

تحضير وتوصيف الدقائق الفضية النانوية المصنعة بيولوجيا ودراسة تأثيرها على بكتريا الملوية البوابية

رندة محمد ضاحي

بشرى شهاب حمد

قسم علوم الحياة/ كلية التربية/ الجامعة العراقية

الخلاصة

هدفت الدراسة الى بحث فعالية دقائق الفضة النانوية المحضرة من المستخلص المائي الحار لنبات اللهانة الحمراء المضادة للبكتريا الملوية البوابية *Helicobacter pylori* وذلك بعد عزلها وتشخيصها بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل عن الطريق الجين التشخيصي 16srRNA حيث تم ارسال (6)عزلة من البكتريا الى شركة (Microgen) الكورية للتأكد من مدى مطابقة هذه العزلات مع العزلات العالمية ,حيث بلغت نسبة التطابق للجين 16srRNA 99% .تمت دراسة تأثير دقائق الفضة النانوية على البكتريا بأستخدام اطباق المعايرة الدقيق ,حيث ظهرت النتائج ان اقل تركيز مثبط لنمو البكتريا 0.5mM حيث بلغت اعلى نسبة تثبيط للدقائق النانوية المضادة للبكتريا 88.6% وادنى نسبة تثبيط 81.8%.

الكلمات المفتاحية : البكتريا الملوية البوابية ,دقائق الفضة النانوية , تفاعل البلمرة المتسلسل , الفعالية المضادة للبكتريا , نبات اللهانة الحمراء

Preparation , characterization of biosynthesized silver nanoparticles and study their effect on *Helicobacter pylori*

Bushra Shihab Hamad

Randa Mohammad Dhahi

Department of Biology/ Education College/ Al-Iraqia University

ABSTRACT

The study aims at investigating the activity of the silver nanoparticles prepared out of the aqueous extract of Red Cabbage plant against the *Helicobacter pylori* after isolating and characterizing it by Polymerase chain Reaction with the gene 16srRNA.Six strains of *H.pylori* are sent to Microgen Company in Korea to make sure that these strains agree with the world strains or not. The ratio of agreement of the gene 16srRNA records 99%.The influence of the silver nanoparticles is studied by using Microtiter plate ,The results show that minimum concentration which inhibits the *H.pylori* is 0.5 mM ,and the maximum ratio of inhibition of the nanoparticles is 88.6% and minimum ratio of inhibition is 81.8%.

Keywords: *Helcobacter pylori*, silver nanoparticles, Polymerase chain Reaction, antimicrobial activity, Red cabbage.

المقدمة :

تعتبر دراسة Nanotechnology من الدراسات الحديثة للاهتمام بصحة الانسان ومحاولات الكشف عن مسببات الامراض التي يعاني منها. ان هذه التقنية تتعامل مع الجزيئات الصغيرة ذات الحجم من (1-100nm) (1). ان الدقائق النانوية هي مجموعة من المواد لها استعمالات متعددة في مجالات مختلفة , وجد ان دقائق الفضة النانوية لها تطبيقات في تحديد وتشخيص مضادات الجراثيم واستعمالها في العلاجات (2). ان الفضة معروفة بانها وسيلة فعالة ضد الجراثيم ولها استخدامات في التطبيقات المختبرية (3). بكتريا الملوية البوابية *Helicobacter pylori* هي بكتريا سالبة لصبغة غرام, متعددة الاسواط, قليلة التهوية Microaerophilic التي تستوطن الطبقة المخاطية المعدية للإنسان وترتبط بشكل وبائي بالمعدة (4). اكثر من 50% من سكان العالم مصاب بهذه البكتريا وهي المسبب الأساسي لالتهاب المعدة والقرح الهضمية وسرطان المعدة. ان مقاومة هذه البكتريا للمضادات الحيوية يمكن تعود الى التباين الجيني و الى قدرتها على تطوير الغشاء الحيوي (biofilm) (5). يعتبر نبات اللهانة الحمراء *Brassica Oleracea var. capitata f. rubra* من المحاصيل الورقية الشتوية في العراق ويعود هذا النبات الى العائلة الصليبية التي يكون موطنها الأصلي في مناطق شرق البحر المتوسط وينمو هذا النبات في الأجواء الباردة. والفائدة الأساسية لهذا النبات هي الحصول على الرؤوس الناتجة من الأوراق (6).

ان تشخيص الإصابة بالبكتريا الملوية البوابية مهما جدا وان الاختبار الجزيئي بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل هو الاختبار الأكثر كفاءة ويمكن ان يصنف ضمن الطرق الغازية والطرق غير الغازية, يستخدم هذا الاختبار للكشف عن وجود البكتريا الملوية البوابية في عينات مختلفة (7) .

تهدف الدراسة الحالية الى تحضير دقائق الفضة النانوية من المستخلص المائي الحار لنبات اللهانة الحمراء ودراسة تأثيرها على البكتريا الملوية البوابية.

المواد وطرق العمل

تحضير المستخلص المائي الحار لنبات اللهانة الحمراء

تم الحصول على نبات اللهانة من الأسواق المحلية في بغداد , حيث تم غسل اوراق النبات جيدا بالماء المقطر لإزالة الاتربة المتعلقة بها, ثم تم تقطيع الاوراق الى قطع صغيرة ووضع 25g منها في دورق زجاجي يحتوي على 150ml ماء مقطر ثم تسخينها في حمام مائي لمدة نصف ساعة (8).

تكوين دقائق الفضة النانوية

حضر المحلول المائي لنترات الفضة , واخذ 10ml من المستخلص المائي للهانة الحمراء مع 100ml من المحلول المائي لنترات الفضة بتركيز (1mM) وتم مزجه جيدا مع مراقبة تغير لون المزيج .وبعد تكون الدقائق النانوية تم تشخيصها ب UV_VIS, XRD, SEM- EDX, AFM (9).

عزل وتشخيص البكتريا الملوية البوابية

تم اخذ عينات الخزع النسيجية من المرضى المصابين بقرحة المعدة من مستشفى الجهاز الهضمي وامراض الكبد في بغداد , وتم عزلها على وسط Columbia blood agar وشخصت بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل.

استخلاص DNA من البكتريا:

جدول (1): يبين المحاليل الكيميائية وحجومها المستخدمة لاستخلاص DNA

Label	Contents 50 Columns
Buffer CL	25ml
Buffer BL	25ml
Buffer WA	40ml
Buffer WB	10ml
Buffer CE	20ml
Spin Column/Collection Tube	50 ea
RNase A(Lophilized powder)	3mg×I vial
Proteinase K(Lyophilized powder)	22g×1 vial

طريقة الاستخلاص:

تم استخلاص DNA باستعمال عدة التشخيص المصنعة من شركة (Intron biotechnology) وحسب الطريقة المبينة ادناه:

1- تم نقل 1-2 ml من العالق البكتيري الى انبوبة دقيقة سعة 2ml. تم ترسيب الخلايا البكتيرية بأستخدام جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة وبسرعة (13000 دورة/ دقيقة), وازيل السائل الطافي.

2- تم اعادة تعليق الخلايا المترسبة مع السائل المتبقي الطافي من خلال المزج بقوة, واضيف $200\text{ }\mu\text{l}$ من محلول التحلل Buffer CL و $20\text{ }\mu\text{l}$ من Proteinase K و $5\text{ }\mu\text{l}$ من RNase الى الانبوب الذي يحتوي العزلة البكتيرية وتم المزج بأستخدام المازج.

3- تم حضن الانابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 56°C لمدة 10-30 دقيقة .

4- بعد تحلل الخلايا بالكامل تم اضافة $200\text{ }\mu\text{l}$ من Buffer BL الى الانبوب الذي يحتوي على العينة وتم المزج بعناية ومن ثم حضن المزيج في درجة حرارة 70°C لمدة 5 دقائق. ونبذ الانبوب بجهاز الطرد المركزي وبسرعة 13000 دورة/ دقيقة ولمدة 5 دقائق

- 5- تم نقل 350-400 µl من السائل الطافي الى انبوبة جديدة سعة 1.5 mL واضيف 200µl من الايثانول المطلق absolute ethanol مع الرج جيدا والتقليب بلطف لمدة 5-6 دقائق
- 6- نبذ الانبوب 1.5mL لغرض ازالة القطرات من داخل السدادة ويسكب المزيج في عمود الفصل وبدون حدوث بلل لحافة عمود الفصل وتم غلق السدادة وعمل طرد مركزي لمدة دقيقة واحدة وبسرعة 13000 دورة /دقيقة وازيل السائل المترشح وضع عمود الفصل في انبوب الجمع واضيف 700µl من محلول الغسل الاول Buffer WA الى عمود الفصل وبدون حدوث بلل لحافة العمود ثم نبذت بالطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة وبسرعة 13000 دورة /دقيقة وازيل السائل الذي يجري خلال عمود الفصل. واعيد استعمال انبوب الجمع
- 7- تم اضافة 700µl من محلول الغسل الثاني Buffer WB الى عمود الفصل وبدون حدوث بلل للحافة وعمل طرد مركزي لمدة دقيقة واحدة وبسرعة 13000 دورة /دقيقة وازيل السائل الذي يجري خلال عمود الفصل ثم وضع عمود الفصل في انبوب الجمع .
- 8- تم اعادة عملية الطرد المركزي دقيقة اخرى لغرض تخفيف الاغشية حيث تم ازالة السائل الذي يجري خلال عمود الفصل وانبوب الجمع معا
- 9- وضع عمود الفصل في انبوب دقيق جديد سعة 1.5mL مل ويضاف 100-30 µl من محلول الاسترداد Buffer CE للاغشية وذلك لسحب DNA من السلكا الموجودة في اعمدة الفصل.
- 10- تم الحضان لمدة دقيقة واحدة وبدرجة حرارة الغرفة ثم عمل طرد مركزي لمدة دقيقة واحدة وبسرعة 13000 دورة /دقيقة لغرض الحصول على DNA

تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction

البادئ المستخدم في عملية التضخيم

تم الحصول على البادئ من شركة IDT. تم اذابة البادئ بماء مقطر خالي من الايونات وتكون بتركيز نهائي 100pmol/µl وتحفظ في درجة -20 م لحين الاستعمال. تم استخدام البادئ بتحضير working solution , وذلك من خلال اخذ 10µl من المحلول الخزين واطافة اليه 90µl من ماء مقطر ddH2O لتحضير تركيز 10pmol/µl من محلول working solution لحين اجراء التفاعل.

جدول (2): يبين البادئ الخاص بالجين 16srRNA المستخدم في الدراسة مع التتابع وحجم القواعد⁽¹⁰⁾

Name gene	Primer	Sequence	Tm (°C)	GC (%)	Product size
16srRNA	Forward	'5-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'	54.3	50.0	1250 base pair
	Reverse	'5-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	49.4	42.1	

تحضير وسط تفاعل PCR

حضر وسط التفاعل حسب تعليمات الشركة المصنعة للعدة Intron/PCR mix Kit.

جدول (3): يبين مكونات وسط تفاعل PCR المستخدم في تضاعف DNA

Components	Concentration
Taq PCR PreMix	5µl
Forward primer	10 picomols/µl (1 µl)
Reverse primer	10 picomols/µl (1 µl)
DNA	1.5µl
Distill water	16.5 µl
Final volume	25µl

التضخيم:

بعد اتمام الاضافات في الانابيب الدقيقة للعدة القياسية PCR PreMix والمجهزة بمكونات التفاعل نبذت الانابيب مركزيا لمدة دقيقة واحدة وبسرعة 3000 دورة /دقيقة , ثم نقلت العينات الى جهاز PCR وتم ضبط عمل الجهاز.

جدول (4): يبين برنامج التفاعل باستعمال تقانة PCR لجين 16srRNA

No. of cycle	Time	Tm (°C)	Phase	No.
1cycle	5min.	95°C	Initial Denaturation	-1
35 cycle	45sec	95°C	Denaturation -2	-2
	1min	52°C	Annealing	-3
	1min	72°C	Extension-1	-4
1cycle	7min.	72°C	Extension -2	-5

تحضير المحلول (TBE-10X) Tris-Borate EDTA buffer:

تم مزج 100 مل من TBE مع 900 مل ماء مقطر لتحضير لتر واحد من المحلول وحفظ في درجة حرارة 4م لحين الاستعمال في الترحيل الكهربائي

تحضير هلام الاغاروز والترحيل الكهربائي :

حضر الهلام بتركيز 1.5% واستعمل في الترحيل الكهربائي. وتم بثلاث مراحل⁽¹¹⁾ وهي :

اولا: تحضير هلام الاغاروز

- 1- تم اذابة 1.5 غم من مسحوق الاغاروز في 100 مل من الدارئ 1x-TBE buffer في دورق سعة 250 مل , ثم وضع في الفرن الكهربائي لمدة 3 دقائق لكي يصبح المحلول رائقا. تم تبريد محلول الاغاروز الى 50 م°
- 2- اضيف 3 µl من صبغة Red safe الى الهلام الدافئ لغرض تعليم DNA او الجين.

ثانيا: تحضير قالب هلام الاغاروز

تم وضع المشط في احدى نهايتي لوحة التحميل Tray وذلك لتكوين الحفر والذي يحمل عليه عينات DNA. تم صب الاغاروز بعد ان تم سد نهايتي القالب باستعمال شريط لاصق لكي يمنع تسرب الاغاروز من الجوانب . ثم ترك الاكاروز لكي يتصلب , ثم وضع اللوح في حوض الترحيل , ويرفع المشط بعناية وازالة السداد حيث يملأ تجويف الترحيل الكهربائي بمحلول 1x-TBE buffer ليتغطى الهلام

ثالثا: الاضافات (وضع وسريان DNA في هلام الاغاروز)

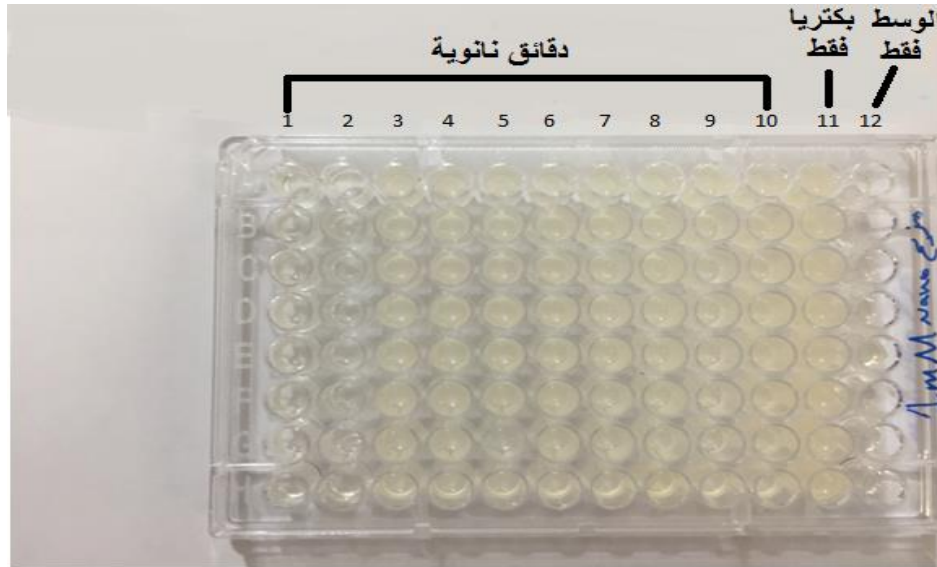
- 1- تم مزج 5 µl من عينات DNA مع 3 µl من محلول التحميل Loading على لوح من سليفون حيث توضع عينات DNA على الحفر المخصصة لها في الهلام ومراعاة عدم خروج العينة من سطح الحفرة , حيث يوضع الدليل الحجمي في الحفرة المخصصة له في احد جانبي الهلام
- 2- تم ربط الاقطاب بصورة مناسبة حيث يربط القطب الموجب بالموجب الموجود بمجهر الطاقة لجهاز الترحيل والسالب بالسالب. حيث يجهز بفولتيه 70 فولت وتيار 6 ملي امبير حيث يتم الترحيل باتجاه القطب الموجب ويتم ايقاف الترحيل بعد مرور ساعة واحدة وعندما تصل الصبغة الزرقاء الى ما قبل نهاية الهلام
- 3- تم نقل الهلام الى جهاز الاشعة فوق البنفسجية UV illuminator trans وعلى الطول الموجي 336 nm لرؤية حزم DNA المتداخل مع صبغة Red safe بشكل حزم متألقة .

تحديد اقل تركيز مثبط للنمو البكتيري (MIC) Minimum Inhibitory Concentration

تم تحديد اقل تركيز مثبط للنمو (12) من خلال ما يأتي:

- 1- تم تخفيف تركيز 1 mM في وسط Muller Hinton Broth (MHB) بنسبة 1:10
 - 2- تم توزيع 50 مايكروليتر من وسط MHB في الحفر من 1-10 حيث العمود رقم 11 كانت الحفر فيه خالية من الدقائق النانوية واستخدمت كسيطرة موجبة اما العمود رقم 12 كان فيه الوسط فقط واستخدم كسيطرة سالبة .
 - 3- نقل 100 مايكروليتر من الدقائق النانوية الى العمود الأول
 - 4- تم عمل التخفيف الثنائي وذلك بواسطة نقل 50 مايكروليتر من العمود 1 الى العمود 10
 - 5- تم عمل المحلول البكتيري وذلك بالمقارنة مع محلول مكفرلاند 0.5
 - 6- تخفيف المحلول البكتيري في وسط MHB بنسبة 1:150
 - 7- يوضع في طبق المعايرة 50 مايكروليتر من المحلول البكتيري في كل حفرة ما عدا العمود 12
 - 8- العمود رقم 11 يمثل السيطرة الموجبة وهو نمو البكتريا فقط
 - 9- العمود رقم 12 يمثل السيطرة السالبة وهو الوسط فقط
- يتم تطبيق المعادلة الاتية لغرض حساب نسبة التثبيط (13).

$$\text{Percentage inhibition} = 1 - (\text{OD test} / \text{OD control}) * 100$$

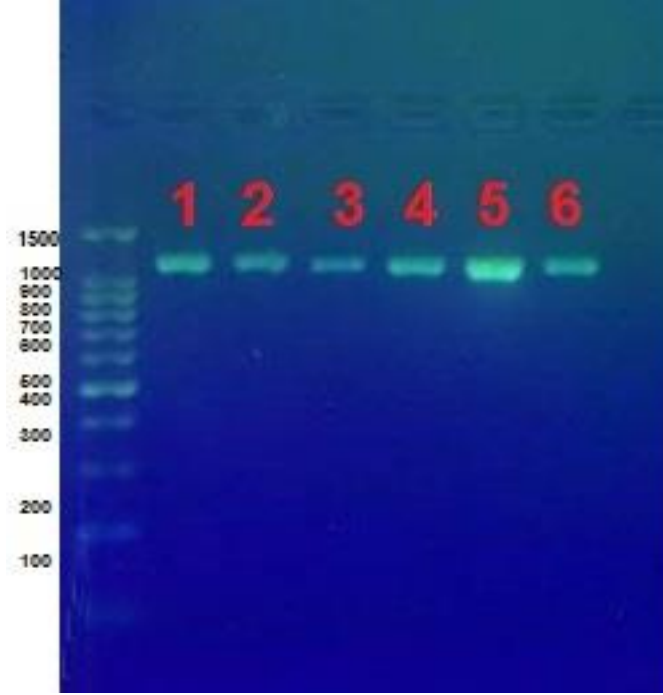


شكل (1): يوضح طريقة تحديد اقل تركيز مثبط للنمو بالنسبة للتركيز (mM1)

النتائج والمناقشة

تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن الجين 16srRNA:

نتائج الكشف الجيني للتحري عن جين 16srRNA وباستعمال تقانة PCR اظهرت وجود الجين في ست عزلات بكتيرية مدروسة وكما مبين بالشكل رقم (2).



شكل (2): تمثل الحزم المضئئة نواتج PCR ذات الحجم للحزمة 1250pb لجين 16srRNA ورحلت نواتج PCR على هلام الاغاروز 1.5% في المحلول المنظم 1x TBE لمدة ساعة ونصف و 5 volt/cm² DNA ladder (100pb-1500pb)

:Sequence

تم ارسال ست عزلات من بكتريا *H.pylori* الى شركة (Microgen) الكورية للتأكد من مدى مطابقة هذه العزلات مع العزلات العالمية للجين 16srRNA وتتم قراءة وتحليل النتائج وتبين ان نسبة التطابق بين العزلات العراقية والعزلات العالمية هي 99%. حيث وجدت تغيرات (Transition, Transversion) كما في الجدول رقم (5) وان سبب هذه التغيرات قد يرجع الى التداخلات الدوائية .

جدول (5): تحليل تسلسلات لمطابقة (6) عزلة من بكتريا *H.pylori* التي تحمل الجين **16srRNA**, يبين الجدول مصدر الجين الذي اخذ منه وهو بكتريا *H.pylori* ومدى مطابقته مع العزلات العالمية وبنسبة 99% وكذلك وجود التغيرات من نوع **Transition** و **Transversion** وموقع التغير وكذلك النيوكلووتيدات التي حصل بها التغير.

No. Of sample	Type of substitution	Location	Nucleotide	Sequence ID	Score	Expect	Identities	Source
1	Transition	75	C>T	ID: DQ202375.1	1735	0.0	99%	Helicobacter pylori
	Transition	680	G>A					
	Transversion	795	T>G					
	Transversion	796	C>A					
	Transversion	839	A>T					
	Transversion	918	A>T					
	Transversion	920	A>T					
2	Transition	75	C>T	ID: DQ202375.1	1705	0.0	99%	Helicobacter pylori
	Transversion	454	G>T					
	Transversion	470	C>A					
	Transition	478	C>T					
	Transition	493	A>G					
	Transition	495	C>T					
	Transition	496	G>A					
	Transition	679	C>T					
	Transversion	795	T>G					
	Transversion	796	C>A					
	Transversion	839	A>T					
	Transition	926	C>T					
3	Transition	75	C>T	ID: DQ202375.1	1606	0.0	99%	Helicobacter pylori
	Transition	680	G>A					
	Transversion	918	A>T					
	Transversion	920	A>T					
4	Transition	75	C>T	ID: DQ202375.1	160	0.0	99%	Helicobac

	Transition	680	G>A	375.1	9			ter pylori
	Transversion	918	A>T					
	Transversion	920	A>T					
5	Transition	75	C>T	ID: DQ202375.1	1421	0.0	99%	Helicobacter pylori
	Transition	680	G>A					
	Transversion	795	T>G					
	Transversion	796	C>A					
	Transversion	839	A>T					
6	Transition	680	G>A	ID: DQ202375.1	1483	0.0	99%	Helicobacter pylori
	Transversion	795	T>G					
	Transversion	796	C>A					
	Transversion	839	A>T					

تحديد اقل تركيز مثبط لنمو البكتريا

تم حساب قيمة MIC لدقائق الفضة النانوية وهي اقل تركيز مثبط لنمو البكتريا حيث أظهرت النتائج ان اقل تركيز مثبط للنمو هو 0.5

جدول (6) يبين النسب التثبيطة لاربع سلالات بكتيرية (في العمود الثاني لطبق المعايرة الدقيق) بعد معرفة اقل تركيز مثبط لنمو بكتريا الملوية البوابية

السلالة	نسبة التثبيط
S1	88.6%
S2	83%
S3	81.8%
S4	82.5%

أظهرت النتائج ان اعلى نسبة تثبيط كانت في السلالة الاولى حيث بلغت 88.6% وادنى نسبة كانت في السلالة الثالثة حيث بلغت 81.8%. ان الاختلافات في النسب التثبيطية للسلالات قد يرجع سببها الى التركيب الوراثي للسلالات (جدول رقم 6).

أظهرت الدراسات الية عمل دقائق الفضة النانوية في اختراق جدار البكتريا السالبة لصبغة غرام (14), حدوث تغير هيكلية في غشاء الخلية يمكن ان يؤدي الى زيادة في نفاذية الخلية وبالتالي يقود الى نقل بشكل غير منضبط عبر الغشاء

الساييتوبلازمي وينتهي بموت الخلية .ان الفعالية التثبيطية لايونات الفضة قد تكون اعلى في حالة البكتريا السالبة لصبغة غرام . وهذا قد يكون بسبب سمك طبقة الببتيدوجلايكان في جدار البكتريا الموجبة لصبغة غرام والذي قد يمنع عمل ايونات الفضة(15). هناك الية أخرى تقوم على قدرة تفاعل Ag⁺ و AgNPs بقوة مع انزيمات حيوية تحوي على الفسفور داخل الخلية ومع الحامض النووي خلال الية إضافية في سميتها للجراثيم .قد يحدث في مثل هذا التفاعل منع انقسام الخلايا واستنساخ وتكرار الحامض النووي من الحدوث ,ويؤدي في النهاية الى موت الخلية (16), هناك دراسات اقترحت قيام دقائق الفضة النانوية بتعديل Phosphotyrosine والمعلومات الخاصة من الببتيدات البكتيرية التي يمكن ان تؤثر على الإشارات الخلوية وتؤدي الى منع نمو البكتريا (17).

ومن الاليات المهمة في تثبيط نمو الجراثيم هي تكوين جذور حرة مثل أنواع الاوكسجين التفاعلي ROS Reactive Oxygen Specie .هناك ترابط بين تكوين الجذر الحر وخصائص النشاط المضاد للجراثيم.(18). تبين عادة سمية الدقائق النانوية من خلال تشكيل الجذور الحرة كإنتاج ROS وتسببها في تداخل واضطراب الغشاء (19). ومن خلال مهاجمة دهون الغشاء وتفكيكه او تلفه ويؤدي الى تثبيط نمو المايكروب (20).

المصادر

- 1.Mcshan,D.;Ray,P.C.and Yu,H.(2014).Molecular toxicity mechanism of nanosilver , j . jfda. 22: 116-127.
- 2.Sivakumar,P.;NethraDevi,C.&Renganathan ,S.(2012).Synthesis of silver nanoparticales using *Lantana camara* fruit extract and its effect on pathogens.Asian J.Pharm.Clin.Res.,5(3):97-101.
- 3.Farooqui,M.D.A.;Chauhan,P.S.;Krishnamoorthy,P.&Shaik,J.(2010). Etraction of silver Nanoparticale from the leaf extracts of *Clerodendrum inerme*,Dig.J.Nanomat.Biostruct,543-549.
4. Parsonnet J.(1995)Bacterial infection as acause of cancer .Environ Health Perspect,103 Suppl 8:263-268.
5. Garcia A,Salas-Jara MJ,Herrera C,et al.(2014).Biofilm and *Helicobacter pylori*:from environment to human host.World J Gastroenterol ,20:5632-8.
6. Matlob.A.N.,E.S.Mohammad and K.S.Adui.(1989).Production of Vegetables.Part one National library printing and publishing Directorate.University of Mosul .Ministry of Higher Education and Scientific Research.Iraq.pp.373.

7. ضحى عبدالسلام عبيد ,محمد قيس ,عصام محمد عبدالله .(2015).الكشف عن الإصابة بالبكتريا الحلزونية H.pylori باستخدام الاختبار الجزيئي PCR باستعمال جينات وعينات مختلفة في مجتمع مدينة الرمادي في محافظة الانبار .مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة .المجلد التاسع ,العدد الثالث .

8. Tamileswari,R.,Nisha,M.H.,&Jesurani ,S.S.(2015).Green synthesis of silver Nanoparticals using Brassica Oleracea (Cauliflower)and Brassica Oleracea Capitata (Cabbage)and the Analysis of Antimicrobial Activity.International Journal of Engineering and Technical Research . 4:1071-1074.

9. Vijay Kumar, Pammi, Pratap Kollu, Satyanarayana, and Shameem (2014). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Boerhaavia diffusa plant extract and their antibacterial activity . industrial crops and products: 52 (562-566).

10. Acinas,S.G.,Anton, J.&Rodriguez_Valera ,F.(1999).Diversity of freeliving and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16srRNA.Applied and Environmental Microbiology .65:514-522.

11. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis , T. (1989). Molecular Cloning (Vol. 2, pp. 14-9) . New York: Cold spring harbor laboratory press.

12. CLSI. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

13. Akujobi, C.O. and Njoku,H.O.(2010).Bioassay for the determination of microbial sensitivity to Nigerian honey. Global journal of pharmacology. 4: 36-40.

14. Morones ,J.R.,Elechiguerra ,J.L.,Camacho,A.,Holt K., Kouri,J .B . , Ramirez, J. T., Yacaman , M.J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology, 16(10): 2353.-2346

15. Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N. and Kim, J. O.(2000). Amechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* . J Biomed Mater. Res; 52:662-668.

16. Hwang, E. T., Lee, J. H., Chae, Y. J., Kim, Y. S., Kim, B. C. Sang, B. and Gu, M. B. (2008). Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria, *Small*, 4:746-750.
17. Ramachandrarao, . Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G. P. and Dash, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver Nanoparticles *Nanotech*. 18: 103-112.
18. Danilczuk, M., Lund, A., Sadlo, J., Yamada, H. and Michalik, J. (2006). Conduction electron spin resonance of small silver particles. *Spectrochim. Acta A*, 63:189-191.
19. Soenen, S. J., Rivera-Gil, P., Montenegro, J. M., Parak, W. J. De Smedt, S. C and Braeckmans, K. (2011). Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today*. 6:446-465.
20. Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. G. and Kim, S. k (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sci*. 77:2166- 2178.