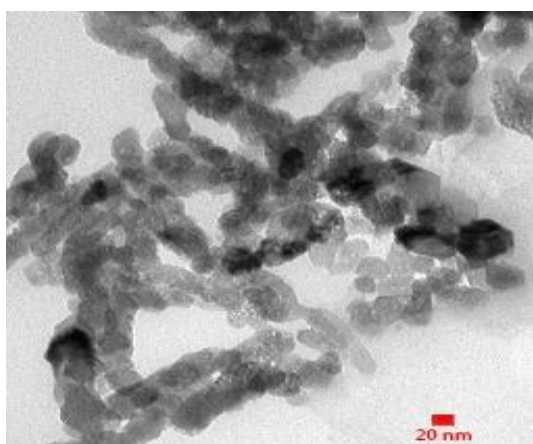
باکتری های شاهد و تیمار شده با غلظت های ۵۰ و ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر محلول های یادشده با استفاده از کیت GeNet Bio استخراج و با الکتروفورز روی ژل

نتایج

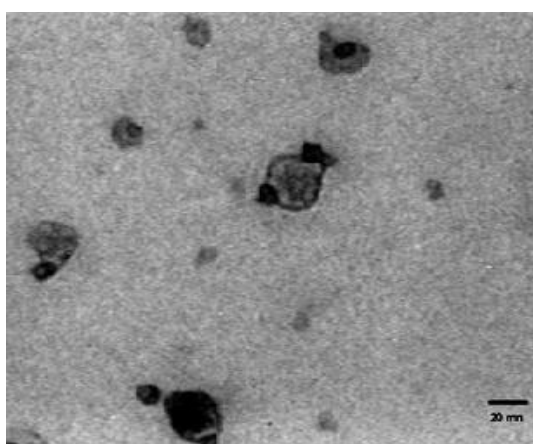
نتایج میکروسکوپ‌های الکترونی TEM، SEM و همچنین تجزیه و تحلیل XRD برای بررسی ریخت‌شناسی و تعیین اندازه نانوذرات نقره و نانوذرات نقره متصل به نایسین در شکل‌های ۱ تا ۴ آورده شده است و نشان می‌دهند اندازه نانوذرات کمتر از ۲۰ نانومتر است.



شکل ۱- عکس (TEM) مربوط به نانوذرات نقره



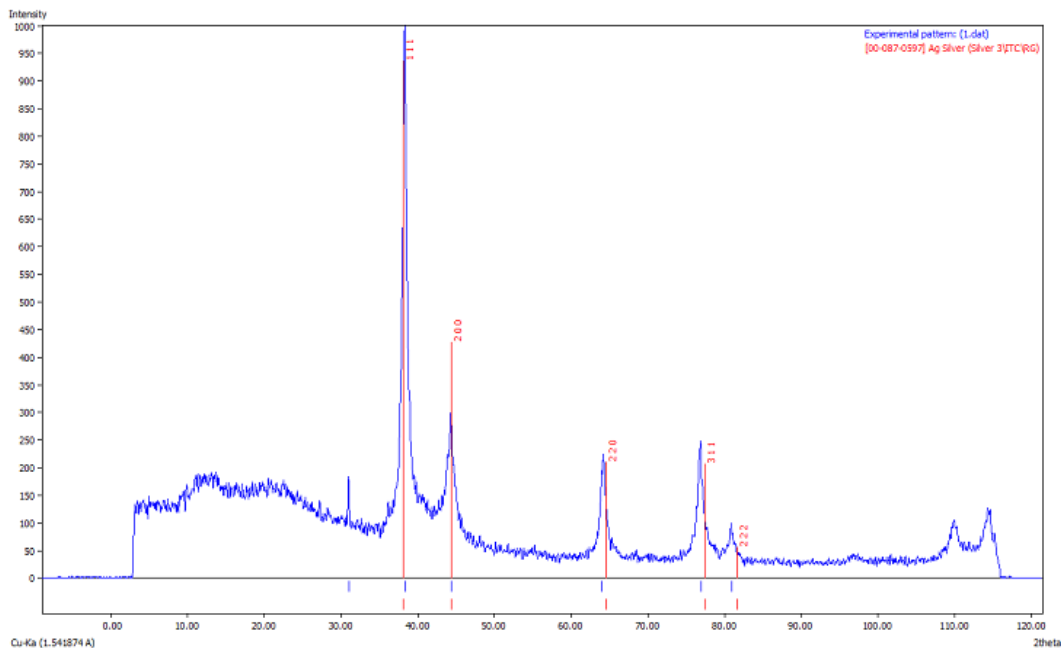
شکل ۲- عکس (SEM) مربوط به نانوذرات نقره



شکل ۳- عکس (TEM) مربوط به نانوذرات نقره متصل به نایسین

اثر مهارکنندگی رشد توسط نانوذرات نقره در غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشتر، نایسین در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشتر در فواصل زمانی ۴ تا ۲۴ ساعت پس از تیمار و نانوذرات نقره متصل به نایسین در غلظت‌های ۵۰ و ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در فواصل ۶ تا ۲۴ ساعت پس از تیمار مشاهده شد (جذب نوری مربوط به آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر در جدول‌های ۲ تا ۴ آمده است). در مقایسه آثار ضد میکروبی غلظت‌های ۵۰ و ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره، نایسین و نانوذرات نقره متصل به نایسین بر اساس جذب نوری خوانده شده در فواصل زمانی ۶ تا ۲۴ ساعت پس از تیمار، اثر مهارکنندگی رشد توسط نانوذرات متصل به نایسین بیشتر از دو ماده دیگر بود و در بین آن دو نیز اثر نقره از نایسین بیشتر بود (اطلاعات جامع آنها در جدول‌های ۵ و ۶ و شکل‌های ۶ و ۷ آمده است).

نتایج الکتروفورز محصولات RAPD-PCR برای ۸ آغازگر روی ژل آگارز ۲ درصد در شکل‌های ۸ و ۹ مشاهده می‌شوند که بر اساس الگوی باندهای و عدم آن به ترتیب با یک و صفر امتیازبندی و با نرم‌افزار NTSYS-PC تجزیه و تحلیل شده‌اند.

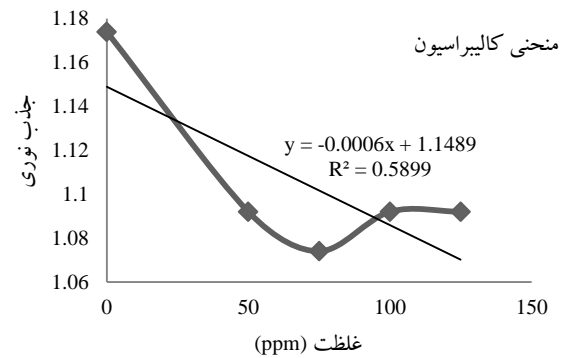


شکل ۴- تجزیه و تحلیل XRD نانوذرات نقره (تأیید کننده وجود نانوذرات نقره با توجه به پیک‌های موجود در 2θ)

جدول ۳- میانگین جذب نوری باکتری‌های تیمار شده با نایسین در

طول موج ۶۰۰ نانومتر

پس از ۲۴ ساعت	پس از ۶ ساعت	پس از ۴ ساعت	پس از ۲ ساعت	پیش از تیمار	غلظت (µg/ml)
۱/۳۳	۱/۳۷	۱/۴۹	۱/۰۵	۰/۶۷	شاهد
۱/۵۹	۰/۹۶	۰/۸۹	۰/۶۵	۰/۵۲	۲۵
۱/۴	۱/۴	۱/۴	۱	۰/۴	۵۰
۱/۴	۱/۴	۱/۴	۱	۰/۴	۷۵
۱/۱۹	۱/۳۶	۱/۴۷	۱/۱۵	۰/۴۷	۱۰۰
۱/۱۵	۱/۳۳	۱/۴۳	۰/۸۶	۰/۴	۱۵۰
۱/۲	۱/۳۵	۱/۴۲	۰/۸۴	۰/۴	۲۰۰



شکل ۵- نمودار کالیبراسیون جذب نوری باکتری‌های تیمار شده با نانوذرات نقره در غلظت‌های ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر

جدول ۴- میانگین جذب نوری باکتری‌های تیمار شده با نانوذرات

نقره متصل به نایسین در طول موج ۶۰۰ نانومتر

پس از ۲۴ ساعت	پس از ۶ ساعت	پس از ۴ ساعت	پس از ۲ ساعت	پیش از تیمار	غلظت (µg/ml)
۱/۷۵	۱/۵۷	۱/۳۷	۱	۰/۳۳	شاهد
۱/۷۵	۱/۶	۱/۵۶	۰/۹	۰/۴۱	۳۰
۱/۲	۱/۳	۱/۳	۰/۸	۰/۴	۵۰
۱/۴	۱/۶	۱/۴۵	۱/۱	۰/۴	۷۵

جدول ۲- میانگین جذب نوری باکتری‌های تیمار شده با نانوذرات

نقره در طول موج ۶۰۰ نانومتر

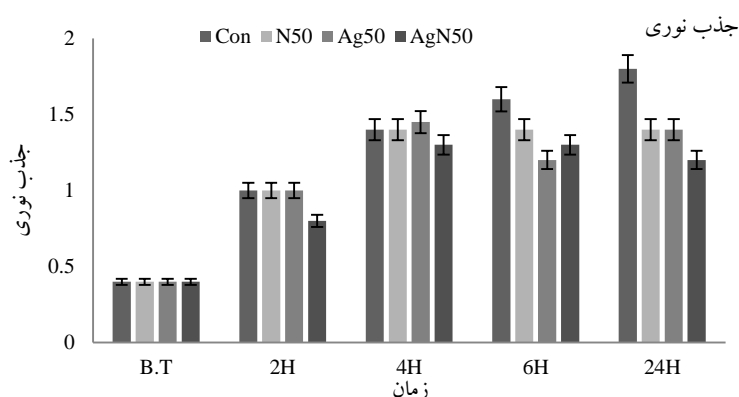
پس از ۲۴ ساعت	پس از ۶ ساعت	پس از ۴ ساعت	پس از ۲ ساعت	پیش از تیمار	غلظت (µg/ml)
۱/۳۷	۱/۵۳	۱/۴۸	۰/۹۵	۰/۵۴	شاهد
۱/۴۱	۱/۲	۱/۴۷	۱	۰/۳۸	۵۰
۱/۳	۱/۳۴	۱/۳۵	۰/۹۷	۰/۴۱	۷۵
۱/۲۵	۱/۳۶	۱/۵۱	۰/۹۶	۰/۳۸	۱۰۰
۱/۲	۱/۳۲	۱/۴۶	۱	۰/۴۸	۱۲۵

جدول ۵- مقایسه جذب نوری باکتری‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره، نایسین و نانوذرات نقره متصل به نایسین

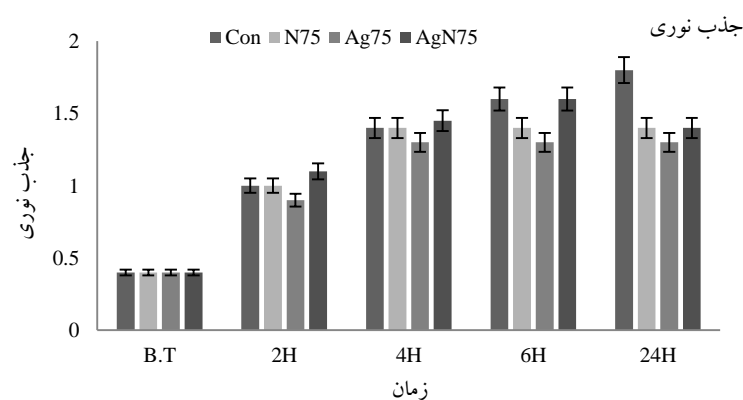
غلظت (µg/ml)	پیش از تیمار	پس از ۲ ساعت	پس از ۴ ساعت	پس از ۶ ساعت	پس از ۲۴ ساعت
شاهد	۰/۴	۱	۱/۴	۱/۶	۱/۸
نایسین	۰/۴	۱	۱/۴	۱/۴	۱/۴
نانوذرات نقره	۰/۴	۱	۱/۴۵	۱/۲	۱/۴
نانوذرات نقره متصل به نایسین	۰/۴	۰/۸	۱/۳	۱/۳	۱/۲

جدول ۶- مقایسه جذب نوری باکتری‌های تیمار شده با غلظت‌های ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره، نایسین و نانوذرات نقره متصل به نایسین

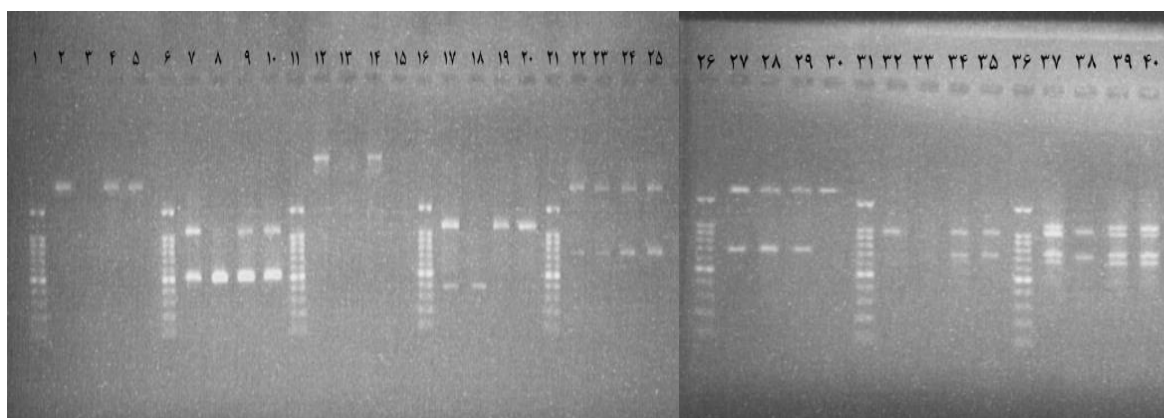
غلظت (µg/ml)	پیش از تیمار	پس از ۲ ساعت	پس از ۴ ساعت	پس از ۶ ساعت	پس از ۲۴ ساعت
شاهد	۰/۴	۱	۱/۴	۱/۶	۱/۸
نایسین	۰/۴	۱	۱/۴	۱/۴	۱/۴
نانوذرات نقره	۰/۴	۰/۹	۱/۳	۱/۳	۱/۳
نانوذرات نقره متصل به نایسین	۰/۴	۱/۱	۱/۴۵	۱/۶	۱/۴



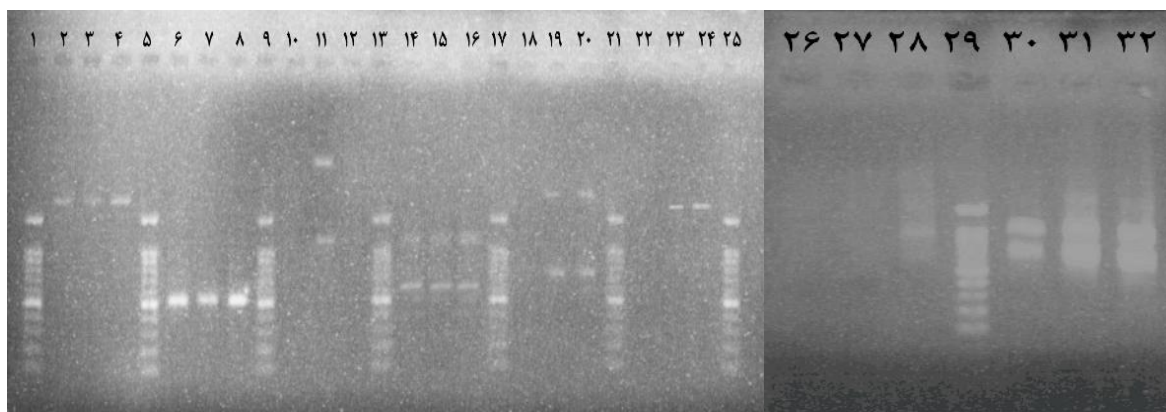
شکل ۶- مقایسه میزان مهار رشد باکتری‌های تیمار شده با نانوذرات نقره، نایسین و نانوذرات نقره متصل به نایسین در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر اساس جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر (Con. شاهد، N50. نایسین، Ag50. نانوذرات نقره، AgN50. نانوذرات نقره متصل به نایسین)



شکل ۷- مقایسه میزان مهار رشد باکتری‌های تیمار شده با نانوذرات نقره، نایسین و نانوذرات نقره متصل به نایسین در غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر اساس جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر (Con. شاهد، N75. نایسین، Ag75. نانوذرات نقره، AgN75. نانوذرات نقره متصل به نایسین)



شکل ۸- نتایج الکتروفورز محصولات غیرکانژوگه حاصل از RAPD؛ ستون‌های ۱. نشانگر، ۲ تا ۵. آغازگر OPC09، ۶. نشانگر، ۷ تا ۱۰. آغازگر OPT14، ۱۱. نشانگر، ۱۲ تا ۱۵. آغازگر OPS13، ۱۶. نشانگر، ۱۷ تا ۲۰. آغازگر OPA10، ۲۱. نشانگر، ۲۲ تا ۲۵. آغازگر OPS05، ۲۶. نشانگر، ۲۷ تا ۳۰. آغازگر OPA11، ۳۱. نشانگر، ۳۲ تا ۳۵. آغازگر OPB07، ۳۶. نشانگر، ۳۷ تا ۴۰. آغازگر OPA09



شکل ۹- نتایج الکتروفورز محصولات کانژوگه حاصل از RAPD؛ ستون‌های ۱. نشانگر، ۲ تا ۴. آغازگر OPC09، ۵. نشانگر، ۶ تا ۸. آغازگر OPT14، ۹. نشانگر، ۱۰ تا ۱۲. آغازگر OPS13، ۱۳. نشانگر، ۱۴ تا ۱۶. آغازگر OPA10، ۱۷. نشانگر، ۱۸ تا ۲۰. آغازگر OPS05، ۲۱. نشانگر، ۲۲ تا ۲۴. آغازگر OPA11، ۲۵. نشانگر، ۲۶ تا ۲۸. آغازگر OPB07، ۲۹. نشانگر، ۳۰ تا ۳۲. آغازگر OPA09

شکل‌های ۱۳ و ۱۴ دیده می‌شود نشان می‌دهند در هر دو غلظت یادشده بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی ایجادشده نسبت به شاهد به ترتیب به باکتری‌های تیمار شده با نانوذرات نقره و نایسین تعلق دارد و اثر ژنومی حاصل از نانوذرات نقره متصل به نایسین در حدفاصل آن دو قرار دارد؛ بنابراین، نانوذرات نقره متصل به نایسین نسبت به نانوذرات نقره اثر ضدباکتریایی بیشتر و اثر ژنومی کمتری از خود نشان می‌دهند.

بر اساس نتایج محاسبه‌های ماتریکس تشابه (جدول‌های ۷ تا ۹) و دندروگرام‌های حاصل (شکل‌های ۱۰ تا ۱۲)، هر سه ماده (نانوذرات نقره، نایسین و نانوذرات نقره متصل به نایسین) در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کمترین و در غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر ژنومی را دارند. نتایج مقایسه آثار ژنومی سه محلول در غلظت‌های یکسان ۵۰ و ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر که ماتریکس تشابه و دندروگرام آنها به ترتیب در جدول‌های ۱۰ و ۱۱ و

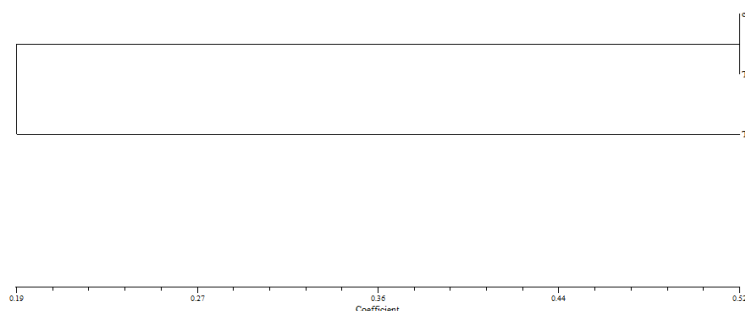
جدول ۷- ماتریکس تشابه برای نمونه‌های شاهد و تیمار شده با نانوذرات نقره

Proximity Matrix

Case	Dice (Czekanowski or Sorenson) Measure		
	C	T1	T2
C	1.0000000		
T1	0.5217391	1.0000000	
T2	0.2352941	0.1481481	1.0000000

This is a similarity matrix

C. شاهد, T1. 50 µg/ml, T2. 75 µg/ml



C. شاهد, T1. 50 µg/ml, T2. 75 µg/ml

شکل ۱۰- دندروگرام حاصل از تجزیه بر اساس آزمون ریپید با روش UPGMA با نرم‌افزار NTSYS-PC

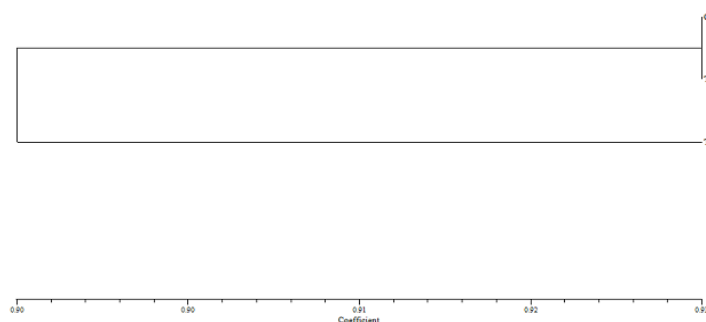
جدول ۸- ماتریکس تشابه برای نمونه‌های شاهد و تیمار شده با نایسین

Proximity Matrix

Case	Dice (Czekanowski or Sorenson) Measure		
	C	T1	T2
C	1.0000000		
T1	0.9333333	1.0000000	
T2	0.8571429	0.9333333	1.0000000

This is a similarity matrix

C. شاهد, T1. 50 µg/ml, T2. 75 µg/ml



C. شاهد, T1. 50 µg/ml, T2. 75 µg/ml

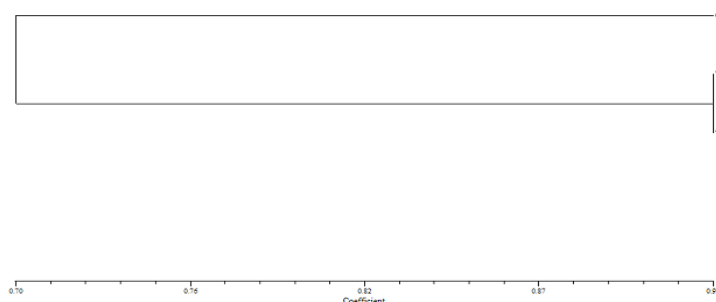
شکل ۱۱- دندروگرام حاصل از تجزیه بر اساس آزمون ریپید به روش UPGMA با نرم‌افزار NTSYS-PC

جدول ۹- ماتریکس تشابه برای نمونه‌های شاهد و تیمار شده با نانوذرات نقره متصل به نایسین

Proximity Matrix

Case	Dice (Czekanowski or Sorenson) Measure		
	C	T1	T2
C	1.0000000		
T1	0.7272727	1.0000000	
T2	0.6666667	0.9333333	1.0000000

This is a similarity matrix
C. شاهد, T1. 50 µg/ml, T2. 75 µg/ml



C. شاهد, T1. 50 µg/ml, T2. 75 µg/ml

شکل ۱۲- دندروگرام حاصل از تجزیه بر اساس آزمون ریپید به روش UPGMA با نرم افزار NTSYS-PC

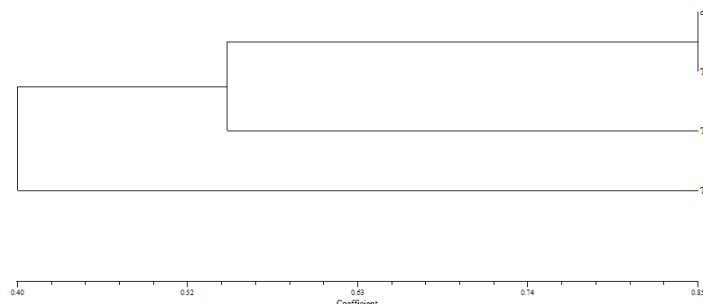
جدول ۱۰- ماتریکس تشابه برای نمونه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات نقره، نایسین و نانوذرات نقره متصل به

نایسین

Proximity Matrix

Case	Dice (Czekanowski or Sorenson) Measure			
	C	T1	T2	T3
C	1.0000000			
T1	0.4615385	1.0000000		
T2	0.8484848	0.4347826	1.0000000	
T3	0.6206897	0.3157895	0.4615385	1.0000000

This is a similarity matrix
C. شاهد, T1. Ag, T2. Nisin, T3. Ag+Nisin



C شاهد, T1. Ag, T2. Nisin, T3. Ag+Nisin

شکل ۱۳- دندروگرام حاصل از تجزیه بر اساس آزمون ریپید به روش UPGMA با نرم افزار NTSYS-PC

جدول ۱۱- ماتریکس تشابه برای نمونه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره، نایسین و نانوذرات نقره متصل به

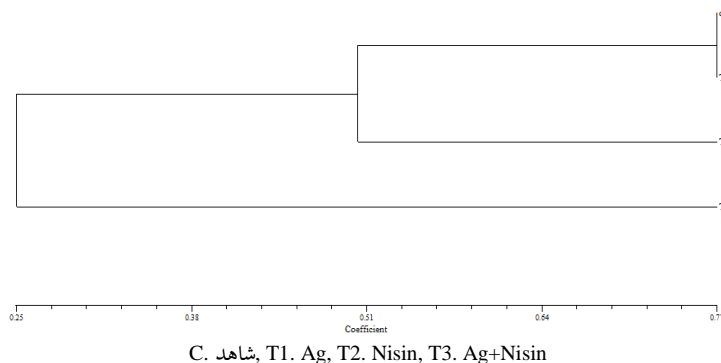
نایسین

Proximity Matrix

Case	Dice (Czekanowski or Sorenson) Measure			
	C	T1	T2	T3
C	1.0000000			
T1	0.2162162	1.0000000		
T2	0.7741935	0.3125000	1.0000000	
T3	0.5714286	0.2068966	0.4347826	1.0000000

This is a similarity matrix

C. شاهد، T1. Ag, T2. Nisin, T3. Ag+Nisin



C. شاهد، T1. Ag, T2. Nisin, T3. Ag+Nisin

شکل ۱۴- دندروگرام نمونه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره، نایسین و نانوذرات نقره متصل به نایسین

بحث و نتیجه‌گیری

غیرسمی با اندازه ۴۰ تا ۶۰ نانومتر به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، ازیترومایسین و سفه‌تاکسیم از توسعه مقاومت میکروب‌ها جلوگیری می‌کند، ویژگی ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک را افزایش می‌دهد و دوز مصرفی آنتی‌بیوتیک علیه عوامل بیماری‌زای مقاوم به چند دارو را به حداقل می‌رساند (۸). جماران و رحیمیان ظریف^{۱۱} در سال ۲۰۱۶ در ترکیبی از نانوذرات نقره با جنتامایسین یا نتومایسین ویژگی هم‌افزایی ضدباکتریایی را در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* عامل ورم پستان نشان دادند (۹). پژوهش‌های پیشین نشان دادند نانوذرات نقره به‌طور متصل با پپتیدهای مختلف ضدباکتریایی آثار سینرژیستی بالقوه‌ایی در برابر بیماری‌زاها ایجاد می‌کنند (۲، ۱۰-۱۵). نتایج پژوهش

مقایسه فعالیت ضد میکروبی غلظت‌های ۵۰ و ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره، نایسین و نانوذرات نقره متصل به نایسین در زمان‌های مختلف نشان داد مقدار جذب نوری تیمار شده‌ها ۶ تا ۲۴ ساعت پس از تیمار غلظت‌های ۵۰ و ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره متصل به نایسین به ترتیب ۰/۱ و ۰/۲ کاهش می‌یابد و در تیمارهای نانوذرات نقره و نایسین ثابت می‌ماند. این یافته نشان می‌دهد فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره متصل به نایسین بیشتر از دو ماده دیگر است و با برخی یافته‌های پیشین درباره وجود آثار سینرژیستی نانوذرات نقره با آنتی‌بیوتیک‌ها همسو است. زرینا و ناندا^{۱۱} در سال ۲۰۱۴ نشان دادند اتصال نانوذرات نقره سنتز شده زیستی

جدی سلول منجر می شود (۱۹). سوو-هاون و همکاران^{۱۷} نیز در سال ۲۰۱۱ نشان دادند یون های Ag^+ ترجیحاً با بازهای DNA به جای گروه های فسفات واکنش می دهند (۲۰). در زمینه اثر نانوذرات نقره متصل به نایسین روی توالی ژنوم چنین استدلال می شود که پایداری اتصالات نانوذرات نقره و نایسین به علت برهم کنش الکترواستاتیک به رهاسازی کمتر یون های Ag^+ نسبت به کاربرد انفرادی نانوذرات نقره منجر می شود و به همین علت، آثار ژنومی اتصالات یاد شده در حداقل کاربرد انفرادی نانوذرات نقره و نایسین قرار می گیرد؛ در نتیجه، اتصالات یاد شده موجب ایجاد اختلال در همانندسازی و سازوکارهای ترمیمی DNA و رخ دادن جهش های متعدد و بروز تغییراتی در توالی ژنوم باکتری اشریشیا کلی می شود که سبب بروز فاصله ژنتیکی نسبت به نمونه های شاهد را می شود.

باتوجه به نتایج پژوهش حاضر نانوذرات نقره متصل به نایسین نسبت به نقره بیشترین اثر ضدباکتریایی با کمترین اثر ژنومی را دارند و از نظر میزان کم سمیت و جهش زایی می تواند به عنوان ماده ضدباکتریایی ایمن استفاده شود.

References

- (1) Molaabaszadeh H., Hajisheikhzadeh B., Mollazadeh M., Eslami K., Mohammadzadeh Gheshlaghi N. The study of sensibility and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection in Tabriz city. *Journal of Fasa University of Medical Sciences* 2013; 2(3):149-154.
- (2) Arakha M., M. Borah S., Saleem M., N. Jha A., Jha S. Interfacial assembly at silver nanoparticle enhances the antibacterial efficacy of nisin. *Free Radical Biology and Medicine* 2016; 101:434-445.

حاضر مشابه مطالعه های اخیر است؛ باوجود این، پاناچک و همکاران^{۱۲} ضمن پژوهش مشابهی در سال ۲۰۱۵، آثار سینرژیستی آنتی بیوتیک های دارای عملکردها و ساختارهای شیمیایی مختلف را در ترکیب با نانوذرات نقره مشاهده نکردند که نشان دهنده آثار سینرژیستی غیراختصاصی است (۱۶). دنگ و همکاران^{۱۳} نیز در سال ۲۰۱۶ نشان دادند در ترکیب نانوذرات نقره و آنتی بیوتیک های آمپی سیلین و پنی سیلین آثار سینرژیستی وجود ندارد (۱۷). آلهوردیف و همکاران^{۱۴} نیز در سال ۲۰۱۱ نشان دادند در ترکیب نانوذرات نقره و آنتی بیوتیک استرپتومایسین در برابر سه بیماری زای شایع انسانی استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا^{۱۵} آثار سینرژیستی وجود ندارد (۱۸). باتوجه به نتایج پژوهش حاضر استدلال می شود اثر نایسین متصل به نانوذرات نقره در برابر مقاومت غشایی و نایسیناز نسبت به کاربرد انفرادی آن افزایش می یابد و برهم کنش با غشا باعث نفوذپذیری اتصالات و گسیختگی غشا می شود و تنش اکسیداتیو به افزایش اثر ضدباکتریایی اتصالات منجر می شود؛ در نتیجه، آثار نانوذرات نقره و نایسین متصل به آن سینرژیستی محسوب می شود. بر اساس داده های RAPD-PCR در همه باکتری های تیمار شده با نانوذرات نقره، نایسین و نانوذرات نقره متصل به نایسین، اثر ژنومی با افزایش غلظت افزایش می یابد. باتوجه به مقایسه اثر ژنومی این سه ماده در غلظت های یکسان ۵۰ و ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر مشخص شد بیشترین و کمترین اثر ژنومی به ترتیب به نانوذرات نقره و نایسین مربوط است و این یافته با نتایج مطالعه های پیشین مطابقت دارد. فیاض و همکاران^{۱۶} در سال ۲۰۱۰ نشان دادند کمپلکس ترکیبی مولکول های آمپی سیلین با نانوذرات نقره وارد واکنش با DNA می شود و از باز شدن آن جلوگیری می کند که به آسیب

- (3) Karam L., Jama C., Dhulster P., Chihib N-E. Study of surface interactions between peptides, materials and bacteria for setting up antimicrobial surfaces and active food packaging. *Journal of Materials and Environmental Science* 2013; 4(5): 798-821.
- (4) Tabrizi S., Golestani Emani B., Karimi F. Investigation of the effect of different doses of silver nanoparticles on the genome of *Escherichia coli* by using molecular markers. *Journal of Biotechnology and Applied Microbiology* 1393; 1(2): 37-47.
- (5) Santos CL., Albuquerque AJR., Sampaio FC., Keyson D. Nanomaterials with antimicrobial properties: Applications in health sciences. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating them: Science, Technology and Education* (A. Méndez-Vilas, Ed.) 2013; 1: 143-154.
- (6) Zargar M., Mohammadi Bandari N. Silver nanoparticles and their applications. *Journal of Applied Biology* 1392; 3(3): 13-31.
- (7) Pandit R., Rai M., Santos CA. Enhanced antimicrobial activity of the food-protecting nisin peptide by bioconjugation with silver nanoparticles. *Environmental Chemistry Letters* 2017; 3(15): 443-452.
- (8) Zarina A., Nanda A. Combined efficacy of antibiotics and biosynthesised silver nanoparticles from *Streptomyces Albaduncus*. *International Journal of PharmTech Research* 2014; 6(6): 1862-1869.
- (9) Jamaran S., Rahimian Zarif B. Synergistic effect of silver nanoparticles with neomycin or gentamicin antibiotics on mastitis-causing *Staphylococcus aureus*. *Open Journal of Ecology* 2016; 7(6): 452-459.
- (10) Golubeva O. Yu., Shamova OV., Orlov DS., Pazina T. Yu., Boldina AS., Drozdova IA. et al. Synthesis and study of antimicrobial activity of bioconjugates of Silver nanoparticles and endogenous antibiotics. *Glass Physics and Chemistry* 2011; 1(37): 78-84.
- (11) Singh P., Raja RB. Synergistic effect of silver nanoparticles with the cephalixin antibiotic against the test strains. *BioResearch Bulletin* 2012; 4: 171-179.
- (12) Ruden S., Hilpert K., Berditsch M., Parvesh W., S. Ulrich A. Synergistic Interaction between Silver Nanoparticles and Membrane-Permeabilizing Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 8(53): 3538-3540.
- (13) McShan D., Zhang Y., Deng H., Ray PC., Yu H. Synergistic antibacterial effect of silver nanoparticles combined with ineffective antibiotics on drug resistant *Salmonella typhimurium* DT104. *Journal of Environmental Science and Health, C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews* 2015; 3(33): 369-384.
- (14) Singh R., Wagh P., Wadhvani S., Gaidhani S., Kumbhar A., Bellare J. et al. Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *International Journal of Nanomedicine* 2013; 1(8): 4277-4290.
- (15) Elzahraa AF., El-Tayeb T., Abou-Aisha K., El-Azizi MA. Combination of silver nanoparticles and visible blue light enhances the antibacterial efficacy of ineffective antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2016; 48(15): 1-13.
- (16) Panacek A., Smekalova M., Kilianova M., Pucek R., Bogdanova K., Vecerova R. et al. Strong and nonspecific synergistic antibacterial efficiency of antibiotics combined with silver nanoparticles at very low concentrations showing no cytotoxic effect. *Molecules* 2016; 26(21): 1-17.
- (17) Deng H., McShan D., Zhang Y., S. Sinha S., Aswan Z., C. Ray P. et al. Mechanistic study of the synergistic antibacterial activity

- of combined silver nanoparticles and common antibiotics. *Environmental Science and Technology* 2016; 16(50): 8840-8848.
- (18) M. Allahverdiyev A., Volodymyrivna Kon K., Sefik Abamor E., Bagirova M., Rafailovich M. Coping with antibiotic resistance: Combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2011; 11(9): 1035-1052.
- (19) Fayaz AM., Balaji K., Girilal M., Yadav R., Kalaichelvan PT., Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram- positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2010; 6:103-109.
- (20) Soo-Hwan K., Lee H-S., Ryu D-S., Choi S-J., Lee D-S. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* 2011; 1(39): 77-85.

¹- *Lactococcus lactis*

²- *Staphylococcus aureus*

³- *Streptococcus bovis*

⁴- *Lactobacillus*

⁵- *Listeria monocytogenes*

⁶- *Pseudomonas fluorescens*

⁷- *Aspergillus niger*

⁸- *Fusarium moniliforme*

⁹- *Escherichia coli*

¹⁰- Zarina and Nanda.

¹¹- Jamaran and Rahimian Zarif.

¹²- Panacek *et al.*

¹³- Deng *et al.*

¹⁴- Allahverdiyev *et al.*

¹⁵- *Pseudomonas aeruginosa*

¹⁶- Fayaz *et al.*

¹⁷- Soo-Hwan *et al.*