

ساخت نانو بلورهای مکعبی نقره به روش نانوفیتوستنز و کاربرد آن‌ها در تقویت اثر آنتی بیوتیکی تتراسایکلین

علی رضا شریفی

گروه شیمی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

علی شفققت*⁺

گروه شیمی، واحد خلخال، دانشگاه آزاد اسلامی، خلخال، ایران

چکیده: در این مطالعه، نانوبلورک های مکعبی ذره‌های نقره با روش نانوفیتوستنز و بهره‌گیری از متابولیت‌های ثانویه موجود در عصاره متانولی برگ‌های زالزالک سیاه سنتز شدند. ساختار، خواص و ویژگی‌های نوری نانو ذره‌های تولید شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، پراش پرتو ایکس (XRD)، طیف سنجی زیر قرمز (FT-IR) و فرابنفش/مرئی (UV/Vis) بررسی و مشخصه‌یابی شدند. اثر ضد باکتریایی نانومکعب‌های نقره به دست آمده، به صورت جداگانه و مخلوط با تتراسایکلین در برابر چهار باکتری گرم مثبت و منفی به روش انتشار دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت. نتیجه‌ها نشان می‌دهد که بیش از ۸۰ درصد نانوبلورک‌ها دارای اندازه حدود ۱۵-۳۵ نانومتر و ساختار مکعبی دارند. بررسی زیستی نشان داد که این نانوذره‌های نقره ساخته شده با روش نانوفیتوستنز، تأثیر خوبی در برابر رشد باکتری‌ها دارند و موجب تقویت اثر ضد باکتریایی آنتی بیوتیک تتراسایکلین می‌شود. افزایش قدرت بازدارنده رشد باکتری‌ها توسط این نانوبلورها، با ساختار مکعبی آن‌ها ارتباط دارد. همچنین روش نانوفیتوستنز برای ساخت نانوذره‌ها، یک روش به صرفه، سریع، دوست‌دار طبیعت و سنتز سبز بوده و شرایط بهینه برای تولید نانوذره‌ها فراهم می‌سازد.

واژه‌های کلیدی: نانوفیتوستنز؛ ضد باکتری؛ نانو نقره؛ زالزالک سیاه؛ تتراسایکلین.

KEYWORDS: Nanophytosynthesis; Antibacterial; Nano silver; Black hawthorn; Tetracycline.

مقدمه

روش‌های تولید و سرعت استفاده از نانومواد در شکل‌های گوناگون، بسیار سریع‌گسترش پیدا کرده و در همه جنبه‌های زندگی مانند سامانه‌های الکترونیکی، بهداشت و مبارزه با میکروب‌ها، تشخیص و درمان بیماری‌ها، ساخت وسایل، نساجی، حسگرهای زیستی، کاتالیست‌ها، تصفیه پساب‌ها و... مورد استفاده قرار گرفته است [۲-۴]. یکی از کاربردهای مهم نانوذره‌ها از جمله نانو نقره در امور پزشکی

در سال‌های اخیر موضوع نانو فناوری و کاربرد فراورده‌های نانو ذره در حوزه‌های گوناگون صنایع، گسترش چشم‌گیری یافته است [۱]. گزارش‌های علمی نشان می‌دهد که ویژگی‌ها و فعالیت‌های نانوذره‌ها به اندازه، شکل هندسی و نوع آن‌ها بستگی دارد. هر چه اندازه نانوذره‌های کوچک‌تر باشد، ویژگی‌ها و فعالیت‌های گوناگون و شگفت‌انگیز از خود نشان می‌دهند. به همین دلیل امروزه

*عهدہ دار مکاتبات

+E-mail: Shafaghata@yahoo.com

با توجه به این موضوع و مطالعه‌ها انجام گرفته، نانومواد می‌توانند به عنوان مواد مناسب با حساسیت بالا برای مهار کردن و از بین بردن باکتری‌ها و ویروس‌ها مورد استفاده قرار گیرند [۱۹، ۱۸]. یک ساز و کار برای توضیح فعالیت زیستی نانوذره‌ها و به‌ویژه نانوذره‌های فلزی به این صورت است که آن‌ها به دلیل داشتن بارهای سطحی و نسبت سطح به حجم خود، قادرند با آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و DNA میکروارگانیسم‌ها، یک نوع تعادل الکترونی میان گروه‌ها یا عامل‌های الکترون دهنده مانند گروه‌های کربوکسیلات، تیول، الکل، آمین، آمید، ایمیدازول و اندول برقرار نموده و موجب غیر فعال شدن میکروارگانیسم‌ها می‌شوند [۲۱، ۲۰]. در این پژوهش، با در نظر گرفتن موارد فوق و موضوع مقاوم شدن باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، تهیه نانوذره‌های نقره با روش نانوفیتوستنتز به منظور استفاده از آنها به همراه آنتی‌بیوتیک‌های معمولی و افزایش فعالیت و تقویت فعالیت آن‌ها انجام گرفت. در آینده می‌توان با استفاده از نانوذره‌ها ساخته شده با این روش و اثر هم افزایی آن، در صنایع داروسازی، آرایشی بهداشتی، ندی، حمل و نقل و نگهداری مواد غذایی در زمی‌نه مبارزه با باکتری‌های بیماری‌زا بهره برد.

بخش تجربی

مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها

در این پژوهش، مواد اولیه شامل نقره نیترات $AgNO_3$ و متانول با درجه خلوص بالا از شرکت مرک آلمان، آب دیونیزه از شرکت مجللی و عصاره گیاهی تهیه شده از برگ‌های درخت زالزالک سیاه^(۱)، مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه عصاره از گیاه

برگ‌های سبز درخت زالزالک سیاه با نام علمی *Crataegus melanocarpa*، از منطقه فندقلو شهرستان نمین واقع در استان اردبیل جمع آوری و پس از شستشو با آب سرد، در آون در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. آنگاه برگ‌های خشک شده توسط آسیاب برقی به پودر تبدیل و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا مرحله بعدی آزمایش نگهداری شد. برای عصاره گیری از روش ماسراسیون (خیساندن) استفاده شد. ۱۰۰ گرم از پودر آماده شده را به همراه یک لیتر متانول در یک ارلن مایر ریخته و در حمام آبی ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد.

و مبارزه با میکروبه‌هاست. از زمان‌های گذشته از فلزها و ترکیب‌های آن‌ها در فرآورده‌های دارویی استفاده شده است.

امروزه از نانوذره‌های فلزی و ترکیب‌های آن‌ها در حشره کش‌ها، باکتری کش‌ها، مواد آرایشی - بهداشتی و داروهای گوناگون استفاده می‌شود [۵]. تولید و کاربرد برخی از نانومواد نوین در صنایع داروسازی به عنوان یک روش به طور کامل نوین تلقی می‌شوند. این نانوذره‌ها به علت برخورداری از توانش بالا برای انجام فرایندهای دارویی و درمانی ویژه، در بررسی‌های پزشکی، زیستی و داروسازی دارای اهمیت و کاربرد فراوانی هستند. به عنوان نمونه، برخی از آن‌ها توانایی نابودی ۶۵۰ سلول سرطانی را در مدت کم‌تر از ۴ ساعت دارند [۱۰-۶].

روش نانوفیتوستنتز برای ساخت نانوذره‌ها با استفاده از فرایند کاهش زیستی و استفاده از مواد فعال زیستی گیاهی انجام می‌گیرد. برخلاف روش‌های شیمیایی و فیزیکی، در اینجا نیازی به استفاده از دما و فشار بالا، انرژی زیاد، زمان طولانی، هزینه‌های هنگفت و مواد یا حلال‌های سمی نمی‌باشد [۱۱]. یکی از فاکتورهای مهم در تعیین فعالیت ضد باکتری نانوذره‌های نقره، اندازه آن می‌باشد. نانو ذره‌های نقره با استفاده از عصاره آلوئه ورا با ریخت شناسی کروی در اندازه‌های ۱۵/۵ نانومتر ساخته شده است. در روش بالا، افزودن آمونیاک به واکنش سبب سادگی کاهش یون‌های نقره (Ag^+) در اثر تشکیل کمپلکس محلول می‌شود [۱۲].

بررسی‌ها نشان می‌دهند که نانوذره‌های نقره با دیواره سلولی و اعضای سیتوپلاسمی باکتری/شیریشیا کولای وارد واکنش شده و با ایجاد شکاف و از طریق دریدن دیواره سلولی به درون باکتری نفوذ کرده و موجب نابودی آن‌ها می‌شود [۱۳]. نانوکمپوزیت نقره و تیتانیا سنتز شده با روش نانوفیتوستنتز قادر است به آسانی با تخریب دیواره سلولی *ا. کولای*، آن‌ها را از بین ببرد [۱۴].

به‌طور کلی ویژگی‌های ضد باکتری و ضد ویروسی یون‌ها، ترکیب‌ها و نانوذره‌های نقره قبلاً مورد بررسی قرار گرفته اند و مشخص شده که اندازه و شکل هندسی نانوذره‌ها در قدرت تخریب آن‌ها دخالت دارند [۱۷-۱۵]. باکتری‌های بیماری‌زا و خطرناک مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شیریشیا کولای* از عامل‌های مهم در عفونت‌هاست که بیماری‌هایی مانند عفونت‌های پوستی، دمل، کورک، زرد زخم، آندوکاردیت، مننژیت و آبسه‌های مغزی را به وجود می‌آورند. از مشکل‌های جدی مبارزه با این باکتری‌ها، بحث مقاوم شدن آن‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌هاست.

(1) *Crataegus melanocarpa*

بخش تجربی

سنتر و بررسی نانوذره‌های نقره

برای این منظور، ۵ گرم از عصاره خام آماده شده را در ۱۰۰ میلی لیتر آب یون‌زدایی شده حل نموده و مخلوط را روی یک همزن مغناطیسی قرار می‌دهیم تا به مدت یک ساعت به هم زده شود. هم‌زمان با آن ۱۰۰ میلی لیتر از محلول نقره نیترات نیم مولار تازه آماده شد. محلول آبی عصاره را فیلتر کرده و هر دو محلول باهم مخلوط و بر روی یک همزن مغناطیسی قرار داده شد تا به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق بهم زده شود. پس از گذشت حدود ۵ دقیقه از فرایند بهم زدن، رفته رفته تغییر رنگ دیده می‌شود. این تغییر رنگ نشان دهنده کاهش یون‌های Ag^+ به Ag^0 و تبدیل به نانوذره‌های نقره می‌باشد. پس از گذشت مدت زمان لازم، مخلوط دارای نانوذره‌های نقره با دستگاه سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ در دقیقه و به مدت نیم ساعت، خالص سازی شد. فراورده جمع آوری شده به وسیله اتانول و سپس استون شستشو داده شد و پس از خشک کردن در یک شیشه ساعت، برای آزمایش‌های بعدی مهیا شد. طیف نور مرئی / فرابنفش از مخلوط واکنش در طول موج ۳۰۰-۷۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف سنج نوری پریکین المر - لامبدا ۲۵ تهیه شد. از پودر نانوذره به‌دست آمده در مرحله قبل، برای تهیه تصوی‌رهای میکروسکوپی TEM و SEM و طیف XRD استفاده شد. برای دیدن نانوذره‌ها تشکیل شده، تصویرهای SEM همراه با آنالیز EDX با استفاده از سامانه LEO1430VP تهیه شد. شکل، اندازه و ریخت شناسی نانوذره‌های یاد شده با استفاده از دستگاه TEM با ویژگی‌های Philips GM-30 تعیین شد. برای دیدن ساختار بلوری نانوذره‌های تهیه شده، از دستگاه طیف سنجی XRD (دارای ویژگی‌های BRUKER, B8ADVANCE) با ولتاژ ۴۰ کیلوولت، شدت جریان ۳۰ میلی آمپر و تشعشع $Cu K\alpha$ با $\lambda=1.54\text{\AA}$ استفاده شد. از محلول عصاره، قبل و بعد از فرایند نانوفیتوستتیز، طیف‌های IR با دستگاه طیف سنج زیرقرمز مدل Bruker Tensor27 تهیه شد.

طیف سنجی مرئی - فرابنفش

نخست طیف مرئی - فرابنفش در طول موج ۳۰۰-۷۰۰ نانومتر به‌دست آمد. از سل‌های جنس کوارتز برای نمونه‌ها و آب یون زدایی شده به عنوان رفرنس استفاده شد. کاهش یون‌های Ag^+ به نقره فلزی با استفاده از اندازه‌گیری طیف UV/Vis و تغییر رنگ

مخلوط واکنش مشاهده شد. سیگنال رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) در طول موج ۴۲۰-۴۷۰ نانومتر مشاهده شد که نشانگر طیف نانوذره و تشکیل آن است.

تصویرهای میکروسکوپی SEM و TEM

تصویرهای میکروسکوپی فوق به منظور تعیین شکل و اندازه نانو ذره‌های نقره ساخته شده و چگونگی توزیع آن‌ها تهیه و مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور قطره‌های بسیار کوچک از نمونه دارای نانوذره بر روی کربن پوشیده شده از درجه مسی در شبکه دستگاه به‌صورت فیلم باریکی قرار داده می‌شود. محلول اضافی با استفاده از کاغذ نمگیر برداشته شد و سپس فیلم تشکیل شده در شبکه با استفاده از لامپ جیوه به مدت ۵ دقیقه خشکانده می‌شود.

طیف پراش پرتو X (XRD)

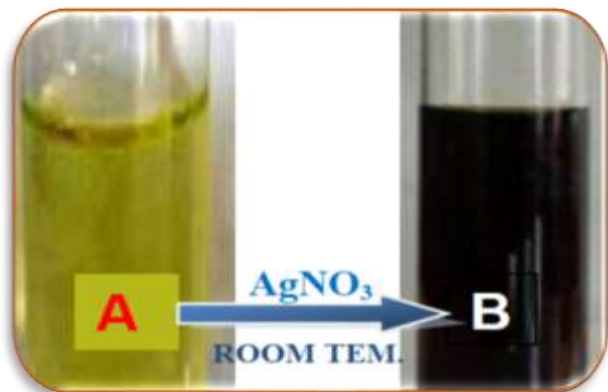
با استفاده از طیف سنجی پراش پرتو ایکس ساختار بلوری نانوذره‌های نقره به‌دست آمده در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت و اندازه این نانوذره‌ها نیز محاسبه شد. نمونه‌های مورد آزمایش با استفاده از سانتریفیوژ چندباره به دست آمده و به صورت پودر درآمد و با استفاده از دستگاه در ولتاژ ۴۰ کیلوولت مورد بررسی قرار گرفت و شدت پراش با زاویه ۲θ و در بازه‌ی ۹۰ - ۱۰ درجه انجام پذیرفت.

طیف سنجی FT-IR

برای شناسایی بیومولکول‌های احتمالی که عهده دار کاهش یون‌های نقره به نانو نقره هستند، از طیف سنجی فروسرخ استفاده شد. این فناوری کمک می‌کند که بتوانیم عامل‌های شیمیایی موجود در عصاره به‌کار رفته در عملیات نانوفیتوستتیز مورد تجزیه و تحلیل بیش‌تر قرار گیرند.

بررسی فعالیت ضد باکتری

ارزیابی ویژگی‌های ضد باکتریایی نانوذره‌های نقره تهیه شده در این پژوهش، با روش تعیین هاله نبود رشد باکتری‌ها در برابر نانوذره و مخلوط آن با آنتی بیوتیک تتراسایکلین در کنار تتراسایکلین خالص به‌عنوان مرجع استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های استاندارد به‌کار رفته، عبارتند از: باکتری‌های *باسیلوس سابتیلیس* (ATCC 9372)، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*



شکل ۱- تغییر رنگ محلول عصاره (A) قبل از واکنش و تولید نانوذرات نقره (B) پس از واکنش

بررسی طیف سنجی مرئی - فرابنفش

طیف مرئی - فرابنفش به دست آمده از نمونه، یک پیک جذب قوی در حوالی ۴۲۰ نانومتر نشان می دهد که مربوط به تولید نانو ذره های نقره است (شکل ۲). باند گسترده پیک جذب گویای پراکندگی زیاد و عدم تجمع نانوذره های نقره می باشد [۲۵]. نانوذره های نقره دارای پیک جذب قوی و ثابت به واسطه رزونانس پلاسمون سطحی قوی در طول موج ۴۵۰ می باشد. این شاهدها به روشنی حکایت از کاهش یون های Ag^+ و تشکیل نانونقره را دارد.

بررسی طیف سنجی FT-IR

طیف سنجی زیر قرمز محلول عصاره گیاهی به صورت خالص (پیش از واکنش، شکل ۳-A) و محلول دارای نانوذره های نقره تولید شده (پس از واکنش؛ شکل ۳-B) در گستره $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ انجام شد. وجود ترکیب های فلاونوئیدی پیش تر در مطالعه های فیتوشیمیایی این گونه گیاهی، بررسی و به اثبات رسیده است [۲۴]. مهمترین باندهای فلاونوئیدی در IR وجود باند پهن در بازه $3450 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه های OH فنولیک و نیز باند مشخص گروه کربونیل و باندهای کششی آروماتیکی می باشد که در شکل ۳-A این باندها قابل دیدن هستند. اما این باندها در شکل ۳-B دیده نمی شوند و یا دچار تغییرهای اساسی شده اند. نتیجه می شود که این عامل ها در واکنش با یون های Ag^+ مشارکت داشته و عامل کاهنده می باشند.

(ATCC 12228)، استافیلوکوکوس آئروس (ATCC25923) و اشریشیا کولای (ATCC 25922) می باشند. برای تعیین فعالیت ضد باکتری نمونه ها ی آزمایشی، دیسک های استریل به قطر ۶ میلی متر که با ۲۰ میکرولیتر از نمونه ها آغشته و اشباع شده بودند، استفاده شد.

این دیسک ها به همراه نمونه شاهد در پلیت هایی که در آن ها سویه های باکتری در محیط مولر- هینتون آگار کشت شده بودند، قرار داده شدند. پلیت های آماده شده در گرم خانه دمای ثابت ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند پس از سپری شدن این مدت، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک، اندازه گیری و با نمونه شاهد (تتراسایکلین) مورد مقایسه قرار گرفت (جدول ۱).

نتیجه ها و بحث

در این کار پژوهشی، عصاره متانولی برگ های درخت زالزالک سیاه با نام علمی *Crataegus melanocarpa* به عنوان عامل کاهنده یون های نقره Ag^+ و در یک فرایند اختصاصی به نام نانوفیتوستر برای ساختن نانونقره به کار رفت. این روش به دو دلیل عمده دارای اهمیت است. یکی اینکه سازگار محیط زیست، ارزان، سریع و ساده بوده در نتیجه از هر نظر مقرون به صرفه است. دلیل مهم دیگر این است که در این فرایند، نانوذره های یکنواختی با بلورهای مکعبی ساخته شدند که از نظر فعالیت زیستی بسیار با ارزش و منحصر به فرد هستند.

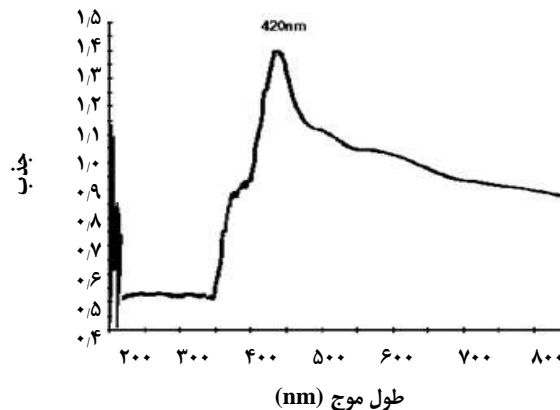
کاهش نقره

ترکیب های موجود در عصاره برگ درخت زالزالک سیاه موجب کاهش یون های نقره و تبدیل به نانوذره های نقره می شوند که این امر با تغییر رنگ محلول به قهوه ای تیره قابل دیدن است (شکل ۱). تشکیل نانوذره های نقره با استفاده از آنالیز طیف مرئی - فرابنفش نیز به اثبات می رسد. به تازگی گزارش های بسیاری در مورد عامل های احیا کننده و پایدارکننده نانوذره های نقره در منابع علمی منتشر شده است. مشتق هایی از ترکیب های فلاونوئیدی، پلی فنولیک، گزانتون، آنتراکینون، لاکتون و کومارین به عنوان مواد مؤثر در احیای نانوذره های فلزی نقش کلیدی دارند که در مورد نانونقره، آن ها با انتقال الکترون به یون های Ag^+ موجب تشکیل نانوذره های نقره می شوند [۲۲-۲۴].

بررسی نتیجه‌های SEM

ریخت شناختی سطح نمونه نانونقره به دست آمده با استفاده از تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی^(۱) (SEM) مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴).

با توجه به تصاویر فوق، ملاحظه می‌شود که نانوذره‌های نقره به صورت نانوبلورک‌های مکعبی با اندازه قطر یکنواخت حدود ۲۰ تا ۶۰ نانومتر توزیع شده‌اند. این شکل نشان می‌دهد که برخی از ذره‌های نانونقره توسط لایه‌های ثانویه پوشانده شده‌اند که این لایه‌ها مربوط به همان ترکیب‌های اولیه موجود در عصاره است که پس از واکنش، می‌تواند به عنوان بستر مناسب، بخشی از سطح نانوذره‌های نقره را پوشانند.



شکل ۲- پیک جذب UV/Vis نانوذره‌های نقره به دست آمده از فرایند نانوفیتوستنز با عصاره زالزالک سیاه.

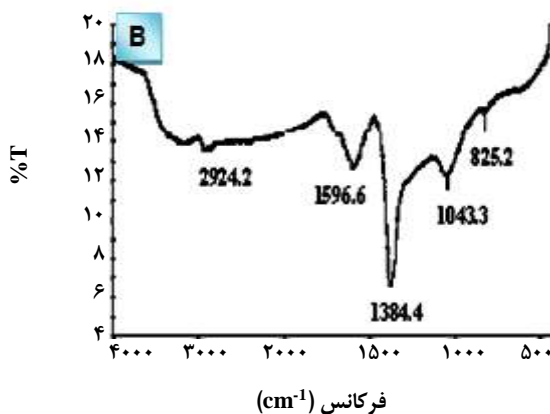
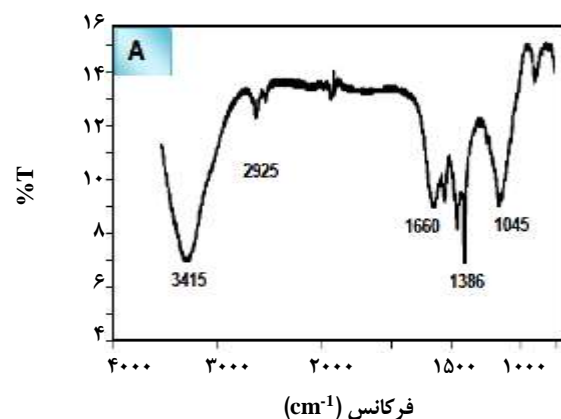
بررسی نتیجه‌های TEM و XRD

به منظور بررسی ساختار نانوذره‌های نقره تهیه شده در شرایط بهینه آزمایش و کسب اطلاعات مفید دیگر در رابطه با ویژگی‌های آن‌ها، از میکروسکوپ الکترونی عبوری^(۲) (TEM) استفاده شد. تصویرهای به دست آمده از این فناوری، در تعیین شکل و اندازه نانوذره‌های نقره به کار رفت. در شکل ۵ نانوذره‌های نقره تولید شده در این پژوهش دیده می‌شود.

همان‌گونه که در تصویر دیده می‌شود و نمودار هیستوگرام استخراج شده از TEM نشان می‌دهد، که ذره‌های نقره در مقیاس نانو بوده که تخمین زده می‌شود بیش از ۸۰ درصد ذره‌ها به طور یکنواخت توزیع شده و همچنین دارای شکل‌های بلوری مکعبی در اندازه‌های ۱۵ تا ۳۵ نانومتر و اندازه متوسط آن‌ها حدود ۲۵ نانومتر می‌باشد (شکل ۵). همچنین تصویر TEM نشان می‌دهد که میان برخی از ذره‌ها مقداری درهم آمیختگی دیده می‌شود که ممکن است دو دلیل داشته باشد. دلیل اول اینکه درصد پائینی از ترکیب موجود در عصاره مورد استفاده قرار گرفته است و علت دوم این که تشکیل دانه‌های دوقلو در مرحله هسته سازی سنتز نانوذره‌ها اتفاق افتاده است.

بررسی تصویر پراش پرتو ایکس^(۳) (XRD)

الگوی پراش اشعه X برای یافتن اندازه‌های دقیق و ساختار بلوری نانوذره‌ها به کار می‌رود. تصویر به دست آمده از نانوذره‌های نقره در شکل ۶ نشان داده شده است. همان‌گونه که در این شکل ملاحظه می‌شود، تعداد ۵ پیک با شدت‌های متفاوت

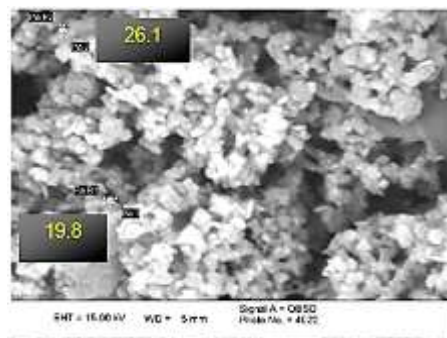
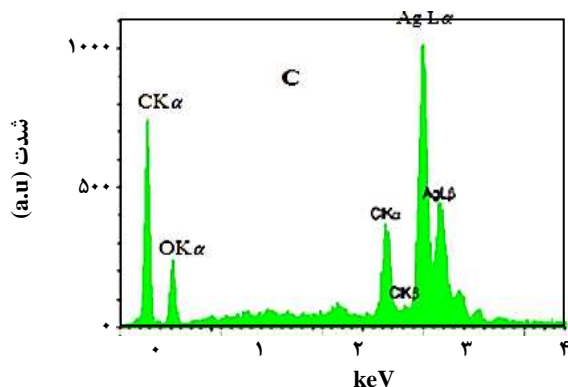


شکل ۳- طیف FT-IR به دست آمده از عصاره برگ درخت زالزالک سیاه (A: پیش از واکنش و B: پس از واکنش با Ag⁺).

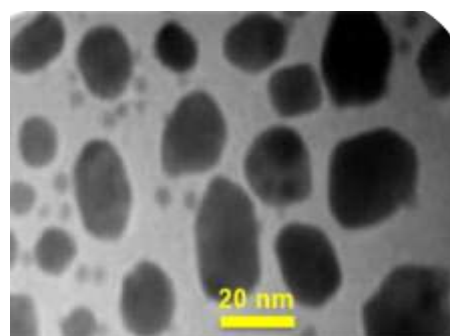
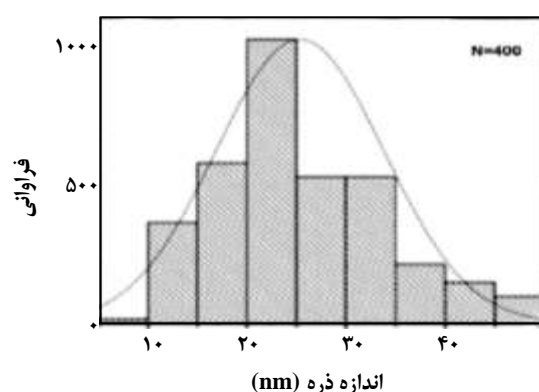
(۱) Scanning Electron Microscope

(۲) Transmission Electron Microscopy

(۳) X-ray Diffraction



شکل ۴- تصویر SEM (راست) و EDX (چپ) مربوط به نانوبلور مکعبی نقره.



شکل ۵- نتیجه‌های میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و تصویر نانوبلورک‌های نقره (راست) و هیستوگرام توزیع اندازه نانوذرات نقره (چپ).

با استفاده از رابطه دبای - شرر (Debye-Scherrer) و پهنای پیک در نصف ارتفاع پیک^(۲) (FWHM)، اندازه ذره‌های نانو نقره محاسبه شد و اندازه تقریبی آن‌ها به دست آمد. برای افزایش در دقت معادله دبای - شرر، محاسبه روی چند پیک به دست آمده در طیف XRD اعمال شد تا میانگینی از اندازه ذره‌ها به طور دقیق‌تر به دست آید.

$$D(\text{nm}) = k \cdot \lambda / \beta \cdot \cos \theta \quad \text{معادله دبای- شرر:}$$

در این معادله D اندازه نانوذره‌ها بر حسب نانومتر، K عدد ثابت برابر 0.9 ؛ λ طول موج پراش پرتو X و برابر با 0.154 نانومتر (برابر با $1/54$ آنگستروم)، β پهنای پیک در نصف ارتفاع بر حسب رادیان و θ زاویه پراش بر حسب درجه می‌باشند. با توجه به اطلاعات بالا و محاسبه‌های انجام شده در زاویه پراش 38° ($2\theta = 38^\circ$) و پهنای حدود نیم درجه، اندازه نانوذره‌های نقره

در مقیاس 2θ به ترتیب برابر 38.28 ؛ 44.38 ؛ 64.52 ؛ 77.61 و 81.31 درجه برای نقره تأیید می‌شود (۲۷). پنج پیک پراش دیده شده بالاتر از 37 درجه در طیف XRD نمونه به ترتیب به بازتاب‌های (111) ، (200) ، (220) ، (311) ، (222) نقره مربوط می‌شوند، که شکل گیری فلز نقره با ساختار مکعب با وجوه مرکز پر^(۱) (fcc) با پارامتر شبکه $4/0.36$ آنگستروم را نشان می‌دهد. از مقایسه شدت پیک‌ها درمی‌یابیم که پیک (111) از پیک‌های دیگر شدیدتر است، در نتیجه صفحه‌های بلورک‌های تشکیل شده، در جهت (111) زیادتر بوده و از اینرو سمت گیری ترجیحی صفحه‌های (111) عمود بر سطح می‌باشد. الگوی پراش در شکل ۶ همچنین نشان می‌دهد که پودر نانونقره به دست آمده از کاهش یون‌های نقره توسط عصاره برگ درخت زالزالک سیاه از خلوص بالایی برخوردار است. این نکته حاکی از شرایط بهینه عملیات تبدیل یون‌های Ag^+ به نانوذره‌های Ag^0 می‌باشد.

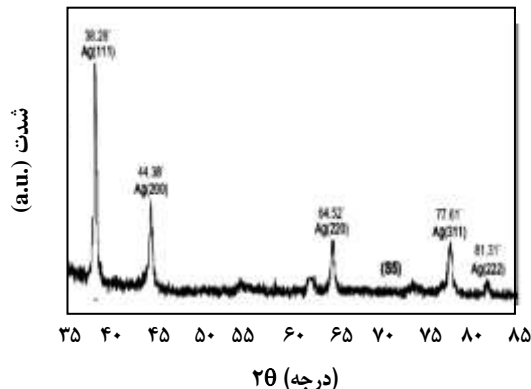
(۱) Face Centered Cubic

(۲) Full Width Half Maximum

نبود رشد ۱۱ میلی‌متر، در برابر نانونقره ۱۴ میلی‌متر و در برابر آنتی بیوتیک تتراسایکلین ۱۸ میلی‌متر ایجاد می‌کند. درحالی که مخلوط نانونقره با آنتی بیوتیک در برابر همان باکتری، به رقم ۲۱ میلی‌متر افزایش یافته است که ۳ واحد نسبت به آنتی بیوتیک و ۷ واحد نسبت به نانونقره تقویت شده است. حساسیت /شیرشیا کولای در برابر نانونقره بیش‌تر از آنتی بیوتیک (به ترتیب ۱۶ و ۱۴ میلی‌متر) بوده و نشان می‌دهد که این باکتری گرم منفی در برابر مخلوط نانونقره و آنتی بیوتیک به میزان ۵ واحد حساس‌تر شده است. در نتیجه تقویت قدرت آنتی بیوتیک تتراسایکلین توسط نانونقره می‌تواند یکی از موارد کاربردهای نوین و مهم نانونقره برای این منظور باشد.

در سال‌های اخیر، اثر نانونقره تولید شده با عصاره گونه‌های قارچ *کریفونکتریا*^(۱) با ابعاد ۳۰-۷۰ نانومتر، به تنهایی و در مخلوط با استریتومایسین بر روی تعدادی باکتری مطالعه شده و اثر تقویتی نانوذره‌های نقره بر آنتی بیوتیک فوق نشان داده شده است (۲۸). با توجه به این نکته که یکی از عامل‌های مؤثر در فعالیت زیستی نانوذره‌ها، اندازه و شکل آن‌هاست، در نتیجه می‌توان گفت که در مقایسه نتیجه‌های کار ما با داده‌های مذکور، اثر هم‌افزایی بیش‌تری در داده‌های ما دیده می‌شود. زیرا بیش از ۸۰ درصد نانوذره‌های تولید شده توسط عصاره برگ زالزالک سیاه، بلورهای مکعبی با متوسط اندازه ۲۰ نانومتر هستند. مطالعه‌ها نشان می‌دهند که اندرکنش‌های زیادی بین نانوذره‌ها و بیومولکول‌های میکروارگانیسم‌ها به وجود می‌آید. وجود اختلاف بار و قطبیت‌های متفاوت میان نانوذره‌ها و بیومولکول‌ها سبب اتصال آن‌ها به یکدیگر و به دنبال آن شروع فعالیت نانوذره در سطح سلول شده و موجب نابودی آن می‌شود.

ایجاد اکسایش در بیومولکول‌های سطح میکروارگانیسم‌ها نیز اتفاق افتاده و سبب نابودی آن‌ها می‌شود. همچنین نانوذره‌های نقره سبب می‌شود که اتصال سلول باکتری و تشکیل فیلم زیستی به کندی انجام گیرد و مانع از تثبیت و تکثیر باکتری‌ها شود. این ترکیب‌ها باعث می‌شوند که اجزای جلوگیری کننده موجود در غشاء خارجی باکتری که باعث آزاد شدن تصاعدی مولکول‌هایی نظیر لیپو پلی ساکاریدها و پورین‌ها از غشای سیتوپلاسمی می‌شود، از هم گسسته شوند (۲۹). پژوهش‌های دیگر نشان می‌دهد که تغییرهای به وجود آمده در ساختار پوسته و دیواره سلول‌های باکتری در واکنش با نانوذره‌های نقره، در نتیجه اندرکنش و



شکل ۶ - طیف پراش پرتو X (XRD) نانو ذره‌های نقره سنتز شده با عصاره برگ زالزالک سیاه.

در حدود ۲۰ نانومتر تعیین شد. این اندازه با مقدار دیده شده در TEM و SEM به طور کامل مطابقت دارد.

نتیجه‌های بررسی خاصیت ضدباکتریایی نانو بلورهای مکعبی نقره

پس از سپری شدن مدت ۲۴ ساعت از نگهداری نمونه‌ها در انکوباتور، تغییرها رخ داده در هر یک از نمونه‌ها ثبت شد. فعالیت ضد باکتریایی نانوذره‌های نقره تهیه شده در مقایسه با تتراسایکلین با روش انتشار دیسک، اندازه گیری قطر هاله نبود رشد اطراف دیسک‌های ۶ میلی‌متری در محیط آگار مولر-هینتون مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). نتیجه‌ها در جدول ۱ نشان می‌دهد که مخلوط ۵۰:۵۰ نانوذره‌های نقره با تتراسایکلین، دارای اثر بازدارندگی بیش‌تری نسبت به نانوذره‌های نقره خالص و نمونه شاهد (تتراسایکلین خالص) در برابر رشد باکتری‌های مورد آزمایش می‌باشند.

نتیجه‌های به دست آمده از فعالیت ضد باکتری مخلوط ۵۰:۵۰ نانونقره و آنتی بیوتیک تتراسایکلین در برابر سویه‌های مورد بررسی، مبین یک نوع اثر سینرژیست مثبت می‌باشد. بدین معنا که نانونقره و آنتی بیوتیک تتراسایکلین در کنار هم، اثر هم‌افزایی و تقویتی در برابر هر چهار مورد باکتری از خود بروز می‌دهند. باکتری /شیرشیا کولای در برابر عصاره خالص، حساسیت خاصی نشان نمی‌دهد. درحالی که در برابر مخلوط آزمایشی، مقاومت نشان نمی‌دهد و قطر هاله عدم رشد آن به نسبت زیاد است (۱۹ میلی‌متر). همان‌گونه که نتیجه‌های آزمایش در جدول ۱ نشان می‌دهد عصاره خالص در برابر *استافیلوکوکوس آئروس* قطر هاله

(۱) Cryphonectria

جدول ۵۱ مقایسه فعالیت ضدباکتریایی نانوذره‌های نقره تهیه شده با تتراسایکلین و مخلوط آن با تتراسایکلین.

قطر هاله عدم رشد باکتری (mm)					
ردیف	باکتریهای بررسی شده	عصاره خالص	نانو ذرات نقره	تترا سایکلین (شاهد)	نانونقره و تتراسایکلین
۱	استافیلوکوکوس آئروس (ATCC ۲۵۹۲۳)	۱۱	۱۴	۱۸	۲۱
۲	باسیلوس سابتیلیس (ATCC ۹۳۷۲)	۱۲	۱۳	۱۶	۱۷
۳	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (ATCC ۱۲۲۲۸)	۱۶	۱۹	۲۲	۲۳
۴	اشریشیاکولای (ATCC۲۵۹۲۲)	-	۱۶	۱۴	۱۹

نانونقره به دست آمده، با UV/Vis، FT-IR، SEM، TEM و XRD مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با هدف دستیابی به نانوذره‌هایی با فعالیت زیستی مناسب و تقویت کننده اثر آنتی بیوتیکی تتراسایکلین را داشته باشد، ارزیابی شد. نتیجه‌ها نشان داد که نانوذره‌های نقره تهیه شده با این روش، بسیار ایمن و به صرفه بوده و کنترل اندازه آن‌ها در اندازه‌های کوچک‌تر و به‌خصوص کنترل شکل نانوذره‌ها بسیار دقیق و کم هزینه‌تر از سایر روش‌ها می‌باشد. نانوذره‌های نقره تولید شده، دارای بلورک‌های مکعبی شکل بودند و با توجه به مکانیسم اثر آن‌ها بر میکروارگانیسم‌ها که ذکر شد، هنگام بکار بردن با آنتی بیوتیک تتراسایکلین موجب تقویت قدرت ضد میکروبی آن می‌شود. این هم افزایی میان سایر نانوذره‌ها با آنتی بیوتیک‌های گوناگون نیز قابل ارزیابی است.

نفوذ نانونقره از پوسته و انباشتگی در درون آن است که موجب نابودی باکتری می‌شود (۳۰). بنابراین می‌توان گفت که نانوبلورهای که دارای ساختار بلوری مکعبی هستند برخلاف شکل کروی، دارای اضلاع و گوشه‌هایی با لبه‌های تیز و برنده می‌باشند که همین موضوع کارایی آن‌ها را افزایش می‌دهد. در نتیجه استفاده از روش سنتز زیستی با استفاده از عصاره گیاهان، برای دستیابی به نانوذره‌های نقره با چنین شکل و ابعادی، از هر نظر با ارزش است. با توجه به نتیجه‌های داده شده در جدول ۱ نانوبلورهای نقره ساخته شده با استفاده از عصاره برگ زالزالک سیاه، به دلیل داشتن ویژگی‌های یگانه از جمله اندازه کوچک و شکل مکعبی دارای فعالیت زیستی مناسبی بوده و اثر آنتی بیوتیکی تتراسایکلین را نیز تقویت می‌نماید.

نتیجه گیری

در این پژوهش، نانوذره‌های نقره با استفاده از روش نانوفیتوسنتز توسط عصاره برگ زالزالک سیاه، سنتز و ویژگی‌های

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۲۸

مراجع

- [1] McNeil S.E., Leukoc J., *Nanotechnology for the Biologist, J. Leukocyte Biolog*, **78**: 585-594 (2005).
- [2] Kumar A., Jakhmola A., *RNA-Mediated Fluorescent Q-Pb Nanoparticles, Langmuir*, **23**: 2915-2918 (2007).
- [3] Aslan K., Geddes C.D., *Metal-Enhanced Fluorescence: An Emerging Tool in Biotechnology, Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**: 55-62 (2005).

- [4] Sosa I.O., Noguez C., Barrera R.G., [Optical Properties of Metal Nanoparticles with Arbitrary Shapes](#), *J. Phys. Chem.*, **107**:6269-6275 (2003).
- [5] Sun Y. G., Mayers B., Herricks T., Xia Y. N., [Polyol Synthesis Of Uniform Silver Nanowires: a Plausible Growth Mechanism and the Supporting Evidence](#), *J.Nano Lett.*, **3**: 955-960 (2003).
- [۶] پایه قدر، محمود؛ ذولفقاری، امیر حسین؛ بررسی اثرهای نانوذره های تیتانیم دی اکسید بر مقدار حفاظت در برابر پرتوهای فرابنفش در کرم‌های ضدآفتاب، *نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران*، **۳۵(۱)**: ۱۱۱ تا ۱۲۴ (۱۳۹۵).
- [۷] کوبکی، یونس؛ امانی، حسین؛ کریمی نژاد، حسن؛ بررسی خاصیت ضد باکتریایی نانوذره های نقره در پلی استایرن‌های انبساطی دیرسوز و استاندارد، *نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران*، **۳۵(۴)**: ۱۶۱ تا ۱۷۴ (۱۳۹۵).
- [8] Te-Hsing W., Yi-Der T., Lie-Hang S., [The Novel Methods For Preparing Antibacterial Fabric Composites Containing Nanomaterial](#), *J. Solid State Phenom.*, **124**: 1241-1244 (2007)
- [9] Hardman R. A., [Toxicological Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physic-Chemical and Environmental Factors](#), *Environ. Health. Perspect.*, **114**: 165-172 (2005).
- [10] Dreher K. L., [Health and Environmental Impact of Nanotechnology: Toxicology Calassessment of Manufactured Nanoparticles](#), *Toxicol. Sci.*, **77**: 3-5 (2004).
- [11] Navaladian S., Viswanathan B., Viswanath R.P., Varadarajan T.K., [Thermal Decomposition as Route for Silver Nanoparticles](#), *Nanoscale Res. Lett.*, **2**: 44- 48 (2007).
- [12] Chandran S.P., Chaudhary M., Pasricha R., Ahmad A., Sastry M., [Synthesis of Gold Nanotriangles and Silver Nanoparticles Using Aloe Vera Plant Extract](#), *Biotechnol. Prog.*, **22**: 577-583 (2006).
- [13] Chamakura K., Perez-Ballesteros R., Luo Z.P., Bashir S., Liu J., [Comparison of Bactericidal Activities of Silver Nanoparticles with Common Chemical Disinfectants](#), *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **84**: 88-96 (2011).
- [14] Medina-Ramirez I., Luo Z.P., Bashir S., Mernaugh R., Liu J.L., [Facile Design and Nanostructural Evaluation of Silver-Modified Titania Used as Disinfectant](#), *Dalton Trans.*, **40**: 1047-1054 (2011).
- [15] Magana S.M., Quintana P., Aguilar D.H., Toledo J.A., Angeles-Chavez C., Cortes M.A., Leon L., Freile-Pelegrin Y., Lopez T., Torres Sanchez R.M., [Antibacterial Activity of Montmorillonites Modified with Silver](#), *J. Mol. Catal. A Chem.*, **281**: 192-199 (2008).
- [16] Nithya R., Ragnathan R., [Synthesis of Silver Nanoparticle Using Pleurotus Sajor Caju and Its Antimicrobial Study](#), *Dig. J. Nanomater. Biostruct.*, **4**: 623-629 (2009).
- [17] Lara H.H., Nunez N.V.A., Turrent L.I., Rodriguez-Padilla C., [Mode of Antiviral Action of Silver Nanoparticles Against HIV-1](#), *J. Nanobiotechnology.*, **8**: 1-10 (2010).

- [18] Barati B., Saadati M., Bahmani M.Kh., [Isolation and Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus Aureus* Type A By Multiplex PCR](#), *Mil. Med. J.*, **8**: 119-128 (2006).
- [19] Fortner J.D., Lyon D.Y., Sayes C.M., Boyd A.M., Falkner J.C., Hotze E.M., [Nanocrystal Formation and Microbial Response](#), *Environ. Sci. Technol.*, **39**: 4307-4316 (2005).
- [20] 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](#), *J. Antimicrob. Chemother.*, **57**: 266-272 (2006).
- [21] Amanda S., Mohammad F., John J., Schlager D., Syed A., [Metal-Based Nanoparticles and Their Toxicity Assessment](#), *J. Nanomed. Nanobiotechnol.*, **2**: 544-568 (2010).
- [22] Akhavan M., Shafaghat A., Salimi F., [Novel Acetylated Chalcone and Biflavonoid Glycosides from *Trigonostadium Brachytaenium* \(Boiss.\) Alava.](#), *Nat. Prod. Res.*, **27**: 2111-17 (2013).
- [23] Akhavan M., Jahangiri S., Shafaghat A., [Studies on The Antioxidant and Antimicrobial Activity and Flavonoid Derivatives from the Fruit of *Trigonostadium brachytaenium* \(Boiss.\) Alava](#), *Indust. crops prod.*, **63**: 114-18 (2015).
- [24] Kasthuri J., Veerapandian S., Rajendiran N., [Biological Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles Using Apiin as Reducing Agent](#), *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **68**: 55-60 (2009).
- [25] Zargar M., Abdul Hamid A., Abu Bakar F., Nor Shamsudin M., Shameli K., Jahanshiri F., Farahani F., [Green Synthesis and Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Using *Vitex negundo* L.](#), *Molecules*, **16**: 6667-6676 (2011).
- [26] Schussler M., Holz J., Fricke U., [Myocardial Effects of Flavonoids from *Crataegus* Species](#), *Arzneimittelforschung*, **45**: 842-845 (1995).
- [27] Shameli K., Bin Ahmad M., Zargar M., Wan Yunus W.M.Z., Rustaiyan A., Ibrahim N.A., [Synthesis of Silver Nanoparticles In Montmorillonite and Their Antibacterial Behavior](#), *Int. J. Nanomed.*, **6**: 581-590 (2011).
- [28] Dar M.A., Ingle A., Rai M., [Enhanced Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Synthesized by *Cryphonectria* Sp. Evaluated Singly and in Combination with Antibiotics](#), *Nanomedicine: Nanotech. Bio. Med.* **9**: 105-110 (2013).
- [29] Martel S., [Method and System for Controlling Micro-Objects or Micro-Particle](#), *United States Patent, USP 20100215785*, Appl. 11/145,007(2005).
- [30] Dibrov P., Dzioba J., Gosink K.K., Hase C.C., [Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag⁺ in *Vibrio Cholerae*](#), *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **46**: 2668-2670 (2002).