

اثر ضد میکروبی و پارامترهای موثر بر پایداری نانو ذرات نقره سنتز شده با

استفاده از گیاه پونه

پیمان محمد زاده جهانی^۱، حکیم عزیزی^۲، مهرداد خاتمی^{۳*}، هاجر یعقوبی^۳

۱. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بم، بم، ایران
۲. گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سنتز سبز نانوساختارهای ضد میکروبی با استفاده از عصاره‌های گیاهی به علت هزینه کم و سازگاری فرآیند سنتز با محیط زیست بسیار حائز اهمیت است. بنابراین هدف از این مطالعه سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه پونه و بررسی اثر متغیرهای فیزیکوشیمیایی بر سنتز سبز این نانوذرات ضد میکروبی است.

روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۸ انجام شد. سنتز سبز سریع و زیست سازگار نانوذرات نقره با استفاده از گیاه پونه انجام گرفت. خواص فیزیکوشیمیایی نانوذرات نقره با استفاده از اسپکتروفتومتر مرئی فرابنفش (UV-Vis)، طیف‌سنج پرتو ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مورد مطالعه قرار گرفت. اثر غلظت، عصاره گیاهی، نیترات نقره، زمان در معرض بودن نور آفتاب بر پایداری نانوذرات سنتز شده، بررسی و در نهایت اثر ضد میکروبی نانوذرات علیه باکتری‌های *Escherich coli* و *Staphylococcus aureus* و *Bacillus Subtilis* مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: در طیف UV-Vis نانوذرات نقره، پیک جذبی در ۴۴۳ نانومتر مشاهده شد که تاییدی بر ساخت نانوذرات نقره بود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) توزیع تقریباً یکنواخت این نانوذرات با اشکال کروی را نشان داد. مطالعه اثر متغیرهای مختلف در سنتز این نانوذرات نشان داد که حجم عصاره ۳ میلی لیتر، غلظت نمک نیترات نقره ۱ میلی مولار و زمان واکنش ۱۰ دقیقه در معرض نور خورشید بهترین شرایط برای رسیدن به حداکثر پایداری نانوذرات نقره است. نتایج نشان داد باکتری‌های استفاده شده نسبت به نانوذرات نقره سنتز شده بسیار حساس هستند و نانوذرات اثر کشندگی معنی داری داشت.

نتیجه‌گیری: کاربرد گیاه پونه جهت سنتز سبز نانوذرات نقره با خصوصیات فیزیکوشیمیایی مطلوب تایید شد و همچنین بررسی‌ها، اثرات ضد میکروبی این نانوذرات را تایید کرد.

کلید واژه‌ها:

سنتز سبز، نانوذرات نقره، اثرات ضد میکروبی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

مقدمه

می‌کند (۲). این ذرات به دلیل اندازه کوچک به راحتی از کوچک‌ترین منافذ عبور نموده و برخی ویژگی‌های خاص بر دامنه کاربرد آن‌ها افزوده می‌شود (۳). سنتز نانوذرات به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی آن‌ها در مقایسه با ماکرومولکول‌ها و ذرات بزرگتر، جایگاه ویژه‌ای

ذراتی که حداقل در یک بعد کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر باشند، نانوذره نامیده می‌شوند (۱). در مقیاس نانو، بسیاری از خصوصیات ماده مانند خواص فیزیکی و فعالیت‌های شیمیایی تغییر نموده و در نتیجه موجب بروز اثرات پیش‌بینی نشده و منحصر به فردی می‌شود که فرآیند تولید این مواد را توجیه

*آدرس نویسنده مسئول: بم، دانشگاه علوم پزشکی بم، دانشکده پزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی

آدرس پست الکترونیک: mehrdad7khatami@gmail.com

این مطالعه با هدف بررسی اثر متغیرهای فیزیکوشیمیایی موثر بر سنتز سبز نانوذرات نقره ضد میکروبی انجام شد.

روش‌ها

مطالعه حاضر به صورت تجربی در سال ۱۳۹۸ انجام شد. نیترات نقره ($AgNO_3$) از شرکت مرک (Merck) آلمان تهیه شد. گیاه پونه جهت تهیه عصاره و ساخت نانوذره کامل جمع‌آوری و خشک گردید. جهت عصاره‌گیری از روش ماسیراسیون (خیساندن) در حلال آب استفاده گردید (۲۴). بدین منظور ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به ۱۰ گرم از گیاه خشک شده اضافه شد و بر روی همزن مغناطیسی با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۸ ساعت قرار گرفت و در نهایت عصاره از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد. برای انجام مراحل بعدی آزمایش، در یخچال ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مرحله بعد به ۳ سی‌سی از عصاره آبی پونه، ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره اضافه گردید، این مرحله با غلظت‌های متنوع نیترات نقره شامل، ۰/۵، ۱، ۳، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار انجام گرفت. سپس روی همزن مغناطیسی با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. ایجاد تغییر رنگ به قهوه‌ای و کدر شدن اولین نشانه از ساخته شدن نانوذرات بود (۲۶).

بررسی عوامل موثر بر سنتز نانوذرات

اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه پونه: به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه پونه، محلول نیترات نقره با غلظت ۱ میلی‌مولار جداگانه به حجم‌های ۳، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۳۰ میلی‌لیتر عصاره‌ی گیاه اضافه گردید و پایداری (عدم مشاهده ته نشینی سوسپانسیون، تجمع، تغییر رنگ، کاهش در قدرت ضد میکروبی و کاهش در شدت جذب پیک طیف سنجی) نانوذرات در طول زمان بررسی گردید.

اثر غلظت‌های مختلف نیترات نقره: به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیترات نقره، به ۳ میلی‌لیتر عصاره آبی گیاه پونه نمک نیترات نقره با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۳، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار اضافه شد و پایداری نانوذرات سنتز شده بررسی گردید.

در تحقیقات بنیادی و کاربردی پیدا کرده است (۴). از طرفی نانوذرات از مهم‌ترین محصولات نانو تکنولوژی هستند که کاربردهای متنوعی در طیف وسیعی از علوم از جمله نانوسنسور (۴)، صنعت (۵)، بیوتکنولوژی (۶)، شیمی و پتروشیمی (۷)، ساخت مواد پیشرفته (۸)، مواد ضد ویروسی (۹)، محیط زیست (۱۰)، علوم دارویی (۱۱)، الکترونیک (۱۲) و الکتروشیمی (۱۳) را دارا می‌باشند.

کاربردهای گسترده این ذرات منجر به ارائه روش‌های مختلفی برای سنتز آن‌ها شده است. از جمله روش‌هایی که برای سنتز نانوذرات نقره از طریق کاهش Ag^+ به Ag^0 وجود دارد، می‌توان به استفاده از اشعه گاما، اشعه ماورابنفش، گرمایش و کاهش الکتروشیمیایی و نیز استفاده از مواد شیمیایی کاهنده مانند سدیم بورهیدرید اشاره نمود (۱۴). روش‌های سنتز رایج فیزیکی و شیمیایی عمدتاً دارای هزینه بالا، و زمان بر بوده و به طور بالقوه برای سلامت محیط زیست و انسان خطرناک می‌باشند (۱۵).

افزایش آسیب‌ها و نگرانی‌های وارده به محیط زیستی طی فرآیند‌های فیزیکوشیمیایی رایج سنتز نانوذرات، دانشمندان را به سوی تحقیق برای کشف روش‌های تولید نانوذرات سازگار با محیط زیست و دارای حداقل خطر برای سلامت انسان، سوق داده است (۱۶). به این منظور تلاش می‌شود از منابع طبیعی موجود در محیط زیست برای تولید نانوذرات استفاده شود (۱۷). استفاده از گیاهان یا مشتقات آن‌ها برای تولید نانوساختارها، یک روش جدید و در راستای اصول شیمی سبز است (۱۸). استفاده از گیاهان (۱۹) و میکروارگانیسم‌ها (۱۷) از مناسب‌ترین روش‌های سازگار با محیط زیست برای تولید نانوذرات است (۲۰). این روش که سنتز سبز یا بیوسنتز نامیده می‌شود، نسبت به روش‌های شیمیایی و فیزیکی دارای مزایای بسیاری است (۲۱-۲۵). ماهیت و غلظت عصاره گیاه، نمک فلزی، دما و زمان در معرض نور آفتاب، می‌توانند بر سرعت کار و ویژگی‌های نانوذرات تولیدی تاثیرگذار باشند. از این رو

(کنترل‌های مثبت) قرار گرفت. ۲۰ ماکرولیتر از هر کدام جداگانه بر روی هر دیسک ریخته و سپس پلیت‌ها در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد اندازه گیری و یادداشت شد. قطر هاله‌های دیسک‌های مختلف، با تکرار حداقل ۳ مرتبه در هر آزمایش، با هم مقایسه و میانگین آن‌ها تعیین شد. به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی همه چاهک‌های فاقد کدورت، جداگانه بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت و سپس در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. کمترین غلظتی که در آن باکتری رشد مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد.

نتایج

۱) **سننتر نانو ذرات نقره:** تولید نانو ذرات نقره را می‌توان بوسیله تغییر رنگ تشخیص داد. عصاره آبی پونه زرد رنگ (شکل ۱). پس از افزودن محلول نیترات نقره به قرمز تیره تغییر رنگ یافت، ظاهر شدن رنگ قرمز تیره پس از واکنش یون نقره اولین نشانه واضح و روشن از کاهش یون‌های فلزی و تشکیل نانو ذرات نقره در محیط است.

۲) **پارامترهای مختلف مؤثر بر سننتر نانو ذرات نقره:** به منظور تعیین شرایط بهینه واکنش، پارامترهای مختلف مؤثر بر سننتر نانو ذرات نقره نظیر حجم عصاره گیاهی، غلظت نمک نیترات نقره، زمان و نور خورشید مورد بررسی قرار گرفتند. طیف‌سنجی UV-Vis یک روش مهم برای تعیین حضور نانو-ذرات فلزی در محلول آبی است. در این طیف‌سنجی نانو ذرات نقره سننتر شده یک پیک قوی در ناحیه ۴۴۳ نانومتر مشاهده شد، که نشان دهنده سننتر نانو ذرات است. در ابتدا پارامترهای غلظت نمک نیترات نقره، حجم عصاره آبی، زمان واکنش و حضور کاتالیزور نور بر تشکیل نانو ذرات نقره بررسی شد.

اثر حجم‌های مختلف عصاره در سننتر نانو ذرات نقره: نتایج حاصل از اثر مقدار حجم مورد استفاده از عصاره آبی گیاه پونه (۳، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۳۰ میلی‌لیتر) بر سننتر نانو ذرات نقره نشان

بررسی اثر نوردهی: به منظور بررسی اثر نور بر واکنش مورد نظر، محلول نمک نیترات نقره با غلظت ۱ میلی مولار به ۳ میلی لیتر عصاره آبی گیاه پونه اضافه شد و نمونه در تاریکی مطلق قرار گرفت.

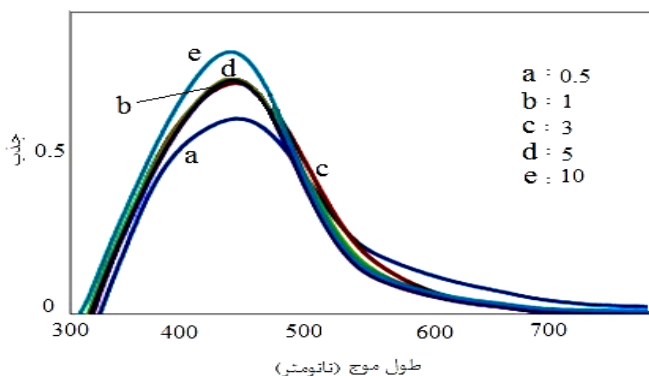
اثر مدت زمان واکنش: به منظور بررسی اثر زمان بر واکنش مورد نظر به ۳ میلی‌لیتر عصاره آبی گیاه پونه، محلول نمک نیترات نقره با غلظت ۱ میلی‌مولار اضافه و به مدت ۱، ۳، ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه در معرض نور خورشید قرار داده شد و پایداری نانو ذرات حاصله توسط غلظت‌های مختلف نمک نیترات نقره در طول زمان بررسی شد. تمامی واکنش‌های مذکور در شرایط ثابت دما و فشار استاندارد انجام گردید.

تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانو ذرات: از دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی-فرا بنفش (Rayleigh, uv-2100, China) جهت بررسی سننتر نانو ذرات استفاده شد. آنالیز XRD نانو ذرات با استفاده از دستگاه پراش پرتو ایکس مدل (Bruker- D8 Advanced, Germany) انجام شد. میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission Electron Microscop, TEM) جهت مطالعه ساختارهای سطحی یا نزدیک به سطح نمونه استفاده گردید. همچنین، در این مطالعه از میکروسکوپ الکترونی عبوری ZEISS جهت مطالعه اندازه و مورفولوژی نانو ذرات استفاده شد.

اثرات ضد میکروبی نانو ذرات: از سویه‌های استاندارد *Escherich Coli*، *Bacillus Subtilis* (ATCC9372) و *Staphylococcus aureus* (ATCC25922) و (ATCC25923) در این مطالعه استفاده گردید. جهت بررسی اثر آنتی‌باکتریال از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. به منظور بررسی اثر ضد میکروبی، سوسپانسیون میکروبی از تک کلنی باکتری‌ها طبق استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه شد. باکتری‌ها به صورت جداگانه بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد و روی سطح هر پلیت ۸ دیسک، شامل غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره (۰/۵، ۱، ۳، ۵، ۱۰ میلی‌مولار)، عصاره آبی گیاه (کنترل منفی) و آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و استرپتومایسین

تاثیر تغییرات غلظت نمک نیترات نقره بر سنتز نانوذرات:

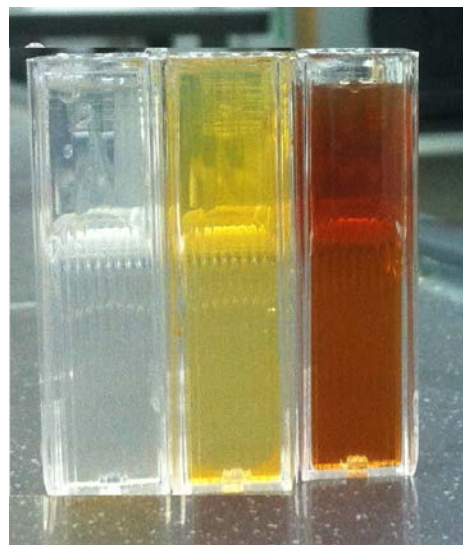
اثر غلظت‌های مختلف نیترات نقره (۰/۵، ۱، ۳، ۵ و ۱۰ میلی-مولار) بر سنتز نانوذرات نقره در شرایط ثابت (حجم عصاره ۳ سی‌سی عصاره آبی گیاه مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). با افزایش غلظت $AgNO_3$ رنگ محلول تیره تر شد که این شدت تغییر رنگ نشان دهنده افزایش غلظت نانوذرات نقره در محلول است. بررسی طیف‌ها نشان داد که با افزایش غلظت نمک نیترات نقره مورد استفاده برای سنتز نانوذرات، شدت جذب پیک‌ها افزایش می‌یابد. در حالی که افزایش بیشتر غلظت یون نقره منجر به روند معکوس می‌گردد. غلظت‌های ۱ تا ۵ میلی مولار نمک نیترات نقره تفاوتی معنی داری در طیف جذبی حاصله و همچنین زمان پایداری نانوذرات حاصله نداشت، اما استفاده از غلظت های ۰/۵ و ۱۰ میلی مولار منجر به تولید نانوذرات با ماندگاری کمتر شد. این مشاهدات نشان داد که افزایش بیشتر از ۵ میلی مولار یا کاهش غلظت نمک نیترات نقره به کمتر از ۱ میلی مولار، منجر به کاهش شدید زمان پایداری نانوذرات سنتز شده می باشد. در این مطالعه غلظت ۱ میلی مولار نمک نیترات نقره، غلظت بهینه برای سنتز نانوذرات پایدار تعیین شد.

**شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف نمک نیترات نقره بر سنتز**

نانوذرات نقره توسط غلظت ۳ میلی لیتر عصاره آبی پونه

اثر نور بر سنتز نانوذرات نقره

تاثیر تابش نور بر تشکیل نانوذرات در شرایط ثابت یعنی غلظت ۱ میلی‌مولار از نمک نیترات نقره، حجم ۳ میلی‌لیتر از عصاره گیاه مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). بررسی طیفی نشان داد



شکل ۱. سنتز نانوذرات نقره (نمونه سمت راست) که با تغییر رنگ عصاره پونه (نمونه وسط) بعد از اضافه کردن محلول نیترات نقره (نمونه سمت چپ) و قرار گرفتن در زیر نور آفتاب به مدت زمان ۳ دقیقه با چشم غیر مسلح قابل مشاهده است.

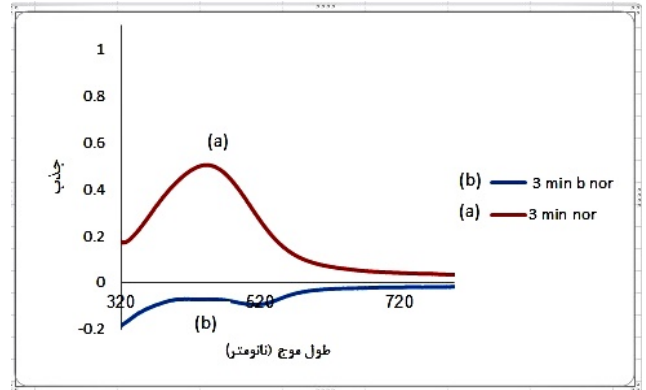
داد که، استفاده از حجم کمتر عصاره گیاه، منجر به کاهش شدت پیک‌ها می شود که می‌تواند به دلیل کاهش عوامل کاهنده باشد. با افزایش غلظت عصاره، شدت پیک‌های جذب افزایش یافته است. با این وجود وقتی حجم عصاره در شرایط ثابت افزایش می‌یابد، مواد آلی بیشتری اطراف نانوذرات را احاطه می‌کنند و در نتیجه ذرات ته‌نشین می‌شوند. بنابراین غلظت ۳ میلی لیتر عصاره مورد استفاده برای مطالعات بعدی انتخاب گردید؛ نانوذرات سنتز شده با استفاده از غلظت مذکور بیشترین مدت زمان ممکنه (۴ ماه) نسبت به سایر غلظت ها پایدار باقی ماند. حتی در این مدت شدت جذب طیف جذبی کاهش نداشت، در حالی که در غلظت های بالاتر پیک جذب در زمان های به ترتیب ۲، ۳ و ۱ ماهه از بین رفتند که نشان دهنده ناپایداری نانوذرات سنتز شده در غلظت‌های بالاتر عصاره مورد استفاده است. این مشاهدات نشان داد که افزایش غلظت عصاره گیاهی مورد استفاده برای سنتز نانوذرات منجر به کاهش شدید زمان پایداری نانوذرات سنتز شده می شود.

۷۸ را نشان دادند. که به ترتیب با صفحات کریستالی (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) مرتبط است (شکل ۴). اندازه، پهنا و زاویه پیک ها حاوی اطلاعاتی از نمونه می باشد. اندازه گیری های پراش اشعه ایکس برای نمونه های تجربی جهت تعیین اندازه و ساختار نانوذرات نقره استفاده شده است. اندازه ذرات با معادله شرر (معادله زیر) تعیین شد:

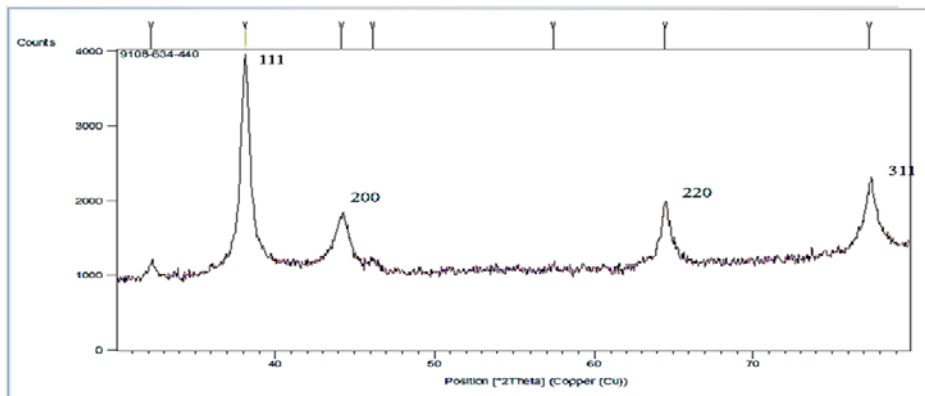
$$L = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

در این معادله β پهنای قله (پهنای کامل در نصف ماکسیمم (Full Width half maximum (FWHM))، λ طول موج اشعه ایکس به مقدار $1/04178$ آنگستروم (104178 نانومتر)، L میانگین قطر نانوذرات، θ زاویه بین اشعه تابش و صفحه ذره (زاویه پراش که در اینجا $40/01$ است) و K ثابتی است، که برای ساختارهای مکعبی ۱ در نظر گرفته می شود، ولی در مورد نقره $0/9$ می باشد. میانگین قطر نانوذرات نقره بر طبق فرمول شرر تقریباً 12 نانومتر محاسبه گردید.

در فقدان نور (تاریکی مطلق) سنتز نانوذرات اتفاق نمی افتد، ولی زمانی که نمونه در معرض تابش نور خورشید قرار گرفت، واکنش به سرعت تکمیل و ذرات نقره احیاء گردید. بنابراین حضور نور یک عامل مهم برای سنتز نانوذرات است. به نظر می رسد در این واکنش انرژی لازم جهت سنتز نانوذرات از امواج نوری تامین می شود.



شکل ۳. تاثیر حضور و عدم حضور نور در زمان ۳ دقیقه بر سنتز نانوذرات نقره به وسیله عصاره آبی گیاه پونه (۳) آنالیز پراش اشعه ایکس: بررسی طیف پراش ایکس نمونه مورد مطالعه، پیک های جذبی به ترتیب در زوایای 38 ، 44 ، 67 و

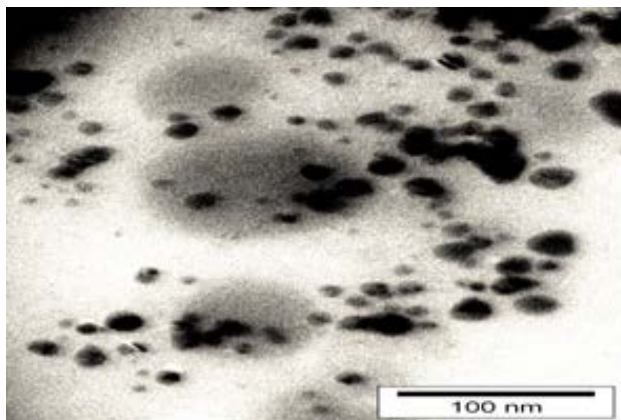


شکل ۴. طیف پراش اشعه ایکس نانوذرات نقره سنتز شده در شرایط بهینه واکنش

روی باکتری های گرم مثبت *S. aureus* و *B. subtilis* و باکتری های گرم منفی *E. coli* بررسی شد. هاله عدم رشد مشاهده شده در اطراف دیسک ها حاوی نانوذرات، نشان دهنده اثر آنتی-باکتریال نانوذرات نقره سنتز شده بود. کمترین غلظت مهاری نانوذرات بر روی دو باکتری گرم مثبت *S. aureus* و *B. Subtilis* و باکتری گرم منفی *E. coli* مشخص شد (جدول ۱).

(۴) میکروسکوپ الکترونی: تصویر TEM نانوذرات نقره سنتز شده نشان می دهد، که ذرات از نظر اندازه در مقیاس نانو و از نظر شکل تقریباً یکنواخت هستند. اندازه ذرات با استفاده از نرم افزار Image J اندازه گیری شد (شکل ۵). تصویر TEM نانوذرات نقره سنتز شده در شکل ذیل ارائه شده است.

(۵) اثر آنتی باکتریال نانوذرات نقره: اثر آنتی باکتریال نانو-ذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره آبی گیاه پونه بر



شکل ۵. تصویر TEM نانوذرات نقره سنتز شده در شرایط بهینه واکنش

جدول ۱. قطر هاله‌ی مهاری غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره سنتز شده در عصاره آبی پونه

باکتری	نانوذرات نقره (mM)					شاهد (+)	
	۰.۵	۱	۳	۵	۱۰	جنتامایسین	استرپتومایسین
<i>E. coli</i>	-	۶	۹	۱۱	۱۲	۲۰	۱۵
<i>B. Subtilis</i>	۶	۶	۹	۹	۱۲	۲۰.۵	۲۵
<i>S. aureus</i>	-	۹	۱۳	۱۴	۱۶	۲۲	۱۷

ناحیه بازدارندگی از رشد

بحث

داشت؛ به طوری که افزایش حجم عصاره از ۳ به ۳۰ میلی لیتر منجر به کاهش ۳ ماهه پایداری نانوذرات شد. غلظت نمک نیترات نقره اثر پیچیده‌تری بر سنتز نانوذرات نسبت به اثر عصاره گیاهی داشت، زیرا غلظت ۱ تا ۵ میلی مولار نیترات نقره بهترین غلظت برای سنتز نانوذرات نقره پایدار بود و در نتیجه افزایش بیشتر از ۵ میلی مولار یا کاهش غلظت نمک نیترات نقره به کمتر از ۱ میلی مولار مورد استفاده برای سنتز نانوذرات منجر به کاهش شدید مدت پایداری نانوذرات گردید. در نهایت تابش نور خورشید یک عمل کلیدی برای سنتز نانوذرات بود که در صورت عدم تابش نور، نانوذرات تشکیل نمی شدند. این پارامترها همچنین علاوه بر پایداری می تواند بر سایر خواص نانوذرات از جمله شکل، اندازه نیز تاثیرگذار باشند.

Narayanan و همکاران (۲۳) سنتز نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره‌ی برگ نعنا مکزیکایی (*Coleus amboinicus*) گزارش

در این مطالعه با توجه به کاربرد وسیع نانوذرات نقره و با توجه به مشکلات زیست محیطی رایج در روش های شیمیایی سنتز این نانوذرات، سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی گیاه پونه انجام و تایید شد. علاوه بر این، از آن جایی که ویژگی های فیزیکی و شیمیایی نانو ذرات بر عملکرد آن ها بسیار موثر است، بهینه سازی روش تولید و تعیین مناسب ترین شرایط که شامل غلظت بهینه عصاره گیاهی و نمک نیترات نقره و مدت زمان موثر در معرض بودن نور آفتاب بر مهمترین خصوصیات فیزیکوشیمیایی این نانوذرات یعنی پایداری آن ها بود، بررسی شد.

نتایج نشان داد که افزایش یا کاهش هر یک از پارامترهای واکنش سنتز، منجر به تغییر مدت پایداری نانوذرات سنتز شده می گردد. افزایش غلظت عصاره گیاه پونه مورد استفاده برای سنتز نانوذرات نقره اثر منفی بر پایداری نانوذرات حاصله

سلول‌های باکتری می‌شود. تمایل زیاد نقره به گوگرد و فسفر کلید اصلی خواص ضدباکتری آن است. گوگرد و فسفر به وفور در سراسر غشای سلولی باکتری یافت می‌شوند. نانوذرات نقره با پروتئین‌های حاوی سولفور در داخل یا خارج از غشای سلولی واکنش می‌دهند که این به نوبه خود روی زنده ماندن سلول‌ها تاثیر می‌گذارد.

Khatoon و همکاران (۲۶) موفق به سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) شدند. این نانوذرات سنتز شده دارای خواص ضدباکتری بالایی بر روی باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* از خود نشان دادند. Zargar و همکاران (۲۷) از عصاره گیاهی هنده‌بید (*Vitex negunda*) جهت تهیه نانوذرات نقره استفاده کردند. مطالعات TEM تشکیل نانوذراتی با ابعاد ۱۸/۳ نانومتر را تایید کرد، همچنین جذب مشاهده شده در ۴۲۲ نانومتر تشکیل نانوذرات نقره را اثبات کرد.

Quresh و Rajawat (۲۸) با استفاده از عصاره‌ی چای موفق به سنتز نانوذرات نقره به ابعاد ۲ تا ۲۳ نانومتر شدند. آن‌ها اثر ترکیبی نانوذرات نقره حاصل را با آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و جنتامایسین علیه باکتری *سالمونلا تیفی* بررسی کردند. نتایج تست آنتی‌باکتریال افزایش فعالیت میکروب‌کشی این آنتی-بیوتیک‌ها در ترکیب با نانوذرات نقره علیه *سالمونلا تیفی* را تأیید کرد. همچنین افزایش فعالیت میکروب‌کشی در ترکیب نانو-ذرات نقره با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بیشتر از جنتامایسین می‌باشد. Mittal و همکارانش (۲۹) توانستند نانوذرات نقره کرومی شکل، در اندازه ۴۰-۲۵ نانومتر را با استفاده از عصاره گل خرزه هندی (*Rhododendron dauricum*) سنتز کنند.

نانوذرات حاصل خاصیت آنتی‌اکسیدانی خوبی را نشان دادند. Saxena و همکارانش در سال ۲۰۱۲ موفق به سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره انجیر (*Ficus benghalensis*) شدند. این نانوذرات مقاومت خوبی برابر باکتری *Escherichia coli* نشان دادند (۳۰). در این مطالعه حساسیت آنتی‌باکتریال نانو-ذرات نقره بر روی باکتری *S. aureus*، نسبت به باکتری‌های *E.*

کردند. نتایج مطالعه آنان نشان داد که غلظت عصاره روی اندازه و شکل نانوذرات مثلثی شکل، ۱۰ ضلعی، ۶ ضلعی، و کروی شکل با تغییر غلظت عصاره این گیاه تاثیر می‌گذارد. در مطالعه Khatami و همکاران (۲۴) پارامترهای دما و pH بر پایداری نانوذرات سنتز شده با استفاده از گیاه کاسنی بررسی و نتایج نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده در شرایط اسیدی و دمای نزدیک به ۳۰ درجه بیشترین پایداری را دارند، در صورتی که pH قلیایی یا دمای های نزدیک ۶۰ درجه یا ۴ درجه سانتیگراد اثر منفی بر سنتز و پایداری نانوذرات داشتند. Sun و همکاران (۲۵) نشان دادند افزایش غلظت عصاره گیاهی منجر به کاهش پایداری نانوذرات تولیدی می‌شود که همسو با نتایج مطالعه حاضر است. آنان همچنین نشان دادند که درجه حرارت تا حد زیادی بر اندازه نانوذرات تولید شده تاثیر گذار است، به طوری که افزایش حرارت از ۲۵ به ۵۵ درجه سانتیگراد منجر به تغییر اندازه ذرات از ۹۱ به ۱۷۵ نانومتر شد.

نانوذرات به علت نسبت سطح به حجم بیشتر و جذب راحت‌تر، سمی‌تر هستند. علاوه بر این پتانسیل آزادسازی یون نقره نیز با کاهش اندازه نانوذرات نقره افزایش یافت. نانوذرات نقره به دلیل اندازه کوچکتر، در نتیجه سطح تماس بیشتری با محیط و میکروارگانیسم‌ها پیدا می‌کند، که این امر منجر به افزایش فعالیت بیولوژیک و شیمیایی آن‌ها می‌شود و در نتیجه تاثیر بیشتری بر غشای سلول می‌گذارد. در غلظت‌های پایین نانو-ذرات به دلیل کم بودن تعداد نانوذرات، میزان برهم کنش ذرات با غشاء سلولی باکتری کم و در نتیجه قدرت بازدارندگی نانو-ذرات پایین است، در نتیجه میزان بازدارندگی و تشکیل هاله کمتر است. به همین دلیل همواره غلظتی متعادل از نانوذرات جهت مقابله با رشد باکتری‌ها مطلوب است. مکانیسم عمل نقره را به برهمکنش آن با ترکیبات گروه تیول موجود در آنزیم‌های تنفسی سلول‌های باکتریایی ارتباط می‌دهند. نقره به دیواره سلولی و غشاء سلول باکتری متصل شده و فرآیند تنفس را مهار می‌کند. در مورد باکتری اشریشیاکلی، نقره سبب مهار جذب فسفات، مانیتول، سوکسینات، پرولین و گلوتامین از

روش اثرات ضد باکتریایی در برابر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نیز نشان دادند. خاصیت ضد باکتریایی این نانوذرات بر روی باکتری *S. aureus* نسبت به باکتری‌های *E. coli* و *B. subtilis* بیشتر بود و مهار رشد باکتری با افزایش غلظت و تعداد نانوذرات در تمام گروه ها ، افزایش می یابد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاصل نتایج طرح تحقیقاتی به شماره طرح ۹۷ با کد اخلاق IR.MUBAM.REC.1398.062 می باشد. بدینوسیله از دانشگاه علوم پزشکی بم جهت حمایت مالی این پژوهش قدردانی می‌گردد.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

مشارکت نویسندگان:

(۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه یا جمع آوری داده ها: پیمان محمد زاده جهانی، مهرداد خاتمی.

(۲) تجزیه و تحلیل و تفسیر داده ها: پیمان محمد زاده جهانی، هاجر یعقوبی، مهرداد خاتمی.

(۳) تهیه پیش نویس مقاله: هاجر یعقوبی

(۴) تایید دست نوشته پیش از ارسال به مجله: حکیم عزیزی

B. Subtilis و *coli* بیشتر بود. مهار رشد باکتری با افزایش غلظت و تعداد نانوذرات، افزایش می‌یابد.

از محدودیت های این مطالعه می‌توان به نامشخص بود اثرات جانبی و مضر این محصول ضد میکروبی روی سلول های جانوری اشاره کرد. پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آتی توپوگرافی و اثر سیتوتوکسیسیته و ژنوتوکسیسیته نانوذرات نقره بر سلول های جانوری و انسانی مطالعه شود. همچنین با توجه به شیوع پاندمی ویروس کرونا و کمبود مواد ضد عفونی پیشنهاد می شود که اثر ضد کرونایی این محصول نیز مطالعه گردد.

نتیجه گیری

در این مطالعه سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه پونه انجام شد. تشکیل این نانوذرات نقره توسط طیف-سنجی ماورابنفش ، طیف سنج پرتو ایکس و میکروسکوپ الکترونی عبوری مطالعه گردید که نتایج نشان دهنده توانایی این گیاه به منظور سنتز سبز نانوذرات نقره می باشد. سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از گیاهان یک روش سازگار با محیط زیست و مقرون به صرفه نسبت به روش‌های شیمیایی می‌باشد. پایداری نانوذرات نقره از نظر عدم مشاهده ته نشینی یا کاهش در شدت جذب پیک طیف سنجی، به شدت وابسته به پارامترهایی مورد مطالعه از جمله غلظت عصاره گیاهی، نمک نیترات نقره و تابش نور می باشد. افزایش یا کاهش در هر یک از این پارامترها منجر به تغییر مدت پایداری نانوذرات سنتز شده می شود. علاوه براین نانوذرات نقره تولید شده با این

References

1. Khatami M, Alijani HQ, Sharifi I. Biosynthesis of bimetallic and core-shell nanoparticles: their biomedical applications – a review. *IET Nanobiotechnology*. 2018; 12(7): 879-887.
2. Rajaei M, Foroughi MM, Jahani S, Shahidi Zandi M, Hassani Nadiki H. Sensitive detection of morphine in the presence of dopamine with La³⁺ doped fern-like CuO nanoleaves/MWCNTs modified carbon paste electrode. *Journal of Molecular Liquids*. 2019; 284(1): 462-472.
3. Torkzadeh-Mahani R, Foroughi MM, Jahani S, Kazemipour M, Hassani Nadiki H. The effect of ultrasonic irradiation on the morphology of NiO/Co₃O₄ nanocomposite and its application to the simultaneous electrochemical determination of droxidopa and carbidopa. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2019; 56(1): 183-192.
4. Miri A, Sarani M. Biosynthesis, characterization and cytotoxic activity of CeO₂ nanoparticles. *Ceramics International*. 2018; 44(11): 12642-12647.
5. Iranmanesh T, Foroughi MM, Jahani S, Shahidi Zandi M, Hassani Nadiki H. Green and facile microwave solvent-free synthesis of CeO₂ nanoparticle-decorated CNTs as a quadruplet electrochemical platform for ultrasensitive and simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine, uric acid and acetaminophen. *Talanta*. 2020; 207(1): 1-17.
6. Khatami M, Varma RS, Zafarnia N, Yaghoobi H, Sarani M, Kumar VG. Applications of green synthesized Ag, ZnO and Ag/ZnO nanoparticles for making clinical antimicrobial wound-healing bandages. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2018; 10(1): 9-15.
7. Murugesan R, Sivakumar S, Karthik K, Anandan P, Haris M. Structural, optical and magnetic behaviors of Fe/Mn-doped and co-doped CdS thin films prepared by spray pyrolysis method. *Applied Physics A*. 2019; 125(281): 1-8.
8. Karthik K, Vijayalakshmi S, Phuruangrat A, Revathi V, Verma U. Multifunctional Applications of Microwave-Assisted Biogenic TiO₂ Nanoparticles. *Journal of Cluster Science*. 2019; 30(2019): 965-972.
9. Sharma V, Kaushik S, Pandit P, Dhull D, Yadav JP, Kaushik S. Green synthesis of silver nanoparticles from medicinal plants and evaluation of their antiviral potential against chikungunya virus. *Applied microbiology and biotechnology*. 2019; 103(2): 881-891.
10. Singh P, Singh H, Ahn S, Castro-Aceituno V, Jimenez Z, Simu SY, et al. Pharmacological importance, characterization and applications of gold and silver nanoparticles synthesized by Panax ginseng fresh leaves. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2017; 45(7): 1415-1424.
11. Chen P, Song L, Liu Y, Fang Y-e. Synthesis of silver nanoparticles by γ -ray irradiation in acetic water solution containing chitosan. *Radiation Physics and Chemistry*. 2007; 76(7): 1165-1168.
12. Bogle K, Dhole S, Bhoraskar V. Silver nanoparticles: synthesis and size control by electron irradiation. *Nanotechnology*. 2006; 17(13): 3204-3301.
13. Nasretdinova GR, Fazleeva RR, Mukhitova RK, Nizameev IR, Kadirov MK, Ziganshina AY. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles in solution. *Electrochemistry Communications*. 2015; 50(2015): 69-72.
14. Mavani K, Shah M. Synthesis of silver nanoparticles by using sodium borohydride as a reducing agent. *International Journal of*

Engineering Research & Technology. 2013; 2(3): 1-5.

15. Rahman AU, Khan AU, Yuan Q, Wei Y, Ahmad A, Ullah S, et al. Tuber extract of *Arisaema flavum* eco-benignly and effectively synthesize silver nanoparticles: Photocatalytic and antibacterial response against multidrug resistant engineered *E. coli* QH4. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*.2019; 193: 31-38.

16. Khan ZUH, Khan A, Chen Y, Shah NS, Muhammad N, Khan AU, et al. Biomedical applications of green synthesized Nobel metal nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2017; 173: 150-164.

17. Singh H, Du J, Singh P, Yi TH. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by *Pseudomonas sp.* THG-LS1.4 and their antimicrobial application. *Journal of Pharmaceutical Analysis*.2018; 8(4): 258-264.

18. Jamdagni P, Rana JS, Khatri P, Nehra K. Comparative account of antifungal activity of green and chemically synthesized Zinc Oxide nanoparticles in combination with agricultural fungicides. *International Journal of Nano Dimension*. 2018; 9(2): 198-208.

19. Zamani A, Marjani AP, Mousavi Z. Agricultural waste biomass-assisted nanostructures: Synthesis and application. *Green Processing and Synthesis*.2019; 8(1): 421-429.

20. Dağlıoğlu Y, Yılmaz Öztürk B. Effect of concentration and exposure time of ZnO-TiO₂ nanocomposite on photosynthetic pigment contents, ROS production ability, and bioaccumulation of freshwater algae (*Desmodesmus multivariabilis*). *Caryologia*.2018; 71(1): 13-23.

21. Minhas FT, Arslan G, Gubbuk IH, Akkoz C, Ozturk BY, Asikkutlu B, et al. Evaluation of

antibacterial properties on polysulfone composite membranes using synthesized biogenic silver nanoparticles with *Ulva compressa* (L.) Kütz. and *Cladophora glomerata* (L.) Kütz. extracts. *International Journal of Biological Macromolecules*.2018; 107: 157-165.

22. Wang C, Mathiyalagan R, Kim YJ, Castro-Aceituno V, Singh P, Ahn S, et al. Rapid green synthesis of silver and gold nanoparticles using *Dendropanax morbifera* leaf extract and their anticancer activities. *International Journal of Nanomedicine*.2016; 11(1): 3691-3701.

23. Narayanan KB, Sakthivel N. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using the leaf extract of *Coleus amboinicus* Lour. *Materials Research Bulletin*.2011; 46(10): 1708-1713.

24. Khatami M, Zafarnia N, Bami MH, Sharifi I, Singh H. Antifungal and antibacterial activity of densely dispersed silver nanospheres with homogeneity size which synthesized using chicory: An in vitro study *Journal de Mycologie Médicale*.2018; 28(4): 637-644.

25. Sun Q, Cai X, Li J, Zheng M, Chen Z, Yu C-P. Green synthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract and evaluation of their stability and antibacterial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*.2014; 444(5): 226-231.

26. Khatoon A, Khan F, Ahmad N, Shaikh S, Rizvi SMD, Shakil S. Silver nanoparticles from leaf extract of *Mentha piperita*: Eco-friendly synthesis and effect on acetylcholinesterase activity. *Life Sci*. 2018; 209(15): 430-434.

27. Zargar M, Hamid AA, Bakar FA, Shamsudin MN, Shameli K, Jahanshiri F, et al. Green synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles using *Vitex negundo* L. *Molecules*.2011; 16(8): 6667-6676.

28. Rajawat S, Qureshi MS. Electrolytic Deposition of Silver Nanoparticles Under "Principles of Green Chemistry". Arabian Journal for Science and Engineering. 2014; 39(1): 563-568.
29. Mittal AK, Kaler A, Banerjee UC. Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Silver Nanoparticles Synthesized from Flower Extract of *Rhododendron dauricum*. Nano Biomedicine & Engineering. 2012; 4(3) 118-124.
30. Saxena A, Tripathi RM, Zafar F, Singh P. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous solution of *Ficus benghalensis* leaf extract and characterization of their antibacterial activity. Materials Letters. 2012; 67(1): 91-94.

Optimization of effective parameters on the suspension durability of green synthesis silver nanoparticles and evaluation their antimicrobial effect

Peyman Mohamadzade Jahani¹, Hakim Azizi², Mehrdad Khatami*¹, Hajar Yaghobi³

1. Department of Laboratory Science, School of Medicine, Bam University of Medical Sciences, Bam, Iran

2. Department of parasitology, School of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran

3. Clinical Biochemistry Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

Corresponding author: mehrdad7khatami@gmail.com

Abstract

Background & Aim: There have been many studies on green synthesis so far, but the parameters affecting the stability of the nanoparticle suspension have been ignored. The stability of nanoparticles over time is one of the key features for their application.

Methods: This experimental study was carried out in 2019. The effect of plant extract concentration, silver nitrate concentration, and time of sun exposure on the synthesis and stability of the nanoparticle suspension was studied. The antibacterial effects of nanoparticles were evaluated against Gram-positive (*Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*) and gram-negative bacteria (*Escherichia Coli*).

Results: The rapid and biocompatible green synthesis of silver nanoparticles was performed using plant extract. Increasing the extract volume from 3 to 30 ml resulted in a 3-month decrease in nanoparticle stability.

Conclusion: In the synthesis of nanoparticles, the best conditions for synthesis of stable silver nanoparticles were when using an extract volume of 3 ml, 1 mM silver nitrate concentration and 10 min reaction time under sunlight. The sunlight was a key factor in the synthesis of nanoparticles. These nanoparticles have good antibacterial activity against all test bacteria.

Keywords:

Green synthesis,
Silver
Nanoparticles,
Antimicrobial

How to Cite this Article: Mohamadzade Jahani P, Azizi H, Khatami M, Yaghobi H. Optimization of effective parameters on the suspension durability of green synthesis silver nanoparticles and evaluation their antimicrobial effect. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2020;8(1):36-47.