تهیه نانوذره‌های نقره توسط عصاره چهار گونه گیاهی و بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی آن

تارا معادی

شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود، گروه مهندسی شیمی

رامین قهرمان‌زاده+*، مریم یوسفی، فرشته محمدی*

تهران، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی -ابن سینا، مرکز تحقیقات ریز فناوری زیستی

چکیده: *روش تهیه سبز، روشی سازگار با محیط زیست، مقرون به صرفه و کارآمد برای تهیه نانوذره‌های نقره می‌باشد. این روش برتری‌هایی مانند استفاده از عصاره های ارزان قیمت و در دسترس گیاهان، استفاده از مواد غیر سمی و مواد زیستی سازگار با محیط زیست و همچنین سادگی در مرحله‌های انجام عملیات را دارا می‌باشد. در این پژوهش مخلوط واکنش دارای عصاره گیاهان و نمک نقره نیترات برای تهیه نانوذره‌های نقره گرمادهی شد و تغییر رنگ تدریجی از زرد کمرنگ به رنگ قهوه ای را در مدت زمان گرماخانه‌ای از خود نشان داد. ویژگی‌های نانوذره‌های نقره تهیه شده توسط طیف سنجی نور مرئی -فرا بنفش (UV-Vis spectrophotometer)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و طیف سنجی پراش اشعه ایکس (XRD) بررسی شد. با بررسی تصویرهای به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی عبوری مشخص شد نانوذره‌های نقره تهیه شده دارای شکل کروی و اندازه‌ای بین ۵ تا ۲۵ نانومتر هستند. نانوذره‌های نقره تهیه شده فعالیت ضد میکروبی خوبی در برابر دو گونه باکتریایی (اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس) از خود نشان دادند.*

واژه‌های کلیدی: *نانوذره‌های نقره، عصاره گیاهی، تهیه سبز، آب، نانوذره‌های فلزهای کمیاب، فعالیت ضد میکروبی.*

KEY WORDS: *Silver nanoparticles, Plant extract, Green synthesis, Water, Nobel metal nanoparticles, Antimicrobial activity.*

مقدمه

در چند دهه اخیر تهیه نانوذره‌ها و مطالعه آنها توجه دانشمندان را در حوزه‌های گوناگون علوم بنیادی و کاربردی به خود جلب کرده است [۱]. نانو فناوری به مفهوم مطالعه و توسعه مواد در مقیاس اتمی، ملکولی و ماکروملکولی می باشد که منجر به دستکاری واحدهای ساختمانی مواد و تبدیل آنها به مقیاس۱۰۰-۱ نانومتر می‌شود [۲]. با توجه به این تعریف مشخص است که اثرهای مکانیک کوانتومی در این مقیاس دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشند [۳].

در چند سال اخیر استفاده از نانوذره‌های فلزی کاربرد های بسیاری در فناوری جدید پیدا کرده است [۴]. نانوذره‌های فلزی مانند نانوذره‌های طلا، نقره، مس و غیره به نانوذره‌های طراحی شده‌ای گفته می‌شود که دارای ویژگی های الکترونی، کاتالیستی و نوری مناسب باشند و به دلیل وجود این ویژگی های دلخواه از این گونه نانوذره‌ها در حوزه هایی مانند ساخت حسگرها، ساخت کاتالیست‌ها و اسپکتروسکوپی رامان سطح افزایش یافته استفاده وسیعی می‌شود.

*عهده دار مکاتبات

+E-mail: r.ghahremanzadeh@avicenna.ac.ir

هم چنین نانوذره‌های فلزی به دلیل داشتن ویژگی هایی مانند رزونانس پلاسمون سطحی [۵]، ویژگی‌های نوری [۶]، عملکرد کاتالیستی مناسب [۷]، فعالیت ضد میکروبی مناسب [۸] و همچنین نسبت بالای سطح به حجم و میزان تخلخل کنترل شده [۹] و غیره بسیار مورد توجه بوده‌اند. در بین نانوذره‌های فلزی، نانوذره‌های نقره نقش مهمی در حوزه زیستی و داروسازی دارند [۱۰]. در سال‌های اخیر پژوهشگران فعالیت ضد میکروبی نانوذره‌های نقره را در برابر عفونت‌ها و بیماری‌ها به خوبی نشان داده‌اند [۱۱]. روش‌های گوناگونی برای تهیه نانوذره‌های فلزی وجود دارد مانند احیای شیمیایی، هیدروترمال، میکروامولسیون و استفاده از لیزر [۱۲]. که در میان آنها روش احیای شیمیایی یون‌های فلزی و تبدیل آنها به نانوذره‌ها به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۳]. این گونه روش‌ها که با نام روش‌های شیمیایی شناخته می‌شوند بسیار پرهزینه بوده و در فرایند تهیه نانوذره‌ها از مواد شیمیایی مضر، سمی و بسیار خطرناکی استفاده می‌شود [۱۴] که منجر به ایجاد مشکلات بسیار زیستی و زیست محیطی می‌شوند [۱۵]. بنابراین موادشناسان و نانو شیمی‌دان‌ها به دنبال روشی جایگزین و سازگار با محیط زیست برای تهیه نانوذره‌های فلزی هستند [۱۶]. در سال های اخیر روش‌های گوناگونی برای تهیه نانوذره‌ها به ویژه نانوذره‌های نقره توسعه پیدا کرده است به عنوان نمونه استفاده از میکروارگانیسم ها سبب تولید نانوذره‌ها به صورت داخل سلولی و خارج سلولی می‌شود *غلامی شعبانی* و *همکاران* (۱۳۹۰) با استفاده از توده سلولی قارچ *فوزاریوم اگزیسپوروم* نانو ذره‌های نقره را به صورت خارج سلولی تهیه کردند و نشان دادند ترشح برخی پروتیین ها و آنزیم ها توسط قارچ به محیط عامل تهیه نانوذره‌های نقره است [۱۷]. از میان این روش‌ها، روش‌های زیستی و روش تهیه سبز قادر به تهیه طیف وسیعی از نانوذره‌های فلزی هستند [۱۸]. در سال ۲۰۰۳ میلادی، *شانکار* و *همکاران* نانوذره‌های نقره با پایداری بالا را با استفاده از عصاره برگ شمعدانی تهیه کردند و مشخص کردند که سرعت احیای یون‌های نقره با استفاده از عصاره برگ شمعدانی بیشتر از استفاده از قارچ هایی مانند *فوزاریوم اگزسپوروم* است و همچنین سرعت تهیه با استفاده از گیاه بیشتر از روش‌های تهیه شیمیایی است [۱۹]. تهیه نانوذره‌ها با استفاده از عصاره گیاهان از نظر زیست محیطی بسیار سودمند است [۲۰]. تهیه خارج سلولی نانوذره‌ها با استفاده از گیاهان و عصاره آنها باعث کنترل بهتر شکل و اندازه نانوذره‌های تهیه شده می‌شود [۲۱]. در سال ۲۰۰۹ میلادی، *یانگ سانگ* و *همکاران* نانوذره‌های نقره را با استفاده از عصاره پنج گیاه (کاج، خرمالو، چهل سکه، ماگنولیا وپلاتانوس) تهیه کردند و مشخص شد که می‌توان اندازه ذره‌ها را با تغییر در دمای واکنش، غلظت عصاره برگ و غلظت نیترات نقره کنترل کرده و با افزایش غلظت نقره نیترات اندازه متوسط ذرات کاهش می‌یابد [۲۲]. استفاده از گیاهان و عصاره آنها می‌تواند روش مناسبی برای تهیه نانوذره‌ها در مقیاس گسترده باشد [۲۳]. نقره در ابعاد نانو بر متابولیسم، تنفس و تولید مثل میکروارگانیسم اثر می‌گذارد. در مطالعه‌های گوناگون ویژگی‌های ضد میکروبی این نانوذره‌ها و استفاده مفید از آنها در زمینه مهار اختصاصی میکروب‌ها بررسی شده است [۲۴].

هدف اصلی

با توجه به تحول شگرفی که نانوفناوری در زندگی بشر ایجاد کرده است و هم چنین اهمیت و کاربرد گسترده ای که نانوذره‌های نقره دارند به عنوان مثال خاصیت ضد عفونی کنندگی آنها، این نانوذره‌ها برای زمینه‌های بهداشتی و پزشکی چشمگیر و دارای اهمیت می‌باشند. پیش از این تهیه نانوذره‌های نقره به صورت شیمیایی بسیار دشوار و با هزینه بالایی انجام می‌شد درحالی که این فرایند با استفاده از عصاره گیاهان در کمترین زمان ممکن و با کمترین هزینه انجام می‌شود. درنتیجه پژوهش در این زمینه می‌تواند بسیار مفید واقع شود. در این پژوهش چند گونه گیاهی برای تهیه نانوذره‌های نقره انتخاب شد و با بررسی و تغییر شرایطی چون دما، زمان و غلظت، مناسب ترین شرایط برای تهیه نانوذره‌ها و همچنین گیاه مناسب انتخاب شد و در پایان در روش بهینه شده ویژگی‌های ضد باکتریایی این نانوذره‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

بخش تجربی

جمع آوری گیاهان

محل جمع آوری گیاهان مورد استفاده در این پژوهش که عبارتند از گونه فرولا گوموزا با کد هرباریومی STU-MAIN-1-19755:BGBM از استان ایلام- شهرستان آبدانان، گونه فرولا لاتیسکتا کد هرباریومی FUMH 1004 از استان خراسان- کوه های هزار مسجد، گونه توکریوم پولیوم ال کد هرباریومی KF1249 از استان تهران- شهرستانک و گونه تراچومیتوم ونتوم کد هرباریومی NVH 20120178 استان تهران- گلندوک بود. برگ و ساقه این گیاهان با آب مقطر سترون شسته شده و به مدت ده روز

در دمای اتاق خشک شدند. دلیل اصلی انتخاب این گیاهان از یک سو به خاطر دسترسی آسان به این گیاهان در کشور ایران می‌باشد که به راحتی قابلیت رشد و تکثیر را دارند و در صورت نیاز به‌تولید انبوه مشکلی از این جهت وجود ندارد و از سوی دیگر بر روی این گونه‌ها تا کنون این بررسی صورت نگرفته است.

مواد و میکروارگانیسم ها

محلول نمک نقره نیترات از شرکت مرک خریداری شد. سوش استاندارد باکتری *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli* ATCC 9763)، سوش استاندارد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)، محیط مغذی (مورد استفاده در تهیه محیط کشت میکروبی)، محیط آگارمولرهینتون (مورد استفاده در تهیه محیط کشت میکروبی) و دیسک‌های کاغذی سترون به ترتیب از شرکت های مرک، سیگما–آلدریچ، فلوکا و بی دی تهیه شدند .

آماده سازی عصاره گیاهان

مقدار ۵ گرم از پودر برگ و ساقه گیاهان به صورت جداگانه به همراه ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. عصاره های برگ و ساقه توسط کاغذ صافی صاف شده و برای استفاده در یخچال نگهداری شدند.

تهیه نانوذره‌های نقره

۲۰ میلی لیتر از محلول نقره نیترات ۱ میلی مولار ساخته شده در شیشه های در پوش دار جداگانه ریخته شد. عصاره برگ و ساقه به طور جداگانه، در مقدارهای ۰/۱ ، ۰/۳ ، ۰/۵ ، ۱، ۲ و ۳ میلی‌لیتر به هر یک از شیشه‌ها افزوده شد. درب شیشه‌ها بسته شد و شیشه‌ها در دماهای ۳۰، ۵۰ و۷۰ درجه سلسیوس و با دور ۱۵۰rpm در دستگاه گرماخانه قرار گرفته و واکنش تهیه نانوذره‌های نقره مورد بررسی قرار گرفت.

در بررسی اثر دما روی تهیه نانوذره‌های نقره، مخلوط واکنش دارای نقره نیترات ۱ میلی مولار و عصاره برگ و ساقه گیاهان در دماهای ۳۰، ۵۰ و۷۰ درجه سلسیوس در گرماخانه گذاشته شدند. در بررسی اثر زمان روی تهیه نانوذره‌های نقره، نمونه‌گیری در فاصله‌های زمانی مشخص انجام شد. این نمونه ها برای تجزیه‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی نانوذره‌های نقره تهیه شده

در طول موج بین ۷۰۰–۳۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Perkinelmer precisely-Lambda 25 از مخلوط واکنش طیف نور مرئی ـ فرا بنفش تهیه شد. نتیجه‌های به دست آمده از طیف سنجی از لحاظ طول موج و شدت بیشینه جذب مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. مخلوط واکنش چندین بار سانتریفیوژ شد و سرانجام رسوب این نانوذره‌ها به صورت پودر درآمده و برای آنالیز TEM و XRD استفاده شدند. برای دیدن اندازه و شکل نانوذره‌های نقره تهیه شده، تصویرهای TEM با استفاده از دستگاه Jeol JEM- 2100UHR در ولتاژ ۲۰۰ کیلو ولت تهیه شد. برای دیدن ساختار بلوری نانوذره‌های نقره تهیه شده، طیف‌سنجی XRD با استفاده از دستگاه PAnalytical X'Pert-Pro با تشعشع Cu Kα و Å 1.54 = λ انجام شد.

طیف‌سنجی نور مرئی ـ فرا بنفش (UV-Vis)

تهیه نانوذره‌های نقره ابتدا توسط طیف سنجی نور مرئی ـ فرابنفش درطول موج ۷۰۰–۳۰۰ نانومتر با استفاده از کووت هایی از جنس کوآرتز و آب مقطر به عنوان شاهد بررسی شد. احیای یون‌های نقره توسط اندازه‌گیری طیف نور مرئی ـ فرابنفش مخلوط واکنش دیده شد. پیک رزونانس پلاسمون سطحی در طول موج ۴۵۰– ۴۰۰ نانومتر دیده شد.

بررسی تصویرهای میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

توزیع شکل و اندازه نانوذره‌های نقره تهیه شده توسط آنالیز تصویرهای میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی شد. چندین قطره از محلول دارای نانوذره‌های نقره تهیه شده روی شبکه‌های دستگاه چکانده شد و باقیمانده محلول توسط کاغذ صافی برداشته شد.

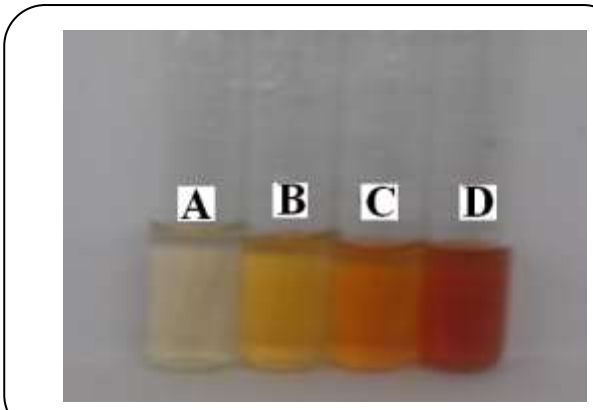
طیف سنجی پراش اشعه ایکس(XRD)

ساختار بلوری نانوذره‌های نقره تهیه شده توسط طیف‌سنجی پراش اشعه ایکس بررسی شد. نمونه های مربوط به این آنالیز با سانتریفیوژ مکرر نمونه در گرماخانه گذاشته شده در شرایط بهینه و سپس استفاده از دستگاه لیوفیلایزر Sartorius-Micro-Dismembrators به مدت یک شب به صورت پودر در آمدند.

بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذره‌های تهیه شده

در آزمایش بررسی حساسیت *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به نانوذره‌های نقره تهیه شده در این پژوهش از روش

اندازه‌گیری هاله عدم رشد باکتری‌ها در حضور و عدم حضور نانوذره‌های نقره استفاده شد. سوش‌های مورد استفاده در این مطالعه، سوش‌های استاندارد باکتری‌های *اشریشیاکلی* و سوش استاندارد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشند. برای انجام کار ابتدا بشقابک‌های آگارمولرهینتون به عنوان محیط کشت جامد جهت رشد باکتری‌ها تهیه شد. سپس باکتری‌ها در محیط کشت مایع (Nutrient Broth) به ترتیب زیر رشد داده شدند. در ابتدا ۲۰ میکرولیتر از سوش استاندارد باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*، به لوله دارای ۳ میلی لیتر از محیط کشت مایع (NB) اضافه شد. لوله دارای محیط کشت و باکتری تلقیح شده در دستگاه لرزاننده (شیکر) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با دور چرخش ۲۵۰rpm به مدت بیست و چهار ساعت گرماخانه‌گذاری شد. بعد از ۱۶ ساعت لوله آزمایش دارای باکتری کشت داده شده به مدت ۱۰ دقیقه با دور چرخش ۲۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. مایع رویی به‌دست آمده از سانتریفیوژ به ظرف ضایعات انتقال داده شد تا پس از اتوکلاو دور ریخته شود. سپس رسوب باکتری‌ها به وسیله بافر فسفات (PBS) سترون سه مرتبه شستشو شدند. پس از تکرار آزمایش و بهینه‌سازی شرایط گوناگون آزمایش، از کمترین رقت ممکن یعنی رقت 10^{-4} از باکتری‌ها استفاده شد. برای دستیابی به رقت 10^{-4} از سوسپانسیون باکتریایی، رسوب باکتریایی به دست آمده از مرحله سوم شستشوی با PBS آن‌قدر رقیق شد تا یک سوسپانسیون باکتری به‌دست آید که چگالی نوری (OD) آن در طول موج ۶۰۰ نانو متر حدود ۰/۱ باشد. سپس با استفاده از فناوری تهیه مجموعه رقت، رقت 10^{-4} از باکتری تهیه شد و سرانجام به وسیله سوآپ سترون رقت 10^{-4} از سوسپانسیون باکتریایی در چهار جهت گوناگون روی سطح محیط آگار مولرهینتون کشت داده شدند. صفحه‌های گرد کاغذی ویژه با قطر ۰/۵ سانتی متر که قبل از استفاده به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس سترون شده بودند توسط پنس سترون روی سطح محیط کشت قرار گرفته و روی هریک ۲۰میکرولیتر نمونه شامل نانوذرهای نقره تهیه شده در شرایط بهینه و چهار نوع آنتی بیوتیک معمول قرار گرفت. سپس بشقابک‌های در بسته در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفته و پس از گذشت بیست و چهار ساعت قطر هاله عدم رشد در حول هر صفحه گرد در مقیاس میلیمتری اندازه‌گیری شد. این تست دوبار تکرار شد و نتیجه‌ها به شکل میانگین گزارش شد.



شکل ۱ـ محلول نقره نیترات ۱ میلی مولار و عصاره برگ گیاه فرولا لاتیسکتا .بعد از ۱ ساعت گرماخانه‌گذاری (A)، بعد از ۸ ساعت گرماخانه‌گذاری (B)، بعد از ۲۰ ساعت گرماخانه‌گذاری (C)، بعد از ۴۰ ساعت گرماخانه‌گذاری (D).

نتیجه‌ها و بحث

نانوذره‌های نقره با استفاده از عصاره برگ و ساقه چهار نوع گیاه گوناگون تهیه شدند. احیای یون های نقره به نانوذره‌های نقره با دیدن تغییر رنگ مخلوط واکنش به رنگ قهوه ای در مدت زمان معین مشخص می‌شود. در شکل ۱ این تغییر رنگ برای عصاره برگ گیاه فرولا لاتیسکتا قابل دیدن است.

از فناوری‌های معمول مورد استفاده در ارزیابی ساختاری نانوذره‌های نقره تهیه شده آنالیز طیف سنجی نور مرئی ـ فرابنفش است. تهیه نانوذره‌های نقره از یون های نقره، پیک جذب ثابت را به دلیل رزونانس پلاسمون سطحی و احیای یون‌های نقره در بازه زمانی ۶۰–۱ ساعت در طول موج ۴۲۰ نانومتر نشان دادند. این نتیجه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

انتخاب گیاه مناسب و زمان مناسب در تهیه نانوذره‌ها

همان‌گونه که از جدول ۱ قابل دیدن است عصاره برگ گیاه فرولا لاتیسکتا بعد از ۴۸ ساعت بالا ترین نرخ میدان رشد نانوذره‌های نقره را داشته و از این رو بهترین گزینه برای تهیه نانوذره‌های نقره انتخاب شد.

اثر غلظت بر تهیه نانوذره‌ها

با بررسی اثر غلظت‌های گوناگون عصاره برگ گیاه فرولا لاتیسکتا روی تهیه نانوذره‌های نقره در دمای ۳۰ درجه سلسیوس مناسب‌ترین غلظت برای تهیه نانوذره‌های نقره به دست آمد که این نتیجه‌ها در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱ـ نتیجه‌های آنالیز طیف سنجی UV . بیشینه شدت جذب (λ_{max}) برای عصاره گیاهان[a].

اندام گیاهی	A: λ_{ma} بعد از دو ساعت	A: λ_{ma} بعد از شش ساعت	A: λ_{ma} بعد از دوازده ساعت	A: λ_{ma} بعد از بیست و چهار ساعت	A: λ_{ma} بعد از چهل و هشت ساعت	A: λ_{ma} بعد از شصت ساعت
عصاره برگ فرولا لاتیسکتا	۰/۱۷۸	۰/۳۵۸	۰/۴۱۱	۰/۶۷۶	۱/۱۲۵	۱/۱۲۷
عصاره برگ فرولا گوموزا	۰/۰۸۴	۰/۱۳۸	۰/۳۲۴	۰/۴۷۷	۰/۸۰۲	۰/۹۰۱
عصاره برگ توکروم پولیوم ال	۰/۰۴۵	۰/۰۸۶	۰/۲۱۷	۰/۳۰۵	۰/۳۴۵	۰/۳۷۷
عصاره برگ تراچومیتوم ونتوم	۰/۱۰۳	۰/۲۵۷	۰/۳۰۴	۰/۳۷۲	۰/۴۶۵	۰/۴۸۸
عصاره ساقه فرولا لاتیسکتا	۰/۱۲۸	۰/۲۶۳	۰/۳۲۸	۰/۵۶۷	۰/۹۲۶	۰/۹۴۶
عصاره برگ فرولا گوموزا	۰/۰۸۹	۰/۱۰۴	۰/۲۹۷	۰/۳۸۷	۰/۷۶۱	۰/۷۸۸
عصاره برگ توکروم پولیوم ال	۰/۰۲۸	۰/۰۶۴	۰/۱۶۴	۰/۲۰۸	۰/۳۴۲	۰/۳۶۷
عصاره برگ تراچومیتوم ونتوم	۰/۰۹۸	۰/۱۸۷	۰/۲۳۸	۰/۳۱۱	۰/۳۸۱	۰/۳۹۲

a) شرایط واکنش: ۰/۵ میلی لیتر از عصاره اندام های گیاهی مختلف در۲۰ میلی لیتر محلول ۱ میلی مولار نقره نیترات در دمای ۳۰ درجه سلسیوس.

جدول ۲ـ غلظت‌های گوناگون عصاره برگ گیاه فرولا لاتیسکتا در مقدار ثابت نقره نیترات در دمای ۳۰ درجه سلسیوس[a].

غلظت	۰/۱میلی لیتر عصاره	۰/۳میلی لیتر عصاره	۰/۵میلی لیتر عصاره	۱میلی لیتر عصاره	۲میلی لیتر عصاره
A: λ_{ma} بعد از شش ساعت	۰/۰۹۲	۰/۰۱۵۶	۰/۳۵۸	۰/۳۶۲	۰/۳۶۰

a)تمام مقدارهای عصاره به ۲۰ میلی لیتر محلول ۱ میلی مولار نقره نیترات اضافه شد.

با توجه به جدول ۲ در میان غلظت های ۰/۱ ، ۰/۳ ، ۰/۵ ، ۱ و ۲ میلی‌لیتر، غلظت ۰/۵میلی لیتر از عصاره برگ گیاه فرولا لاتیسکتا در۲۰ میلی لیتر محلول ۱ میلی مولار نیترات نقره به دلیل داشتن بیشینه شدت جذب (λ_{max}) بالاتر در میان غلظت‌های دیگر مناسب ترین غلظت برای تهیه نانوذره‌های نقره می‌باشد.

اثر دما بر تهیه نانوذره‌ها

برای انتخاب مناسب ترین دما، محلول ۰/۵میلی لیتر عصاره برگ گیاه فرولا لاتیسکتا در۲۰ میلی لیتر محلول ۱ میلی مولار نقره نیترات در دماهای ۳۰، ۵۰ و۷۰ درجه سلسیوس گرماخانه‌گذاری شد. نتیجه‌های به دست آمده در جدول ۳ ارایه شده است.

با توجه به نتیجه‌های داده شده در جدول۳ در دمای ۷۰ درجه سلسیوس بیشترین میزان رشد نانوذره‌های نقره برای عصاره برگ گیاه فرولا لاتیسکتا دیده شد از این رو دمای ۷۰ درجه سلسیوس مناسب ترین دما برای تهیه نانوذره‌های نقره انتخاب شد.

در شکل ۲ نتیجه‌های به دست آمده از آنالیز طیف سنجی نور مرئی ـ فرابنفش برای عصاره برگ گیاه فرولا لاتیسکتا در شرایط بهینه ارایه شده است.

با توجه به نمودار ارایه شده در شکل ۲، بالاترین شدت جذب برای عصاره برگ گیاه فرولا لاتیسکتا و محلول ۱ میلی مولار نقره نیترات در دمای ۷۰ درجه سلسیوس و غلظت ۰/۵ به ۲۰، برابر ۱/۴۳۲ بود که در طول موج ۴۲۵ نانومتر و در ساعت شصتم از زمان گرماخانه‌گذاری کردن به‌دست آمد.

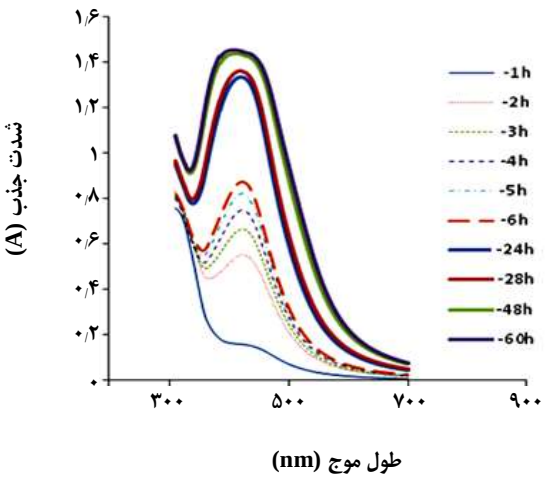
برای ارزیابی ساختاری نانوذره‌های نقره تهیه شده در شرایط بهینه و به دست آوردن اطلاعات بیشتر در مورد ویژگی‌های این نانوذره‌ها، از تصویرهای به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی عبوری برای به دست آوردن شکل و اندازه نانوذره‌های نقره تهیه شده استفاده شد. با توجه به این تصویرها مشخص است که نانوذره‌های کروی، در اندازه ۵ تا ۲۵ نانومتر و با اندازه متوسط ۲۰ نانومتر هستند. این تصویرها در شکل ۳ نشان داده شده است.

پودر خشک نانوذره‌های نقره برای آنالیز پراش اشعه ایکس استفاده شد. شدت پراش از۱۰ تا ۸۰ در زاویه ۲θ ثبت شد. الگوی پراش نشان داده شده در شکل ۴ نشان دهنده پودر نقره فلزی خالص است که نشان می دهد یون های نقره توسط عصاره برگ گیاه فرولا لاتیسکتا در شرایط بهینه واکنش به Ag° احیا شده اند.

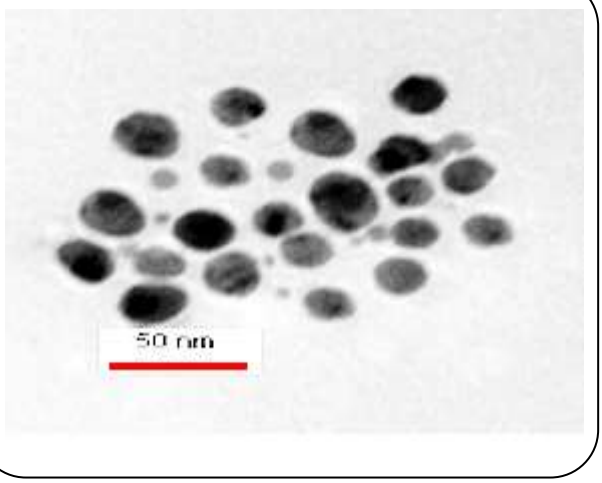
جدول ۳ـ اثر دما روی تهیه نانوذره‌های نقره توسط عصاره برگ گیاه فرولا لاتیسکتا[a]

دما	۳۰ °C	۵۰ °C	۷۰ °C
A: λ_{ma} بعد از شش ساعت	۰/۳۵۸	۰/۷۹۱	۰/۹۴۵
A: λ_{ma} بعد از بیست و چهار ساعت	۰/۶۷۶	۱/۰۶۲	۱/۳۳۲
A: λ_{ma} بعد از چهل و هشت ساعت	۱/۱۲۵	۱/۳۳۱	۱/۴۳۲
A: λ_{ma} بعد از شصت ساعت	۱/۱۳۲	۱/۳۴۳	۱/۴۴۱

[a] ۰/۵ میلی لیتر عصاره برگ گیاه فرولا لاتیسکتا در ۲۰ میلی لیتر محلول ۱ میلی مولار نیترات نقره



شکل ۲ـ طیف نور مرئی ـ فرابنفش عصاره برگ گیاه فرولا لاتیسکتا و محلول ۱ میلی مولار نیترات نقره در بازه‌های زمانی گوناگون، در دمای ۷۰ درجه سلسیوس و غلظت ۰/۲۰،۵.



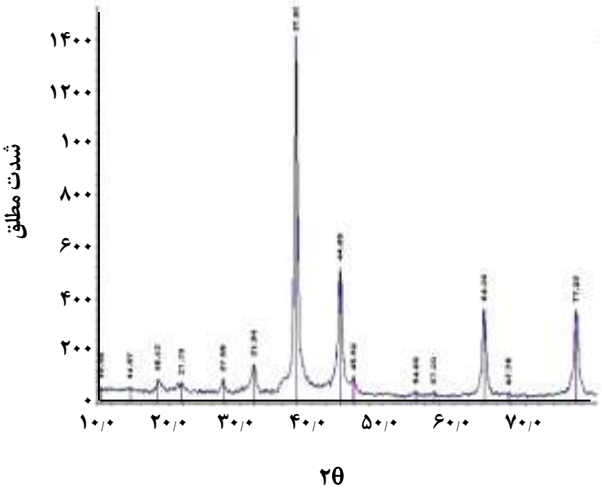
شکل ۳ـ تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذره‌های نقره تهیه شده.

سرانجام فعالیت ضد میکروبی نانوذره‌های نقره تهیه شده در شرایط بهینه روی دو گونه باکتریایی شامل یک گونه باکتری گرم منفی (*اشریشیا کلی*) و یک گونه باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) بررسی شد (جدول ۴). نتیجه‌های به دست آمده از فعالیت ضد میکروبی این نانوذره‌ها با چهار گونه آنتی بیوتیک که به عنوان شاهد در این آزمایش به کار رفتند مقایسه شد. هم چنین فعالیت ضد میکروبی محلول ۱ میلی مولار نقره نیترات نیز بررسی شد که هاله عدم رشد چشمگیری از خود نشان نداد. با توجه به نتیجه‌ها، هاله عدم رشد مناسب این نانوذره‌ها در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۱۲ میلی متر بود. همچنین نانوذره‌های نقره تهیه شده در برابر باکتری *اشریشیا کلی* قطر هاله عدم رشد برابر با ۹ میلی متر از خود نشان دادند. این نتیجه‌ها در جدول ۴ ارایه شده است.

تا کنون پژوهش‌های گسترده ای جهت تعیین مکانیسم اثر نانوذره‌های نقره روی گونه‌های باکتریایی انجام گرفته است. پژوهش‌های بسیاری، مبتنی بر واکنش‌های احتمالی بین نانوذره‌ها با ماکرومولکول های موجودات زنده نشان می دهند که اختلاف بین بار منفی میکروارگانیسم و بار مثبت نانوذره، به صورت یک الکترومغناطیس جاذب بین میکروب و نانوذره عمل کرده و باعث اتصال نانوذره به سطح سلول شده و در نتیجه می تواند باعث مرگ سلول شود. سرانجام تعداد زیادی از این تماس‌ها منجر به اکسید شدن مولکول‌های سطحی میکروب‌ها و مرگ سریع آنها می‌شوند. احتمال داده می شود یون های آزاد شده از نانومواد با گروه‌های تیول پروتئین های سطحی سلول های باکتریایی واکنش دهند. تعدادی از این پروتئین های غشای سلول‌های باکتریایی عمل انتقال مواد معدنی از سطح دیواره را به عهده دارند؛ که نانومواد با اثر بر روی این پروتئین ها باعث غیر فعال شدن

جدول ۴ـ فعالیت ضدمیکروبی نانوذره‌های نقره تهیه شده در شرایط بهینه.

ردیف	نام میکرو ارگانیسم	قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر				
		نانوذره‌های نقره	آنتی بیوتیک جنتا مایسین	آنتی بیوتیک سیپرو فلوکساسین	آنتی بیوتیک امپینمی	آنتی بیوتیک سفالوتین
۱	استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲	۱۰	۱۹	۱۵	۱۳
۲	اشریشیا کلی	۹	۹	۱۶	۱۳	۱۱



شکل ۴ـ الگوی پراش اشعه ایکس نانوذره‌های نقره تهیه شده.

و نفوذ ناپذیری غشا می‌شوند [۲۵]. غیر فعال شدن تراوایی غشا سرانجام باعث مرگ سلول می‌شود. همچنین نانومواد، چسبیدن سلول باکتری و تشکیل فیلم زیستی را به تأخیر می اندازند که این عمل باعث می شود گروهی از باکتری ها نتوانند تثبیت شوند و تکثیر یابند [۲۶]. تشکیل کلونی، رشد سلول باکتری و تشکیل ماتریکس‌های فیلم زیستی فشرده میکروبی باعث ایجاد عفونت می‌شوند. نانوذره‌ها از تشکیل این عامل‌های دفاعی میکروب‌ها در برابر سامانه ایمنی سلول میزبان جلوگیری می‌کنند [۲۸، ۲۷]. با توجه به نتیجه‌های ارایه شده در جدول ۴ نانوذره‌های نقره تهیه شده توسط عصاره برگ گیاه فرولا لاتیسکتا فعالیت ضد میکروبی مناسبی در برابر دو گونه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* از خود نشان دادند که قابل مقایسه با فعالیت ضد میکروبی آنتی بیوتیک‌ها است.

نتیجه‌گیری

عصاره اندام‌های مختلف گیاهان مختلف تا به حال برای تهیه نانوذره‌های نقره استفاده شده اند. در میان اندام برگ و ساقه چهار گونه از گیاهان بومی کشور ایران که در این کار پژوهشی مورد بررسی قرار گرفتند، عصاره برگ گیاه فرولا لاتیسکتا بهترین گزینه برای تهیه نانوذره‌های نقره با استفاده از روش غیر شیمیایی موسوم به روش تهیه سبز به دست آمد. نانوذره‌های نقره تهیه شده با روش تهیه سبز برای استفاده انسانی بسیار ایمن بوده و کنترل شکل و اندازه آنها بسیار آسان تر و دقیق تر از سایر روش‌هاست. ویژگی‌های نانوذره‌های نقره تهیه شده توسط طیف سنجی نور مرئی ـ فرابنفش، میکروسکوپ الکترونی عبوری و طیف سنجی پراش اشعه ایکس بررسی شد. روش تهیه سبز برتری‌هایی مانند به صرفه بودن، سازگاری با محیط زیست، آسان و سریع بودن فرایند انجام واکنش را دارد. با توجه به خاصیت ضد میکروبی نانوذره‌های نقره، از محلول دارای نانوذره‌های نقره برای ضدباکتری، ضد قارچ و ضد ویروس کردن انواع لباس‌ها، موادشوینده و ضد عفونی کردن انواع سطح‌ها استفاده می‌شود. استفاده از پاشش نانوذره‌های نقره در مکان های آلوده باعث کاهش بار آلودگی محیطی شده و موجب مهار گسترش آلودگی می‌شود. نانوذره‌های نقره کمک بسیار مؤثری در پیشگیری و جلوگیری از توسعه عامل‌های بیماری زا در محیط بازی می‌کنند. به همین جهت پژوهش‌های بیشتر در این زمینه بسیار سودمند خواهد بود.

قدردانی

با تشکر از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود برای حمایت از این پروژه و هم چنین تشکر ویژه از پژوهشکده فناوری‌های نوین پزشکی جهاد دانشگاهی ـ ابن سینا برای همکاری صمیمانه و حمایت مالی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۸/۳

مراجع

[1] McNeil S. E., Leukoc J., Nanotechnology for the Biologist, *J Leukoc Biol.*, **78**: 585-594 (2005).

[2] Wang S., Chen T., Chen R., Hu Y., Chen M., Wang, Y., Emodin Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Preparation, Characterization and Antitumor Activity Studies, *International Journal of Pharmaceutics*, ***430*:** 238-246 (2012)

[3] Yamasaki S., Yamada T., Kobayashi H., Kitagawa H., Preparation of Sub-10 nm AgI Nanoparticles and a Study on their Phase Transition Temperature, *Chemistry-An Asian Journal*, **8**: 73-75 (2013).

[۴] ذاکری م.، فصیحی ج.، تولید نانوذرات طلا با استفاده از توده زیستی گندم و بررسی پارامترهای موثر، *نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران*، (۲)**۳۰**، ۳۵ تا ۴۱ (۱۳۹۰).

[5] Hu, J., Cai W., Li Y., Zeng, H., Oxygen-Induced Enhancement of Surface Plasmon Resonance of Silver Nanoparticles for Silver-Coated Soda-Lime Glass, *Journal of Physics: Condensed Matter*, **17**: 5349-5354 (2005).

[6] Choi B., Lee H., Jin S., Chun S., Kim S., Characterization of the Optical Properties of Silver Nanoparticle Films, *Nanotechnology*, **18** : 1-5 (2007).

[7] Lu Y., Spyra P., Mei Y., Ballauff M., Pich A., Composite Hydrogels: Robust Carriers for Catalytic Nanoparticles, *Macromolecular Chemistry and Physics*, **208**: 254-261 (2007).

[8] Song H.Y., Ko K.K., Oh I.H., Lee, B.T., Fabrication of Silver Nanoparticles and Their Antimicrobial Mechanisms, *European cells & Materials*, **11**: 58 (2006).

[9] Homaunfar V., Tohidi S.H., Grigoryan G., Characterization of Sol-Gel Derived Cuo@Sio_2 Nanocatalysts towards Gas Phase Reactions, *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*, **32:** 37-44 (2013).

[10] Maheswari R. U., Prabha A. L., Nandagopalan V., Anburaja V., Green Synthesis of Silver Nanoparticles by Using Rhizome Extract of Dioscorea oppositifolia L. and Their Anti Microbial Activity Against Human Pathogens, *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, **1**: 38-42 (2012).

[11] Shrivastava S., Bera T., Roy A., Singh G., Ramachandrarao P., Dash, D., Characterization of Enhanced Antibacterial Effects of Novel Silver Nanoparticles, *Nanotechnology*. **18:** 1-9 (2007).

[12] Kamali M., Ghorashi S. A. A., Asadollahi M.A., Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles Using Citrate as Complex Agent: Characterization of Nanoparticles and Effect of pH on Size and Crystallinity, *Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering (IJCCE)*, **31**: 21-28 (2012).

[13] Bajpai S.K., Yallapu M.M., Bajpai M., Tankhiwale R., Thomas V., Synthesis of Polymer Stabilized Silver and Gold Banostructures, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **7**: 2994-3010 (2007).

[14] Guari Y., Thieuleux C., Mehdi A., Reye C. R., Corriu J. P., Gomez-Gallardo S., Philippot K., Chaudret B., In Situ Formation of Gold Nanoparticles within Thiol Functionalized HMS-C_{16} and SBA-15 Type Materials via an Organometallic Two-Step Approach, *Chemistry of Materials*, **15**: 2017-2024 (2003).

[15] Mayya K. S., Schoeler B., Caruso F., Preparation and Organization of Nanoscale Polyelectrolyte-Coated Gold Nanoparticles, *Advanced Functional Materials*, **13**: 183-188 (2003).

[16] Ohno K., Koh, K. Tsujii Y., Fukada T., Fabrication of Ordered Arrays of Gold Nanoparticles Coated with High-Density Polymer Brushes, *Angewandte Chemie International Edition*, **42**: 2751-2754 (2003).

[۱۷] غلامی شعبانی م.، ایمانی ا.، رزاقی ابیانه م.، ریاضی غ.، چیانی م.، خادمی س.، چمنی م.، اکبرزاده، ع.، بررسی خواص آنتی باکتریال سطوح دارای پوشش نانو ذرات نقره زیست سنتز شده با قارچ فوزاریوم اگزیسپورومدر مقیاس آزمایشگاهی، *مجله علمی پژوهشی زیست فناوری میکروبی*، دانشگاه آزاد اسلامی، **۳**: ۲۴ (۱۳۹۰).

[18] Zare B., Babaie Sh., Setayesh N., Shahverdi A.R., Isolation and Characterization of a Fungus for Extracellular Synthesis of Small Selenium Nanoparticles, *Journal of Nanomedicine*, **1**: 13-19 (2013).

[19] Shankar S.S., Ahmad A., Sastry, M., Geranium Leaf Assisted Biosynthesis Of Silver Nanopaerticles, *Biotechnology Progress*, **19:** 1627-1631 (2003).

[20] Plyuto Y., Berquier J. M., Jacquiod C., Ricolleau C., Ag nanoparticles Synthesised in Template-Structured Mesoporous Silica Films on a Glass Substrate, *Chemical Communications*, **17**: 1653-1654 (1999).

[21] Tan W.B., Zhang Y., Surface Modification of Gold and Quantum dot Nanoparticles with Chitosan for Bioapplications, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **75**: 56-62 (2005).

[22] Yong Song J., Soo Kim B., Rapid Biological Synthesis Of Silver Nanoparticles Using Plant Leaf Extracts, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **32**: 79-84 (2009).

[23] Tanori J., Pileni M.P., Control of the Shape of Copper Metallic Particles by Using a Colloidal System as Template, *Langmuir*. **13**: 639-646 (1997).

[۲۴] نقش ن.، صفری م.، حاج مهرایی پ.، بررسی اثر نانوذرات نقره بر رشد باکتری اشرشیا کلی، *مجله دانشگاه علوم پزشکی قم*، **۶**، ۶۵ تا ۶۸ (۱۳۹۱).

[25] Lin D. H., Xing B. S., Phytotoxicity of ǂanoparticles: Inhibition of Seed Germination and Root Growth, *Environmental Pollution*, **150**: 243-250 (2007).

[26] Martel S., Method and System for Controlling Micro-Objects or Micro-Particles, United States patent. US 20100215785; Appl. 11/145, 007 (2005).

[27] Jones G.L., Muller C.T., O'Reilly M., Stickler D. J., Effect of Triclosan on the Development of Bacterial Biofilms by Urinary Tract Pathogens on Urinary Catheters, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **57**: 266-272 (2006).

[28] Amanda S., Mohammad F., John J., Schlager D., Syed A., Metal-Based Nanoparticles and Their Toxicity Assessment, *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, **2**: 544-568 (2010).