Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

Green synthesis of silver nanoparticles using *Plantago lanceolata* seed extract: Characterization and investigation of antibacterial activities

Seyedeh Tahereh Mirmohammadi[1], Samira Eghbali[2], Pouria Mohammadparast-Tabas[1], Masoud Yousefi[3]*

ABSTRACT

Background and Aims: The increase in the incidence of antimicrobial resistance in pathogens has led researchers to identify new and effective antimicrobial agents. Green production of nanoparticles has received attention due to its compatibility with the environment and low cost. The present study sought to characterize and evaluate the antibacterial activities of silver nanoparticles synthesized with *Plantago lanceolata* seed extract.

Materials and Methods: In this study, after the synthesis of silver nanoparticles by chemical and green methods, the characteristics of silver nanoparticles synthesized with the *P. lanceolata* seed extract were evaluated by UV-Vis, DLS, XRD, FT-IR, and TEM methods. Thereafter, the optimal conditions for the synthesis of nanoparticles and the antibacterial activity of the *P. lanceolata* extract, chemical silver nanoparticles, and green silver nanoparticles against standard bacterial strains were investigated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) using the broth microdilution method.

Results: Based on the absorption spectrum of green silver nanoparticles with UV-Vis, the optimal concentration of silver nitrate was 20 mM, the suitable synthesis temperature was 57 °C, and the best reaction time was reported as 30 sec. The results of XRD, FT-IR, and TEM analyses confirmed the synthesis of green silver nanoparticles with oval and spherical morphology with a size of 20-40 nm. The *P. lanceolata* extract and chemical silver nanoparticles had no significant antibacterial effect. Nonetheless, green silver nanoparticles had significant antibacterial activity on the studied bacteria, with the highest antibacterial effect against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* (MIC=125 µg/mL).

Conclusion: As evidenced by the obtained results, *P. lanceolata* seed extract significantly increased the antibacterial activity of silver nanoparticles. This research demonstrated the potential of environmentally friendly silver nanoparticles synthesized in the presence of *P. lanceolata* extract with significant antibacterial effects for various biomedical applications.

Keywords: Antibacterial agents, Biosynthesis, *P. lanceolata*, Silver nanoparticles

Citation: Mirmohammadi ST, Eghbali S, Mohammadparast-Tabas P, Yousefi M. [Green synthesis of silver nanoparticles using Plantago lanceolata seed extract: Characterization and investigation of antibacterial activities]. J Birjand Univ Med Sci. 2024; 31(2): 127-139. [Persian]

DOI 10.61186/JBUMS.31.2.127

Received: March 1, 2024 **Accepted:** May 20, 2024

[1] Student Research Committee, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
[2] Department of Pharmacognosy and Traditional Pharmacy, School of Pharmacy, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
[3] Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Infectious Diseases Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

***Corresponding author:** Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Infectious Diseases Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
Tel: +985632381518 Fax: +98 5632381509 E-mail: Masoud.yousefi@bums.ac.ir

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.2.127]

مقاله اصیل پژوهشی

سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره دانه بارهنگ: ویژگی‌یابی و بررسی اثرات ضدباکتریایی

سیده طاهره میرمحمدی[1]، سمیرا اقبالی[2]، پوریا محمدپرست طبس[1]، مسعود یوسفی[3]*

چکیده

زمینه و هدف: افزایش بروز مقاومت ضدمیکروبی در عوامل پاتوژن محققان را به شناسایی عوامل ضدمیکروبی جدید و اثربخش واداشته است. تولید سبز نانوذرات به علت سازگاری با محیط زیست و کم‌هزینه بودن مورد توجه قرار گرفته است. هدف از مطالعه حاضر، ویژگی‌یابی و ارزیابی اثرات ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ بود.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی پس از سنتز نانوذرات نقره به روش شیمیایی و سبز، ویژگی‌های نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ با روش‌های UV-Vis، DLS، XRD، FT-IR و TEM ارزیابی شد. سپس شرایط بهینه سنتز نانوذرات و فعالیت ضدباکتریایی عصاره بارهنگ، نانوذرات نقره شیمیایی و نانوذرات نقره سبز بر علیه سویه‌های باکتریایی استاندارد با تعیین MIC با استفاده از روش میکرودایلوشن براث بررسی گردید.

یافته‌ها: براساس بررسی طیف جذبی نانوذرات نقره سبز با UV-Vis، غلظت بهینه نیترات نقره ۲۰ mM، دمای مناسب سنتز ۵۷ °C، و بهترین زمان واکنش ۳۰ ثانیه بود. نتایج آنالیزهای XRD، FT-IR و TEM سنتز نانوذرات نقره سبز با مورفولوژی بیضی مانند و کروی با اندازه ۴۰-۲۰ نانومتر را تأیید کردند. عصاره بارهنگ و نانوذرات نقره شیمیایی اثر ضدباکتریایی قابل توجهی نداشتند. با این وجود نانوذرات نقره سبز فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی بر باکتری‌های مورد مطالعه با بیشترین اثر ضدباکتریایی بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوکوس فکالیس با میزان MIC برابر با ۱۲۵ µg/mL داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که عصاره دانه بارهنگ فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره را به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. پژوهش ما پتانسیل استفاده از نانوذرات نقره سازگار با محیط زیست سنتز شده در حضور عصاره دانه بارهنگ با اثرات ضدباکتریایی قابل توجه را برای کاربردهای مختلف زیست پزشکی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: عوامل ضدباکتریایی، بیوسنتز، بارهنگ، نانوذرات نقره

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۳؛ ۳۱(۲): ۱۳۹-۱۲۷.

دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۱ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۳۱

[1] کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[2] گروه فارماکوگنوزی و داروسازی سنتی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[3] گروه میکروبیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

***نویسنده مسئول:** گروه میکروبیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

آدرس: بیرجند- دانشگاه علوم پزشکی بیرجند- دانشکده پزشکی- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی

تلفن: ۰۵۶۳۲۳۸۱۵۱۸ نمابر: ۰۵۶۳۲۳۸۱۵۰۹ پست الکترونیکی: Masoud.yousefi@bums.ac.ir

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.2.127]

مقدمه

امروزه افزایش روزافزون بروز مقاومت به عوامل ضد میکروبی یکی از معضلات سیستم‌های بهداشتی و درمانی محسوب می‌شود (۱). افزایش شیوع پاتوژن‌های مقام به ترکیبات ضدمیکروبی منجر به محدودیت استفاده از این عوامل در درمان عفونت ها می‌گردد؛ به‌طوری که در صورت ادامه این روند و عدم کشف ترکیبات ضدمیکروبی جدید، در سال ۲۰۵۰ هیچ عوامل ضدمیکروبی مؤثری در دسترس نخواهد بود. از این رو، شناسایی و استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی جدید حائز اهمیت می‌باشد (۳، ۲).

نانوتکنولوژی دارویی به عنوان یک رویکرد استراتژیک جهانی مستقیماً به طراحی و توسعه نانوساختارها با خواص تشخیصی و درمانی منحصر به فرد می‌پردازد. در بین نانوذره‌های فلزی مختلف، نانوذره نقره (AgNPs) از مهم‌ترین نانوذره‌ها می‌باشد که نقش مهمی در زمینه‌های مختلف از جمله زیست پزشکی، حسگرهای زیستی، کاتالیزورها، علوم دارویی، نانوتکنولوژی و خصوصاً نانوداروها بازی می‌کند. علاوه بر این، نانوذره فلزی نقره به‌عنوان یک ضدمیکروب از دیرباز مورد توجه بوده است (۵، ۴). یک نگرانی جدی در مورد تولید شیمیایی AgNPs تولید ترکیبات سمی و شیمیایی خطرناک می‌باشد که برای برطرف کردن این مشکل بسیاری از مطالعات به تولید سبز نانوذرات با استفاده از منابع سبز مانند عصاره گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و برخی بیوپلیمرها بدون تولید ترکیبات سمی (توکسیک) روی آورده‌اند (۷، ۶).

از هزاران سال پیش تا به امروز بشر از محصولات طبیعی و گیاهان در درمان برخی بیماری‌ها استفاده نموده است. در ایران به‌علت شرایط آب و هوایی و جغرافیایی منحصر به فرد استفاده از گیاهان دارویی رواج زیادی داشته است؛ اما به‌دلیل توزیع جغرافیایی پراکنده تعداد محدودی از این گیاهان استفاده شده‌اند (۹، ۸). گیاه بارهنگ با نام علمی *Plantago lanceolata* دارای خواص چشمگیری است که از قدیم به‌طور گسترده‌ای در سراسر جهان به عنوان منبع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات نشان داده‌اند که ترکیبات استخراج شده از قسمت‌های مختلف گیاه بارهنگ به‌دلیل وجود ترکیبات فعال زیستی دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدمیکروبی و ترمیم زخم هستند (۱۱، ۱۰).

با توجه به افزایش روزافزون بروز مقاومت‌های ضدمیکروبی و اهمیت استفاده از گیاهان در سنتز سبز نانوذرات نقره به‌عنوان ترکیبات ضدمیکروبی جدید، هدف از مطالعه حاضر تعیین مشخصات و ارزیابی اثرات ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ بود.

روش تحقیق

در این مطالعه آزمایشگاهی پس از مشخصه‌یابی نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ، اثرات ضدباکتریایی آن‌ها بر سویه‌های باکتریایی استاندارد (ATCC[1]) مختلف گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار گرفت.

تهیه عصاره دانه بارهنگ

دانه‌های بارهنگ از اطراف شهر بیرجند (استان خراسان جنوبی) جمع‌آوری و توسط گیاه‌شناس گروه کشاورزی دانشگاه بیرجند مورد تأیید قرار گرفت. به منظور تهیه عصاره متانولی دانه گیاه، ۲۰ گرم از پودر دانه بارهنگ در ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد خیسانده شد. پس از سانتریفیوژ نمودن عصاره به‌دست آمده در ۵۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه، محلول رویی با کاغذ واتمن شماره یک فیلتر گردید. عصاره به‌دست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای آزمایش‌های بعدی ذخیره‌سازی شد.

سنتز نانوذرات نقره و بهینه‌سازی شرایط سنتز

در روش شیمیایی سنتز نانوذرات نقره، ۹ میلی‌گرم $AgNO_3$ در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. پس از آن، محلول سیترات سدیم ۱٪ (۱ میلی‌لیتر) با همزدن مداوم و حفظ دمای اتاق به مخلوط اضافه گردید. تغییر رنگ محلول در عرض یک ساعت از بی‌رنگ به قهوه‌ای نشان‌دهنده تشکیل موفقیت‌آمیز نانوذرات نقره در نظر گرفته شد.

[1] American Type Culture Collection

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.2.127]

سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره دانه بارهنگ و محلول نیترات نقره (AgNO3) انجام شد. بهترین شرایط سنتز نانوذرات نقره در غلظت‌های مختلف نقره (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌مولار)، دماهای مختلف (دمای اتاق، ۵۵ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد) و زمان‌های متفاوت (۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه)، با میزان غلظت ثابت عصاره دانه بارهنگ (۰/۱ گرم عصاره در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر) مورد بررسی قرار گرفت و در هر مرحله میزان جذب نوری در طول موج ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه UV-Vis اندازه‌گیری شد. برای تعیین بهترین غلظت نقره در سنتز سبز، مقادیر ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌مولار از نیترات نقره به‌طور جداگانه در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و بر روی همزن (استیرر) قرار گرفت. سپس عصاره دانه گیاه بارهنگ با میزان pH برابر با ۱۲ به آرامی به محلول حاوی نیترات نقره اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه بر روی دستگاه استیرر قرار گرفت و تغییر رنگ محلول از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای تیره، نشان‌دهنده احیای یون‌های نقره به نانوذرات نقره در نظر گرفته شد. پس از تعیین بهترین غلظت نقره برای سنتز، سنتز نانوذرات با بهترین غلظت در زمان و دمای‌های مختلف انجام شد و نمودارهای جذب نوری با استفاده از دستگاه UV-Vis در شرایط مختلف مورد بررسی قرار گرفت. پس از سنتز سبز نانوذرات نقره در بهترین شرایط، محلول حاصل در دور rpm ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شده و پس از دور ریختن مایع رویی، رسوب حاصل سه مرتبه شستشو داده شده و سپس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک گردید تا تست‌های ویژگی‌یابی بر روی آن‌ها صورت پذیرد.

تعیین خصوصیات نانوذرات نقره

در مطالعه حاضر برای تعیین خصوصیات نانوذرات نقره از دستگاه UV-Visible در طول موج ۵۰۰-۳۰۰ نانومتر استفاده گردید. اندازه‌گیری سایز و پتانسیل زتا نانوذرات با استفاده از دستگاه زتاسایزر دانشگاه علوم پزشکی بیرجند بود. شناسایی گروه‌های عاملی نانوذرات نقره با استفاده از FT-IR، تعیین اندازه و مشاهده ویژگی‌های مورفولوژیکی ترکیبات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM و تعیین قطر هیدرودینامیکی نانوذرات نقره با استفاده از DLS انجام شد.

تعیین اثرات ضد باکتریایی

در این مطالعه برای تعیین حداقل غلظت مهاری رشد (MIC[1]) سه ترکیب عصاره دانه بارهنگ، نانوذرات نقره شیمیایی و نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ بر علیه سویه‌های باکتریایی استاندارد (ATCC) شامل اشریشیاکلای (ATCC 25922)، سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)، کلبسیلا پنومونیه (ATCC 9997)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) و انتروکوکوس فکالیس (ATCC 29212) از روش میکرودایلوشن براث براساس رهنمودهای سازمان استانداردهای آزمایشگاه و بالین (CLSI[2]) استفاده شد (۱۲). به این صورت که در پلیت ۹۶ خانه استریل رقت‌های متوالی دوبرابری از هر یک از ترکیبات مورد بررسی در محیط مولر هینتون براث با حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر تهیه شد. سپس به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با غلظت نهایی CFU/ml ۵×۱۰^{۵} اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت و در درمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. از سوسپانسیون باکتریایی مولر هینتون براث به عنوان کنترل مثبت و از محیط کشت به تنهایی به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. در مطالعه حاضر از آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین نیز به عنوان کنترل استفاده شد.

یافته‌ها

شرایط بهینه سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره بارهنگ

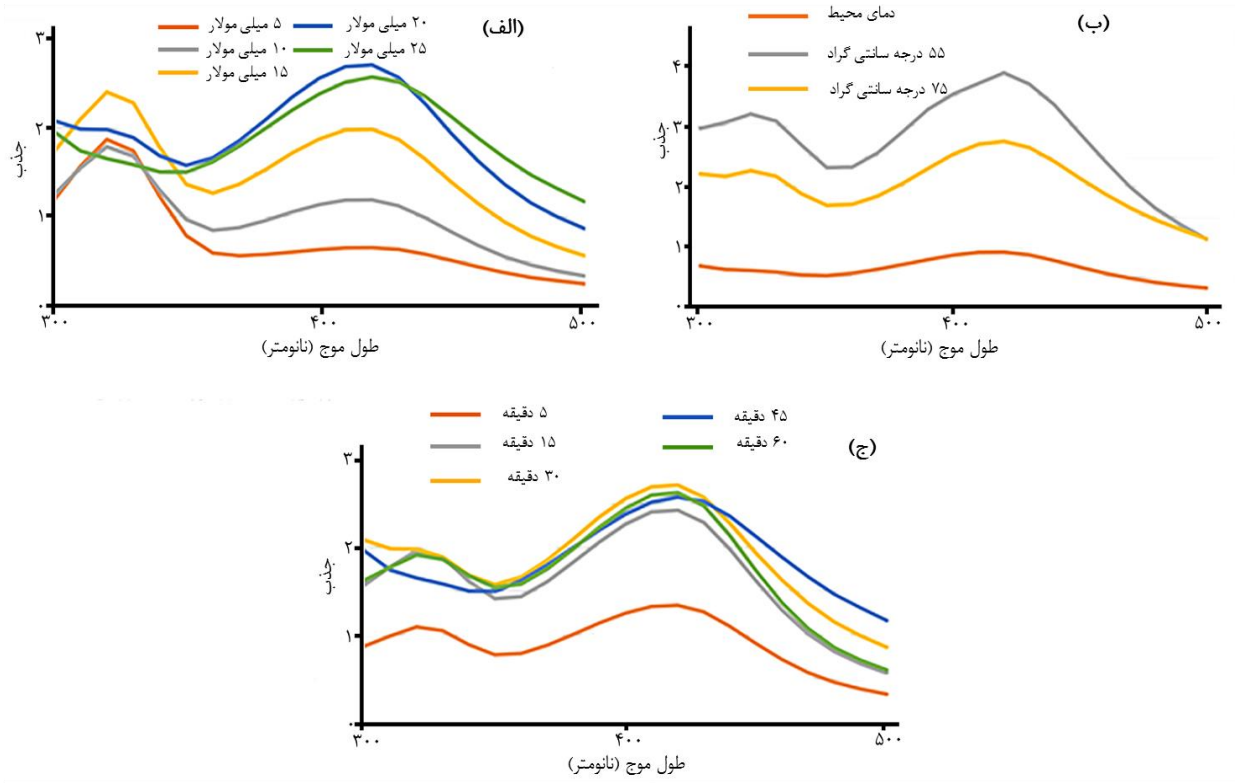
در مطالعه حاضر تأیید تشکیل و تغییر ساختار نانوذرات سنتز شده با استفاده از طیف جذبی UV-VIS بررسی گردید. این طیف جذبی یک روش اولیه برای نشان دادن کاهش زیستی نیترات نقره و تبدیل آن به نانوذرات نقره است، به‌طوری که افزایش میزان جذب نانوذرات نشان‌دهنده افزایش تشکیل نانوذرات و کاهش طول موج

[1] Minimum Inhibitory Concentration
[2] Clinical and Laboratory Standards Institute

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.2.127]

نانوذرات نشان‌دهنده کاهش سایز نانوذرات می‌باشد. نانوذرات نقره به دلیل تشدید پلاسمون سطحی، رنگ قهوه‌ای تیره از خود نشان می‌دهند که نشان دهنده احیای یون‌های نقره به نانوذرات نقره می‌باشد. در این مطالعه پس از اضافه نمودن عصاره دانه گیاه بارهنگ تغییر رنگ سوسپانسیون به قهوه‌ای تیره به‌طور واضحی مشاهده گردید.

برای بررسی بهترین شرایط سنتز نانوذرات نقره، طیف‌های جذبی برای شرایط سنتز با غلظت‌های مختلف از نیترات نقره، زمان‌های متفاوت و دماهای گوناگون با استفاده از دستگاه UV-VIS در ۳۰۰–۵۰۰ نانومتر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بررسی‌های طیف جذبی نانوذرات (تصویر ۱–الف) نشان‌دهنده افزایش شدت نوار جذبی با افزایش غلظت نیترات نقره تا غلظت ۲۰ میلی‌مولار بود؛ اما در غلظت ۲۵ میلی‌مولار به‌دلیل چسبندگی نانوذرات طیف جذبی کاهش یافت. در نتیجه غلظت ۲۰ میلی‌مولار نیترات نقره به‌عنوان بهترین غلظت نقره در نظر گرفته شد. قابل ذکر است که در غلظت ۲۰ میلی‌مولار نقره، طیف جذبی نانوذرات در زمان‌های گوناگون (تصویر ۱–ب) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که با افزایش زمان از ۱۵ دقیقه تا ۳۰ دقیقه شدت جذب نیز افزایش می‌یابد و در مدت زمان ۳۰ دقیقه بیشترین شدت جذب مشاهده گردید که نشان‌دهنده بهینه‌ترین زمان برای انجام این واکنش بود. در نهایت بررسی طیف جذبی نانوذرات در دماهای مختلف نشان داد که با افزایش دما تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد شدت جذب افزایش می‌یابد و همچنین پیک جذبی نیز به سمت طول موج‌های کوتاه تر شیفت پیدا می‌کند که نشان‌دهنده کاهش سایز نانوذرات می‌باشد. در نتیجه دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان بهترین دمای انجام واکنش تعیین گردید (تصویر ۱–ج).

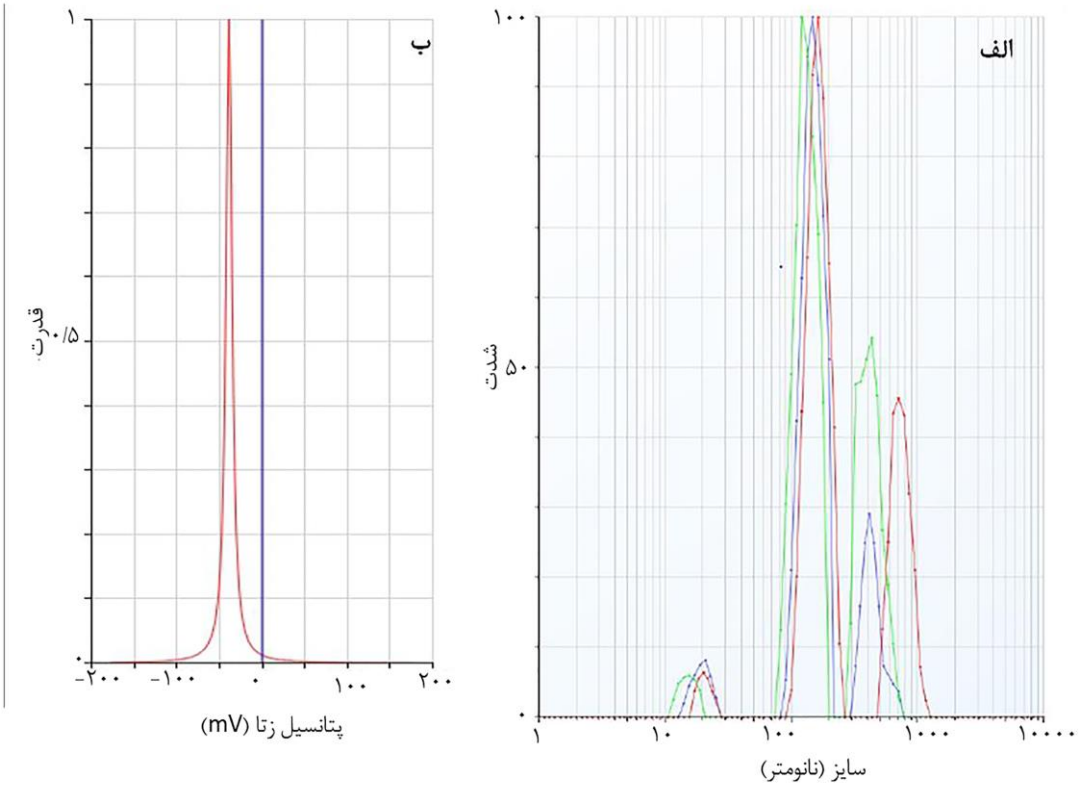


تصویر ۱– طیف UV-Vis نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ در غلظت‌های مختلف نیترات نقره (الف)، در دماهای مختلف (ب) و در بازه زمانی متفاوت (ج).

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.2.127]

آنالیز DLS و پتانسیل زتا

در این مطالعه از آنالیز DLS برای نشان دادن اندازه ذرات (قطرهیدرودینامیکی) و از پتانسیل زتا برای تعیین بار سطحی نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره بارهنگ استفاده گردید (تصویر ۲). نتایج DLS نشان داد که اندازه قطر هیدرودینامیکی نانوذرات نقره حدود ۱۲۰ نانومتر می‌باشد و پتانسیل زتا نانوذرات ۴۱/۴- میلی‌ولت تعیین گردید که نشان‌دهنده بار سطحی منفی در نانوذرات سنتز شده به کمک عصاره بارهنگ می‌باشد.



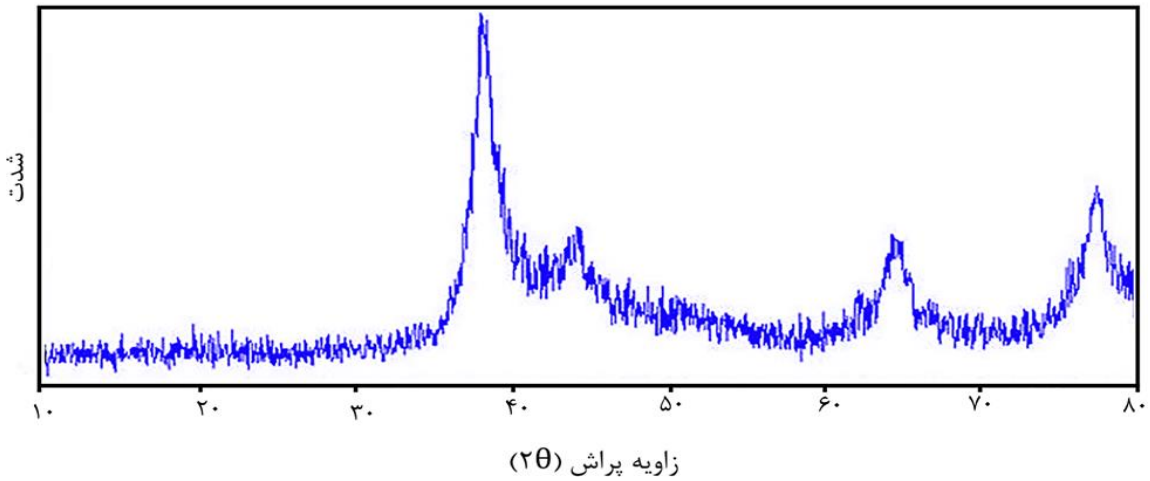
تصویر ۲- آنالیز DLS (الف) و پتانسیل زتا (ب) نانو ذرات نقره سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ

آنالیز XRD نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره بارهنگ

در مطالعه حاضر به منظور تعیین ساختار کریستالی و خلوص نانو ذرات سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ، از آنالیز XRD استفاده شد (تصویر ۳). نتایج XRD پیک‌هایی در زوایای ۳۴/۶، ۴۴/۲، ۶۴/۴، و ۷۷/۸ درجه نشان داد که به ترتیب مربوط به صفحات براگ ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰، و ۳۱۱ بوده و مطابق با پراش استاندارد نقره می‌باشد (JCPDS 01-087-0717). این نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات نقره با عصاره بارهنگ بیوسنتز شده و در طبیعت مکعبی متمرکز شده‌اند. عدم وجود قله اضافی در آنالیز XRD نشان دهنده عدم وجود ناخالصی در نانوذرات سنتز شده می‌باشد. سایز نانوذرات سنتز شده با استفاده از معادله دبای-شرر ($D=n\lambda/\beta\cos\theta$) ۳۰ نانومتر به‌دست آمد که در این معادله، D سایز نانوذرات بر اساس

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.2.127]

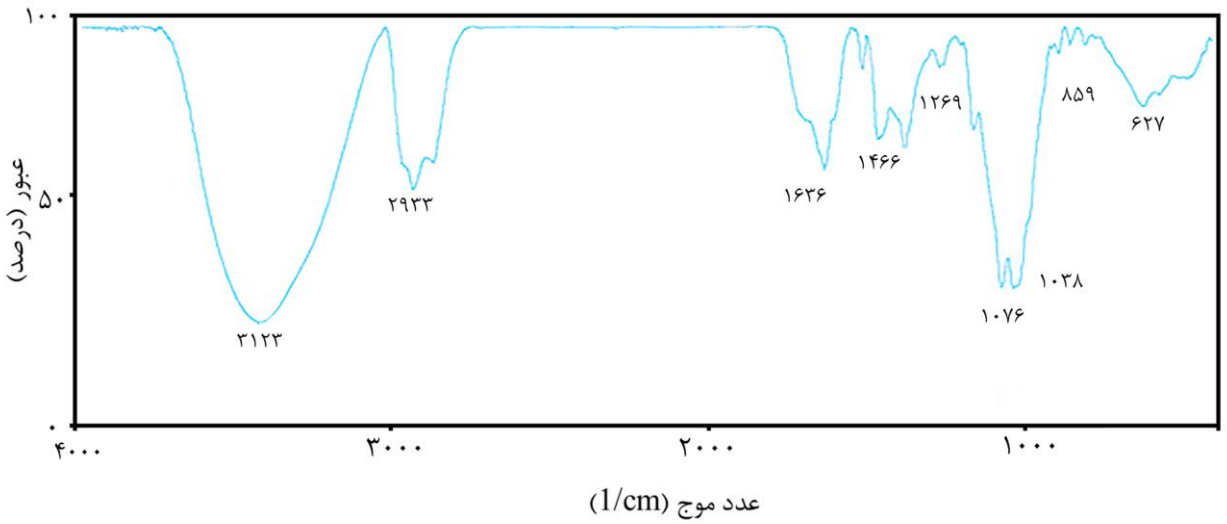
نانومتر، λ طول موج پرتو، β پهنای پیک در نیمه ارتفاع و θ زاویه پراش پرتو ایکس می‌باشد.



تصویر ۳- الگوی XRD مربوط به نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ

آنالیز FTIR نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره بارهنگ

در این مطالعه برای بررسی گروه‌های عاملی موجود در نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گیاه بارهنگ از آنالیز FT-IR استفاده شد (تصویر ۴). طیف FT-IR نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ باندهای جذبی در 3423/03 cm-1، ۲۹۳۵/۳۱، ۱۶۳۶/۸۶، ۱۴۶۶/۵، ۱۳۸۴/۳۶، ۱۰۷۶/۴۴، ۱۰۳۸/۶۳، و ۶۲۷/۹۲ را نشان داد که به ترتیب مربوط به کشش OH، کشش C-H، گروه فنولی، کشش C=O، آروماتیک C-H، C-O، C-O-C، و C-H مربوط به گروه آلکن‌ها می‌باشد.

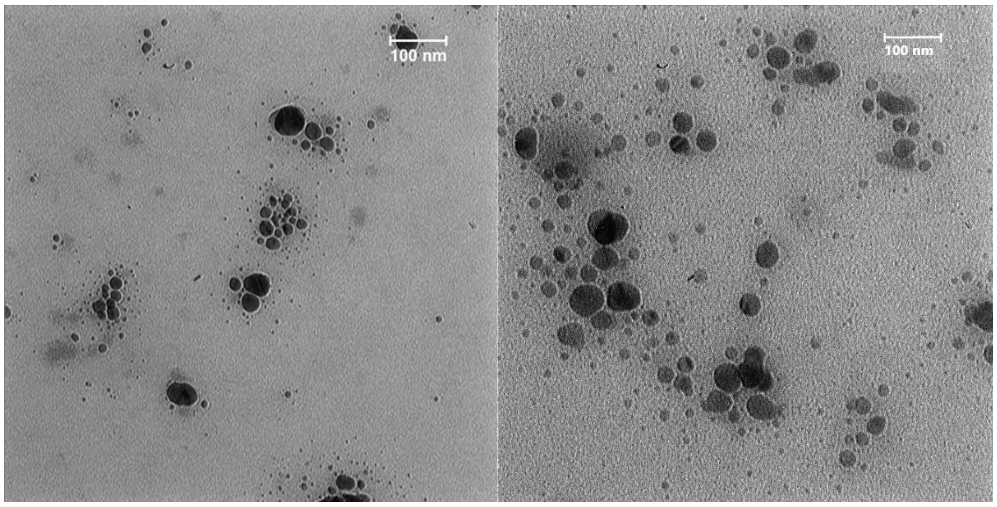


تصویر ٤- الگوی FTIR مربوط به نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.2.127]

آنالیز TEM نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره بارهنگ

در مطالعه حاضر برای بررسی اندازه و مشاهده ویژگی‌های مورفولوژیکی نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ از تصاویر میکروسکوپ الکترونی TEM استفاده شد. این تصاویر به‌طور واضح و دقیق‌تری نشان دهنده شکل کروی و یکنواخت بودن نانوذرات تشکیل شده با عصاره گیاهی بود. بر اساس این تصاویر اندازه نانوذرات سنتز شده در محدوده ۴۰-۲۰ نانومتری گزارش شد (تصویر ۵).



تصویر ۵- تصویر TEM مربوط به نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ

فعالیت ضدباکتریایی ترکیبات مورد بررسی

نتایج فعالیت ضد باکتریایی عصاره دانه بارهنگ، نانوذرات نقره شیمیایی و نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ در این مطالعه در جدول یک نشان داده شده است. نتایج نشان داد که عصاره دانه بارهنگ و نانوذرات نقره شیمیایی اثر ضدباکتریایی قابل توجهی بر علیه باکتری‌های مورد بررسی در این مطالعه ندارند. با این وجود نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره دانه بارهنگ فعالیت باکتریایی قابل توجهی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه داشتند؛ به‌طوری که بیشترین اثرات ضدباکتریایی نانوذرات نقره سبز سنتز شده با عصاره بارهنگ بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 و انتروکوکوس فکالیس ATCC 29212 با میزان MIC برابر با ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. این نتایج نشان دهنده نقش عصاره دانه بارهنگ در افزایش قابل توجه فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره می‌باشد.

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.2.127]

جدول ۱- فعالیت ضدباکتریایی عصاره دانه بارهنگ، نانوذرات نقره شیمیایی و نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ

سویه باکتریایی	میزان حداقل غلظت مهاری رشد (MIC) (µg/ml)			
	عصاره بارهنگ	نانوذرات نقره شیمیایی	نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ	تتراسایکلین
اشریشیاکلای (ATCC 25922)	<۱۵۰۰۰	۱۰۰۰	۲۵۰	۰/۳۱
کلبسیلا پنومونیه (ATCC 9997)	<۱۵۰۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۵
سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)	<۱۵۰۰۰	۱۰۰۰	۲۵۰	۱/۲۵
استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923)	۱۵۰۰۰	۲۰۰۰	۱۲۵	۰/۱۶
انتروکوکوس فکالیس (ATCC 29212)	۱۵۰۰۰	۴۰۰۰	۱۲۵	۵

بحث

افزایش روز افزون بروز مقاومت‌های ضد میکروبی در عوامل پاتوژن و ایجاد هزینه‌های زیاد برای سیستم بهداشتی و درمانی، بسیاری از محققان را بر آن داشته است تا به شناسایی عوامل ضدمیکروبی جدید، اثربخش و کم هزینه بپردازند. این امر موجب توجه دوباره به داروهای ضد میکروبی بر پایه نانوذرات شده است که ممکن است فعالیت ضد میکروبی با طیف وسیع و با احتمال کمتر برای القای مقاومت میکروبی داشته باشند (۱۳). در میان نانوذرات فلزی، نانوذرات نقره یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین نانوذرات هستند که به شکل گسترده در صنایع مختلف دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. فعالیت ضدباکتریایی، بیوسنتز ساده، هزینه کم در حین تولید سریع و اثرات ضدسرطانی نانوذرات نقره، این نانوذرات را به یکی از مهم‌ترین ترکیبات مورد استفاده در بیوسنتز نانوذرات تبدیل کرده است (۵، ۴).

در سنتز سبز نانوذرات توسط گیاهان، گیاه نقش احیاء کننده‌های یون‌های فلزی و همچنین تثبیت کننده این نانوذرات را برعهده دارد. گیاه بارهنگ دارای تعدادی از مواد تشکیل دهنده مؤثر شیمیایی از جمله فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، مشتقات اسید فنولیک، گلیکوزیدها، اسیدهای چرب، پلی‌ساکاریدها و ویتامین‌ها می‌باشد که این ترکیبات در احیای یون‌های فلزی و تبدیل آن‌ها به نانوذرات و همچنین پایدارسازی نانوذرات سنتز شده نقش مهمی دارند (۱۴).

در مطالعه حاضر غلظت ۲۰ میلی‌مولار نیترات نقره به‌عنوان بهترین غلظت برای سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره دانه بارهنگ در نظر گرفته شد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که با افزایش غلظت یون فلز، طیف جذبی مشاهده شده نیز افزایش می‌یابد که این پدیده بدین علت است که با افزایش مقدار یون فلز، یون‌های بیشتری احیاء شده و در نتیجه نانوذرات بیشتری تولید خواهد شد. با این وجود کاهش بیش از حد در میزان طیف جذبی نانوذرات در اثر افزایش بیش از اندازه غلظت یون نقره، می‌تواند به‌دلیل چسبندگی نانوذرات و سنتز نانوذراتی با اندازه بزرگتر باشد (۱۶، ۱۵).

در مطالعه ما در فرآیند سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره دانه بارهنگ در مدت زمان ۳۰ دقیقه بیشترین شدت طیف جذبی مشاهده شد که نشان دهنده بهینه‌ترین مدت زمان برای انجام این واکنش بود. زمان واکنش سنتز نانوذرات به عنوان یک عامل مؤثر در سنتز و پایداری نانوذرات مطرح می‌باشد. به این صورت که اگر واکنش انجام نشده باشد، با گذشت زمان تولید نانوذرات بیشتر خواهد شد. همچنین زمان مهم‌ترین فاکتور برای اثبات پایداری نانوذرات سنتز شده می‌باشد، به این صورت که اگر با گذشت زمان، افزایش

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.2.127]

قابل توجهی در میزان جذب نانوذرات نقره ملاحظه نشود، به این معنا است که نانوذرات حاصل با گذر زمان پایدار بوده‌اند (۱۸، ۱۷).

قابل ذکر است که در مطالعه حاضر، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان بهترین دمای انجام واکنش در سنتز نانوذرات نقره با عصاره دانه بارهنگ تعیین گردید. مطالعات مختلف همچنین تأثیر دما بر میزان جذب و اندازه نانوذرات سنتز شده را نشان داده‌اند (۱۸، ۱۵). افزایش دما احتمال و سرعت برخورد مولکول‌های احیاء کننده و تثبیت کننده با یون‌های فلزی را افزایش می‌دهد به صورتی که بلافاصله پس از عمل احیاء و تثبیت، فرصتی برای اتصال نانوذرات سنتز شده به یکدیگر و تولید نانوذرات با اندازه درشت‌تر وجود نخواهد داشت. در حالی که کاهش در میزان طیف جذبی به دلیل افزایش بیش از حد دما می‌تواند به دلیل تجزیه و یا از بین رفتن تمامی و یا بخشی از ترکیبات احیا کننده و پایدارکننده در عصاره گیاه باشد. مطالعات پیشین نیز تخریب ترکیبات موجود در گیاه در اثر افزایش بیش از حد دما را نشان داده‌اند (۱۹، ۱۸).

در مطالعه ما در طیف FT-IR مربوط به نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره بارهنگ، قله‌های جذبی مشابه قله‌های جذب عصاره گیاه اما با جابجایی و شدت کمتر نسبت به عصاره گیاه مشاهده گردید. نتایج طیف FT-IR مربوط به نانوذرات نشان دهنده مولکول‌های زیستی موجود در عصاره می‌باشد که عامل احیاء یون‌های نقره می‌باشند. این نشان می‌دهد که گروه‌های عاملی موجود در عصاره گیاه در تشکیل نانوذرات نقش دارند (۲۰، ۱۴).

نتایج XRD مربوط به نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره بارهنگ در مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب سنتز شده فاقد ناخالصی بوده و تمامی پیک‌ها مربوط به نقره و مطابق با پراش استاندارد نقره می‌باشد (JCPDS 01-087-0717). این الگوی XRD نشان می‌دهد که نانوذرات نقره‌ای که در اثر کاهش یون‌های نقره با استفاده از عصاره بارهنگ تشکیل می‌شوند، ماهیت کریستالی دارند. نتایج مطالعه حاضر در راستای یافته‌های ارائه شده در سایر مطالعات بوده و عدم وجود قله اضافی در آنالیز XRD نشان دهنده عدم وجود ناخالصی در نانوذرات سنتز شده می باشد (۲۲، ۲۱).

بر اساس نتایج تصاویر TEM، نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره بارهنگ مورفولوژی کروی و بیضوی با میانگین قطر ۴۰-۲۰ نانومتر داشتند. قابل ذکر است که مورفولوژی‌ها و اندازه‌های متنوع مشاهده شده در نانوذرات نقره می‌تواند مربوط به عوامل کاهنده در عصاره گیاه بارهنگ باشد (۲۴، ۲۳). ظهور سایه‌های تیره بر روی سطح نانوذرات نقره در تصاویر TEM نشان دهنده وجود ترکیبات بیولوژیکی از عصاره گیاهی است که بر روی سطح نانوذرات نقره قرار گرفته است (۲۶، ۲۵).

نتایج فعالیت ضدباکتریایی عصاره دانه بارهنگ، نانوذرات نقره شیمیایی و نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره بارهنگ در مطالعه حاضر نشان داد عصاره دانه بارهنگ و نانوذرات نقره شیمیایی اثر ضدباکتریایی قابل توجهی بر علیه باکتری‌های مورد بررسی ندارند. با این وجود نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره دانه بارهنگ فعالیت باکتریایی قابل توجهی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه داشتند؛ به‌طوری که بیشترین اثرات ضدباکتریایی این ترکیبات بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوکوس فکالیس با میزان MIC برابر با ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و پس از آن بر علیه اشرشیاکلای و سودوموناس آئروژینوزا با میزان MIC برابر با ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. این نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره دانه بارهنگ فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی بر علیه هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارند. مطالعات قبلی نیز نتایج مشابهی را برای نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره‌های گیاهی مختلف گزارش کرده اند (۲۸، ۲۷). در مطالعه انجام شده توسط نیک‌آئین و همکاران نانوذرات نقره سنتزشده با استفاده از گونه گیاهی متفاوتی از دانه گیاه بارهنگ (*Plantago .major* L) نسبت به مطالعه حاضر نیز خاصیت ضدباکتری، ضدقارچی و همچنین آنتی‌اکسیدانی بسیار خوبی از این گیاه گزارش شده است (۲۹). از این رو، هنگام در نظر گرفتن اثرات ضدباکتریایی نانوذرات نقره، مهم است که نه تنها تأثیر آن‌ها بر ساختار دیواره سلولی باکتری، بلکه مکانیسم‌های دیگری از جمله تداخل با اهداف داخل سلولی (ریبوزوم‌ها، میتوکندری‌ها و واکوئل‌ها) یا تداخل با عملکرد بیوماکرومولکول‌ها (پروتئین، لیپیدها و DNA)، القای استرس اکسیداتیو و سمیت سلولی از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS[1])، نیز در نظر گرفته شود(۳۰).

[1] Reactive Oxygen Species

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.2.127]

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره دانه گیاه بارهنگ فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره را به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد و همچنین این ترکیب گزینه‌ای مناسب و زیست سازگار برای سنتز نانوذرات نقره محسوب می‌شود. در این مطالعه نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره دانه بارهنگ فعالیت باکتریایی قابل توجهی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی داشتند. پژوهش ما پتانسیل استفاده از نانوذرات نقره سازگار با محیط زیست سنتز شده در حضور عصاره دانه بارهنگ را که دارای اثرات ضد باکتریایی قابل توجهی هستند، برای کاربردهای مختلف زیست پزشکی نشان می‌دهد.

تقدیر و تشکّر

بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بیرجند برای حمایت‌های مالی (کد پایان‌نامه: ۴۵۶۵۷۶) و پرسنل محترم آزمایشگاه جامع تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی بیرجند قدردانی می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر پس از تأیید شورای پژوهشی و کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بیرجند با کد IR.BUMS.REC.1400.284 انجام شد.

حمایت مالی

پژوهش حاضر با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند با کد پایان‌نامه ۴۵۶۵۷۶ به انجام رسید.

مشارکت نویسندگان

سیده طاهره میرمحمدی: نگارش پروپوزال، انجام مطالعات آزمایشگاهی و نگارش اولیه مقاله، سمیرا اقبالی: انجام آزمایشات و تفسیر نتایج، اصلاحات اولیه مقاله، پوریا محمدپرست طبس: انجام مطالعات آزمایشگاهی و اصلاحات اولیه مقاله، مسعود یوسفی: ایده‌پردازی، انجام مطالعات آزمایشگاهی و نگارش و اصلاحات اولیه مقاله. همه نویسندگان نسخه نهایی مقاله را تأیید نمودند.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Levy SB. Antibiotic resistance: consequences of inaction. Clin Infect Dis. 2001; 33(3): S124-S9. DOI: 10.1086/321837
2. Tagliabue A, Rappuoli R. Changing priorities in vaccinology: antibiotic resistance moving to the top. Front Immunol. 2018; 9: 1068. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01068
3. Vivas R, Barbosa AAT, Dolabela SS, Jain S. Multidrug-resistant bacteria and alternative methods to control them: an overview. Microb Drug Resist. 2019; 25(6): 890-908. DOI: 10.1089/mdr.2018.0319
4. Chung I-M, Park I, Seung-Hyun K, Thiruvengadam M, Rajakumar G. Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles: their characteristic properties and therapeutic applications. Nanoscale Res Lett. 2016; 11(1): 40. DOI: 10.1186/s11671-016-1257-4
5. Ho D, Wang C-HK, Chow EK-H. Nanodiamonds: The intersection of nanotechnology, drug development, and personalized medicine. Sci Adv. 2015; 1(7): e1500439. DOI: 10.1126/sciadv.1500439
6. Ying S, Guan Z, Ofoegbu PC, Clubb P, Rico C, He F, et al. Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. Environ Technol Innov. 2022; 26(1): 102336. DOI: 10.1016/j.eti.2022.102336

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.2.127]

7. Osman AI, Zhang Y, Farghali M, Rashwan AK, Eltaweil AS, El-Monaem A, et al. Synthesis of green nanoparticles for energy, biomedical, environmental, agricultural, and food applications: A review. Environ Chem Lett. 2024: 1-47. DOI: 10.1007/s10311-023-01682-3

8. Dordas C. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. Agro Sustai Dev. 2008; 28: 33-46. DOI: 10.1007/978-90-481-2666-8_28

9. Mohammadi T, Pirani A, Vaezi J, Moazzeni H. A contribution to ethnobotany and review of phytochemistry and biological activities of the Iranian local endemic species *Sclerorhachis leptoclada* Rech. f. Ethnobot Res Appl. 2020; 20: 1-18. DOI: 10.32859/era.20.45.1-18

10. Keivani M, Mehregan I, Albach DC. Genetic diversity and population structure of *Plantago major* (Plantaginaceae) in Iran. Iran J Bot. 2020; 26(2): 111-24. DOI: 10.22092/ijb.2020.343166.1287

11. Bahadori MB, Sarikurkcu C, Kocak MS, Calapoglu M, Uren MC, Ceylan O. *Plantago lanceolata* as a source of health-beneficial phytochemicals: Phenolics profile and antioxidant capacity. Food Biosci. 2020; 34: 100536. DOI: 10.1016/j.fbio.2020.100536

12. Wayne PA. CLSI (Clinical and Labboratory Standards Institute): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M10. 2020.

13. Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. Int J Nanomedicine. 2017: 1227-49. DOI: 10.2147/IJN.S121956

14. Hesarinejad MA, Shekarforoush E, Attar FR, Ghaderi S. The dependency of rheological properties of *Plantago lanceolata* seed mucilage as a novel source of hydrocolloid on mono-and di-valent salts. Int J Biol Macromol. 2020; 147: 1278-84. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.093

15. Dwivedi AD, Gopal K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp. 2010; 369(1-3): 27-33. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2010.07.020

16. Mock J, Barbic M, Smith D, Schultz D, Schultz S. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. J Chem Phys. 2002; 116(15): 6755-9. DOI: 10.1063/1.1462610

17. Kumar KP, Paul W, Sharma CP. Green synthesis of gold nanoparticles with *Zingiber officinale* extract: characterization and blood compatibility. Process Biochem. 2011; 46(10): 2007-13. DOI: 10.1016/j.procbio.2011.07.011

18. Liaqat N, Jahan N, Anwar T, Qureshi H. Green synthesized silver nanoparticles: Optimization, characterization, antimicrobial activity, and cytotoxicity study by hemolysis assay. Front Chem. 2022; 10: 952006. DOI: 10.3389/fchem.2022.952006

19. Jiang X, Chen W, Chen C, Xiong S, Yu A. Role of temperature in the growth of silver nanoparticles through a synergetic reduction approach. Nanoscale Res Lett. 2011; 6(1): 32. DOI: 10.1007/s11671-010-9780-1

20. Shah MZ, Guan Z-H, Din AU, Ali A, Rehman AU, Jan K, et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Plantago lanceolata* extract and assessing their antibacterial and antioxidant activities. Sci Rep. 2021; 11(1): 20754. DOI: 10.1038/s41598-021-00296-5

21. Singla S, Jana A, Thakur R, Kumari C, Goyal S, Pradhan J. Green synthesis of silver nanoparticles using *Oxalis griffithii* extract and assessing their antimicrobial activity. OpenNano. 2022; 7: 100047. DOI: 10.1016/j.onano.2022.100047

22. Mortazavi-Derazkola S, Ebrahimzadeh MA, Amiri O, Goli HR, Rafiei A, Kardan M, et al. Facile green synthesis and characterization of *Crataegus microphylla* extract-capped silver nanoparticles (CME@ Ag-NPs) and its potential antibacterial and anticancer activities against AGS and MCF-7 human cancer cells. J Alloys Compd. 2020; 820: 153186. DOI: 10.1016/j.jallcom.2019.153186

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.2.127]

23. Iravani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. Green Chem. 2011; 13(10): 2638-50. DOI: 10.1039/C1GC15386B

24. Patil MP, Kim G–D. Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles. Appl Microbiol Biotechnol. 2017; 101(1): 79-92. DOI: 10.1007/s00253-016-8012-8

25. Es-Haghi A, Taghavizadeh Yazdi ME, Sharifalhoseini M, Baghani M, Yousefi E, Rahdar A, et al. Application of response surface methodology for optimizing the therapeutic activity of ZnO nanoparticles biosynthesized from *Aspergillus niger*. Biomimetics. 2021; 6(2): 34. DOI: 10.3390/biomimetics6020034

26. Zare-Bidaki M, Aramjoo H, Mizwari ZM, Mohammadparast-Tabas P, Javanshir R, Mortazavi-Derazkola S. Cytotoxicity, antifungal, antioxidant, antibacterial and photodegradation potential of silver nanoparticles mediated via *Medicago sativa* extract. Arab J Chem. 2022; 15(3): 103842. DOI: 10.1016/j.arabjc.2022.103842

27. Khalil MM, Ismail EH, El-Baghdady KZ, Mohamed D. Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. Arab J Chem. 2014; 7(6): 1131-9. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.04.007

28. Deljou A, Goudarzi S. Green extracellular synthesis of the silver nanoparticles using thermophilic *Bacillus* sp. AZ1 and its antimicrobial activity against several human pathogenetic bacteria. Iran J Biotechnol. 2016; 14(2): 25-32. DOI: 10.15171/ijb.1259

29. Nikaeen G, Yousefinejad S, Rahmdel S, Samari F, Mahdavinia S. Central composite design for optimizing the biosynthesis of silver nanoparticles using *Plantago major* extract and investigating antibacterial, antifungal and antioxidant activity. Sci Rep. 2020; 10(1): 9642. DOI: 10.1038/s41598-020-66357-3

30. Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. Front Microbiol. 2016; 7: 1831. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01831

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.2.127]