Iranian Journal of Biological Sciences.2023; 18(4):11-29

Orginal Article

Iranian Journal of Biological Sciences

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

Comparison of antimicrobial activity of biosynthesized zinc oxide nanoparticles with *Allium jesdianum* extract and chemically synthesized

Paria Alizadeh Ouri[1], Masoumeh MirNourolahi[2,*], Ramin Mohammadi Alocheh[2]

1. Msc. Graduated, Deparement of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Tehran- Center branch, Tehran, Iran
2.Assistant Professor, Deparement of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Tehran- Center branch, Tehran, Iran

Place of Research: Deparement of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Tehran- Center branch, Tehran, Iran

Article Info

Article History:

Recived 08.26.2024
Revised 10.31.2024
Accepted 11.18.2024
Online 12.30.2024

KeyWords:

Green Synthesis
Zinc Oxide Nanoparticles,
Allium jesdianum Extract,
Streptococcus Iniae
Aeromonas Hydrophila

***Corresponding author:**
E-mail address
p.alizadeh75@gmail.com
Masumeh.Mirnurollahi@iau.ac.ir
ramin.p1363@gmail.

Abstract

Introduction: Green and environmentally friendly synthesis methods to produce nanoparticles due to the use of reagents or natural agents such as essential oils or plant extracts and the selection of non-toxic chemicals significantly reduce the risk of harm to humans and the ecosystem as a whole. Therefore, In this research, the aqueous extract of Allium jesdianum was used as an abrasive and stabilizing agent for the synthesis of titanium dioxide nanoparticles.

Aim: The green synthesis of zinc oxide nanoparticles using the extract of Allium jesdianum and its chemical synthesis with the aim of comparing the antibacterial activity of these nanoparticles against Gram-positive Streptococcus iniiae and Gram-negative Aeromonas hydrophila

Materials and Methods: The Allium jesdianum was collected and confirmed by a botanist. After drying in favorable conditions, the extraction process was carried out. Then, by adding 1 to 5 and 1 to 10 concentrations of leaf extract against 1 mM zinc oxide solution, stable zinc oxide nanoparticles were formed. After the chemical synthesis of nanoparticles, analysis and investigation of biosynthesized nanoparticles by chemical and green synthesizes, to determine the size, morphology and optical properties, structural characteristics with UV-vis devices, X-ray diffraction (XRD), microscope Transmission electron microscopy (TEM), field emission scanning electron microscopy (FESEM), FTIR and Edax were performed. Then, the antibacterial activity of the synthesized nanoparticles and also the plant extract were investigated using disk diffusion, welling and MIC.

Results: The production of zinc oxide nanoparticles in different solutions containing the extract of Allium jesdianum was investigated by recording the color change during the experiment using a spectrophotometer (Vis-Uv) in the range of 700-300 nm. The size and morphology of nanoparticles was determined by TEM, that the shape of the particles is spherical and their size is 115-45 nm. It was also found that biosynthesized zinc oxide nanoparticles had antibacterial activity against Gram-positive *Streptococcus iniae* and Gram-negative *Aeromonas hydrophila.*

Conclusion: The results obtained from the extract alone showed that this plant can have favorable antimicrobial effects, especially on *Streptococcus Iniae*. In comparison of green-synthesized nanoparticles with chemically-synthesized ones, it was found that although chemical nanoparticles had a better effect, the difference in effect was very small, and since the synthesis of green nanoparticles has better environmental effects and certainly has fewer side effects, it can be said that plant-based nanoparticles can be a good substitute for chemical nanoparticles. It is also a candidate to replace antibiotic therapy in the fish farming industry.

Cite this article: Alizadeh Ouri, P., Mirnourolahi, M., Mohammadi Alocheh, R. Comparison of antimicrobial activity of biosynthesized zinc oxide nanoparticles with *Allium jesdianum* extract and chemically synthesized Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(4):11-29

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch Print ISSN: 1735-4226 Online ISSN: 1727-459X
This is an open access article under the: https://creativecommons.org/license/by-nc/4.0/

دانش زیستی ایران . سال۱۴۰۲ . دوره ۱۸ . شماره ۴

مقاله تحقیقی

دانش زیستی ایران

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

مقایسه فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی بیوسنتز شده با عصاره گیاه بن سرخ و سنتز شده شیمیایی

پریا علیزاده عوری[1]، سیده معصومه میرنوراللهی[3*]، رامین محمدی آلوچه[2]

۱ .فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، ایران

۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، ایران

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۳/۰۶/۰۵

بازنگری ۱۴۰۳/۰۸/۱۰

پذیرش ۱۴۰۳/۰۸/۲۸

نمایه ۱۴۰۳/۱۰/۱۰

کلمات کلیدی

سنتز سبز،
نانوذرات اکسید روی،
عصاره برگ گیاه بن سرخ،
استرپتوکوکوس اینیه،
آنرومونواس هیدروفیلا

* **نویسنده مسؤل**

p.alizadeh75@gmail.com

Masumeh.Mirnurollahi@iau.ac.ir

ramin.p1363@gmail.

چکیده

مقدمه: روش های سنتز سبز و سازگار با محیط زیست برای تولید نانوذرات به دلیل استفاده از واکنشگرها یا عوامل طبیعی نظیر اسانس یا عصاره گیاهان و انتخاب مواد شیمیایی غیرسمی، ریسک خطرپذیری برای انسان، هوا و در مجموع اکوسیستم را به طور قابل توجهی کاهش می دهند.

هدف: لذا در این پژوهش، عصاره آبی گیاه بن سرخ به عنوان عامل کاهنده و پایدار کننده جهت سنتز نانوذرات اکسید روی مورد استفاده قرار گرفت. سنتز سبز نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره گیاه بن سرخ و نیز سنتز شیمیایی آن با هدف مقایسه فعالیت ضد باکتریایی این نانوذرات بر علیه باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیه و گرم منفی آنرومونواس هیدروفیلا می باشد.

مواد و روش ها: ابتدا گیاه بن سرخ جمع آوری شد وتوسط متخصص گیاه شناسی تایید گردید. پس از خشک شدن در شرایط مطلوب، فرآیند عصاره گیری صورت پذیرفت. سپس با اضافه کردن غلظت 1 به 5 و 1 به 10 عصاره برگ در برابر محلول اکسید روی ۱ میلی مولار ، نانوذرات پایدار اکسید روی تشکیل گردید. پس از سنتز شیمیایی نانوذرات، آنالیز و بررسی نانوذرات بیوسنتز شده با روش شیمیایی و گیاهی ، جهت تعیین سایز، مورفولوژی و ریخت شناسی، خاصیت اپتیکی، ویژگی های ساختاری به ترتیب با دستگاه های UV-vis، پراش اشعه ایکس(XRD)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی(FESEM)، FTIR و Edax انجام شد. سپس فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات سنتز شده و نیز عصاره گیاهی با استفاده از روش انتشار در دیسک، چاهک گذاری وMIC مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: تولید نانوذرات اکسید روی در محلول های مختلف حاوی عصاره گیاه بن سرخ با ثبت تغییر رنگ در طول آزمایش با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Vis-Uv) در محدوده 300 -700 نانومتر بررسی شد. اندازه و مورفولوژی نانوذرات توسط TEM مشخص گردید که شکل ذرات کروی و اندازه آنها 45-115 نانومتر است. همچنین مشخص گردید که نانوذرات اکسید روی بیوسنتز شده دارای فعالیت ضد باکتریایی برعلیه باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیه و گرم منفی آنرومونواس هیدروفیلابودند

نتیجه گیری: نتایج حاصل از عصاره به تنهایی نشان داد که این گیاه تاثیرات مطلوب ضد میکروبی خصوصا بروی باکتری استرپتوکوکوس اینیه میتواند داشته باشد. در مقایسه نانوذرات سنتز شده گیاهی با سنتز شده ی شیمیایی مشخص شد که نانوذرات شیمیایی اگر چه تاثیر بهتری دادند اما تفاوت اثر بسیار ناچیز بوده و از آنجا که سنتز سبزنانومواد تاثیرات زیست محیطی بهتری داشته و مسلما عوارض کمتری دارد، میتوان گفت که نانوذرات گیاهی میتوانند جایگزین مطلوبی برای نانوذرات شیمیایی باشند. همچنین کاندیدی برای جایگزینی آنتی بیوتیک درمانی در صنعت پرورش ماهی باشد .

شیوه آدرس‌دهی این مقاله : علیزاده عوری، پ.، میرنوراللهی، م.، محمدی آلوچه، ر.، مقایسه فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی بیوسنتز شده با عصاره گیاه بن سرخ و سنتز شده شیمیایی. مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۲ ؛ ۱۸ (٤):۱۱-۲۹

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا **شاپا چاپی:** ۴۲۲۶-۱۷۳۵ **شاپا الکترونیکی:** ۴۵۹X-۲۷۱۷

نویسندگان: © حق مؤلف

مقدمه:

باکتری هـــای عامل عفونت بـــه صورت معمول بـــا آنتی بیوتیک هـــا حذف یـــا درمان می شـــوند (۱). آنتی بیوتیک هـــا مواد ضد میکروبی هســـتند کـــه باکتری هـــا را از راه هـــای مختلف مانند تاثیر بر دیـــواره، تداخـــل در عملکرد آنزیم ها، تاثیـــر بر پروتیئن هـــا و یا تاثیـــر بر DNA و RNA از رشـــد و یا تکثیـــر باکتری ها ممانعت میکنند (۲). مطالعات جدید نشـــان میدهـــد که امروزه باکـــتری ها به تایپ هـــای مختلف آنتی بیوتیک ها مقاوم شـــده اند، در نتیجـــه کارایی این عوامـــل امروزه به شـــکل روز افزونی در حال محدود شـــدن اســـت (۳). به ویژه که باکتری ها امروزه به شکل مهندسی شـــده ای مســـیر های گوناگونی را برای مقابله با آنتـــی بیوتیک هـــا از تغییر هـــدف آنتی بیوتیک هـــا با بیان ژن ها موتاســـیون پیدا کـــرده تا تولید آنزیـــم هایی جهت حذف یا تغییر شـــکل آنزیم و یا گســـتر ش کلی از لایه هـــای مقاوم در اطراف باکتری ماننـــد بیوفیلم که توانایی دسترســـی آنتی بیوتیک بـــه باکتری را محـــدود کند، طراحی کرده انـــد. یکی از علت های این شـــیوع روز افـــزون، افزایش مصرف بی رویـــه و بدون نظارت آنتی بیوتیک ها اســـت (٤،٥).

این افزایـــش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی تمایل به اســـتفاده از مـــواد جایگزیـــن که خاصیت ضد میکروبی داشـــته باشـــند و کمتریـــن مقاومت را بروز دهند را به شـــکل چشـــمگیری افزایش داده اســـت. یکـــی از این مواد که به شـــکل ســـنتی از روزی که بشر به گســـترش بهداشت وسلامت پنداشـــته از آن استفاده کرده اســـت ، اســـتفاده از گیاهان یا ترکیبـــات آنها کـــه خاصیت ضد میکروبـــی داشـــتند بود. گیاهان در سراسر دنیا به شـــکل ســـنتی در بســـیاری از موارد خصوصـــا بیماری های عفونـــی مورد توجه بوده انـــد (٦،٧). گیاهـــان دارویـــی بخاطر مواد موثـــره موجود در ترکیبـــات آنهـــا گزینه های موثـــر و مفیدی برای اســـتفاده به عنـــوان جایگزین آنتی بیوتیـــک ها در مطالعـــات مختلف مورد بررســـی واقع شـــده اند (۸-٦). اگر چه اکثر مطالعات نشـــان می دهد کـــه گیاهـــان دارویی خواص آنتـــی بیوتیکی خوبـــی دارند ولی هنـــوز در مقایســـه با تاثیر وســـیع و عمیق آنتـــی بیوتیک ها از پتانســـیل کمـــتری بر خوردارنـــد (۹). از همیـــن رو پدید آمدن علم نو پدیـــد نانوتکنولوژی دریچه هـــای امیدی را به روی محققـــان باز کـــرد که بتـــوان از خواص ضد میکروبـــی آن جهت حـــذف میکروب هـــای بیماری زا یـــا در صنعت جهـــت افزایش مانـــدگاری مواد غذایی اســـتفاده کرد و شـــاید بتـــوان جایگزین مطلوب تری جهـــت جایگزینی آنتی بیوتیک ها باشـــد. نانوذرات بـــه خصوصا نانـــوذرات فلزی و اکســـید آنها مانند روی، اکســـید روی، تیتانیوم، اکســـید تیتانیـــوم، منیزیم، اکســـید منیزیم و... به علت پایـــداری، و مقاومت و ماندگاری طولانـــی و عوارض جانبی معـــدود به عنـــوان عوامل ضـــد میکروبی بالقوه مورد اســـتفاده قرار می گیرند (۱۰،۱۱).از گذشـــته از فلزات و اکســـید های فلزی جهت از بیـــن بردن میکروارگانیســـم ها اســـتفاده مـــی کردند. فلزات اثـــرات ضد میکروبی خـــود را با تاثیر بر روی روند رشـــد ســـلول ها و تاثیر مســـتقیم بر دیـــواره آن ها اعـــمال می کنند. یکی از مکانیســـم هـــای ضد میکروبی اکســـید های فلـــزی آزاد ســـازی یون های فلزی اســـت که با جذب توســـط ارگانیســـم و تاثیر مســـتقیم بر آنزیـــم ها و یا اســـید نوکلئوئیک باعث تخریب و یا مهار عملکرد طبیعی ســـلول باکتری می شـــوند . مکانیســـم دیگری که اکســـید هـــای فلزی موجب حذف میکروارگانیســـم ها میشـــوند تولیـــد رادیکال های آزاد اکســـیژن(ROS) اســـت که با اثر بـــر دیواره تعـــادل الکترواســـتاتیکی باکتری را بـــر هم زده و یـــا با اثر بر اســـید نوکلئوئیـــک باکتری موجب مهـــار باکتری می شـــود (۱۱). نانوذرات مـــوادی با ابعاد ۱۰۰-۱ نانومتر هســـتند که امـــروزه نه تنهـــا در صنعت بلکه در پزشـــکی نیـــز کاربرد های وســـیعی دارند. بعد از پی بردن به توانایی ســـنتز ســـبز نانومواد با اســـتفاده از عصاره گیاهان، ســـنتز شـــیمیایی نانومواد به علت عدم زیســـت ســـازگاری و یا تاثیرات جانبـــی جذابیت کمتری پیدا کـــرد (۱۲،۱۳). در این بین اکســـید روی یکی از نانـــوذرات فلزی اســـت که در صنعت کاربـــرد فراوانی دارد همچنیـــن مطالعات اخیر نشـــان می دهـــد که ایـــن نانوذره مـــی توانـــد در علوم پزشـــکی خصوصـــا در جلوگیری از گســـترش عفونـــت ها نقش موثری داشـــته باشـــد. علاوه بـــر این مطالعات صـــورت گرفته بر روی نانوذرات ســـنتز شـــده به شـــکل ســـبز نتایج ارزشمندی را بـــر روی باکتری هـــای بیماری زا گـــرم منفی و گرم مثبت نشـــان داد کـــه توجـــه محققـــان را به خود بیشـــتر از قبـــل جلب کرد. در ســـنتز ســـبز گیاهان به عنوان عوامل کاهنـــده، تثبیت کننده و پوشـــاننده عمـــل مـــی کننـــد (۱٤،۱۵). هم چنـــین گیاهان به علـــت فـــراواني و عدم نياز بـــه شرايط و مواد غذايـــي خاص براي رشـــد، گزينه اي مناســـب براي توليد نانوذرات به روش زيســـتي محســـوب مي شـــوند. كاردا و همكارانش اولين بار در سال ۲۰۰۲، نانـــوذرات طلا را از عصـــاره گياه يونجه در محيط غني از ســـنتز كردنـــد. تاكنون توليد زيســـتي نانوذرات نقره به وســـيله گياهان ماننـــد Azadirachta indica ، Acalypha،Piper Longum و

Ocimum Sanctum، Catharanthus Roseus بسیاري دیگر از گیاهـــان انجام گرفته اســـت (١٦). گیاه بن سرخ یـــا مریم نخودی با نام علمـــی Allium jesdianum متعلق به خانواده سوســـنیان (Liliaceae) ، ســـالیان قبل بـــه عنوان یک گیاه دارویي شـــناخته شـــده و کاربردهای بســـیاری از آن کشـــف شـــده، به طوری که مـــصرف دارویـــي آن را به زمـــان بقراط و جالینـــوس تخمین مي زننـــد و به عنوان معـــرق، مقوی، ضد درد، ضد تب و پي اشـــتهایي مورد اســـتفاده قرار میگرفت امـــا امروزه با پیشرفـــت علم دیگر خـــواص آن از جمله ضد اسپاســـم، ضد التهاب، ضد فشـــار خون، کاهـــش قنـــد، ضد سرطـــاني، ضد میکـــروبي و ضد اکســـایشي آن آشـــکار گردید (١٧).

بررســـی های فیتوشـــیمیایی صورت گرفته بر روی گیاه بن سرخه منجر به استخراج و شناســـایی ترکیبات مختلفی همچون آلفاپینن، بتاپینن، ســـابینن، لیمونن، بتـــا کاریوفیلن، بی ســـایکلوجرماکرن، جرماکـــرن دی و ترکیبات متعدد دیگری شـــده اســـت که خواص ضـــد باکـــتری آن را توجه می کنـــد و همچنین مـــی تواند گزینه مناســـبی برای تولید نانـــوذرات در نظر گرفته شـــود (١٨). ماهي ها بـــه علت قـــرار گرفتن در رده هـــاي پایین تکاملي نســـبت به ســـایر مهـــره داران داراي سیســـتم ایمني ابتدایي تري نســـبت به حیوانـــات خونگرم اســـت. در ماهي ها سیســـتم ایمني اختصاصي تکامـــل کمـــي یافته و سیســـتم ایمني غـــیر اختصاصي بســـیاري از وظایـــف آن را بـــه عهـــده دارد یکی از مهمتریـــن بیماری های عفونـــی شـــایع در اکثر مزارع پـــروش قزل آلای رنگیـــن کمان در ســـال های اخیر در کشـــور های دنیا درگیری با استرپتوکوکوزیس به علـــت باکتری اســـترپتوکوکوس اینیـــه بوده اســـت. مطالعات زیـــادی در خصوص بیماری زایی، شناســـایی و جداســـازی بیماری از مـــزارع تکثیر و پرورش قزل آلا کشـــور صورت گرفته اســـت که بیانگر گســـترش بیماری در مزارع قزل آلای کشـــور بوده و تاکنون موجب خســـارات زیادی بر این صنعت شده اســـت (١٩). باکتری دیگر که در صنعـــت آبزی پروری و پـــرورش ماهی اهمیت ویژه ای دارد باکـــتری آئروموناس هیدروفیلا اســـت. طبـــق گزارش های موجـــود، این باکـــتری در انواع ماهیـــان مانند کپـــور، مارماهی، گربـــه ماهی، میگو، لابســـتر، تیلاپیـــا و قـــزل آلای رنگین کمان و ماهیـــان خاویاری باعـــث ظهور علائم بیماری زایـــی و تلفات می شـــود. از علائم آلوده شـــدن آبزی بـــه این باکتری ایجاد ســـپتی ســـمی هموراژیـــک، زخم خونریـــزی و بیرون زدگی چشـــم ها اســـت که نهایتـــاً منجر به مـــرگ آبزی می شـــود (٢٠). همچنین علاوه بـــر زیان های اقتصادی گســـترش بیماری هـــای زئونوز نیز یکی از نگرانی های پژوهشـــگران این عرصه اســـت که به شـــکل روز افزون رو به افزایش اســـت. همچنین می دانیم که اســـتفاده از آنتی بیوتیـــک در صنعت دام پروری و پـــرورش ماهی به علت افزایش شـــیوع و گســـترش مقاومت دارویی ایـــن نگرانی ها را دو چندان کرده اســـت که محققـــان را برانگیخته در پـــی یافتن مواد جایگزیـــن دارویـــی به جـــای آنتی بیوتیـــک ها باشـــند که هم توان کنترل عفونت را داشـــته باشـــد هم صنعـــت را از زیان های وارده حفـــظ کند و هم ایجـــاد مقامت دارویی ننمایـــد (٢١). با توجه به کاربرد گسترده نانوذرات اکسید روی در علـــوم و صنایع مختلـــف و اهمیـــت سنتز زیســـتی نـــانو ذرات وهمچنین رویش گیاه بن سرخ در این مطالعه سنتززیســـتی نـــانوذرات اکسید روی با اســـتفاده از عصاره این گیاه و فعالیـــت ضدباکتریایی آن بر روی باکتری گرم مثبت اســـترپتوکوکوس اینیـــه (*Streptococcus iniae*) و گرم منفـــی آئروموناس هیدروفیـــلا (*Aeromonas hydrophila*) مورد بررســـی قرار گرفت.

مواد و روش ها

تهیه عصاره

گیاه بـــن سرخ از ارتفاعـــات کوه های کردســـتان ایران جمع آوری و بعـــد از تعیین جنس و گونه آن، توســـط کارشـــناس گیاه شناســـی تایید شـــد. عصاره به روش خیساندن به دست آمد. به ایـــن صورت که بـــرای تهیه عصـــاره ی متانولی١٠٠ میلـــی گرم از پـــودر را با ٤٠٠ میلی لیـــتر از متانول ٨٠ درصد مخلوط گردید، بعد از ٤ روز در دمای اتاق و هم زدن در بعضـــی از مواقـــع، بـــا کاغذ واتمن شـــماره یك صاف شـــده و بـــرای تبخیر متانـــول در انکوباتور ٣٧ درجه ســـانتی گراد قـــرارداده شـــد. ســـپس عصاره ی خشـــک بـــا DMSO ١٠ درصـــد به مقـــدار یک گرم عصـــاره با ٤ میلی لیـــتر از حلال حل شـــد (٢١،٢٢).

سنتز سبز نانوذره اکسید روی

عصاره گیاه مورد نظر با ۵۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و روي مخلوط کن قرارداده شد. سپس نتیرات روی به مقدار ۷.۳۱ گرم به محلول اضافه شد و سپس با استفاده از هیدروکسید سدیم pH محلول به ۱۰ رسانیده شد. محلول توسط مایکروویو به مدت ۱۰ دقیقه پرتو دهی شد. سوسپانسیون تهیه شده به مدت ۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. نانوذرات تهیه شده، با دماي ۶۰ درجه سانتیگراد در آون خشک و در مرحله آخر جهت آنالیزهای فیزیکی و شیمیایی و خواص ضد باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت (۲۳). جهت مشاهده تغییرات رنگ بروي میزان جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Vis-Uv) در محدوده ۷۰۰- ۳۰۰ نانومتر بررسي شد.

سنتز شیمیایی نانوذره اکسید روی

پیش ماده رسوب های اکسید روی به دست آمده از رسوب مستقیم توسط واکنش نیترات روی و کربنات آمونیوم در محلول آبی سنتز گردید.

تعیین اندازه و مورفولوژي نانو ذرات

نانوذرات اکسید روی سنتز شده از عصاره گیاه بن سرخه جهت تعیین اندازه، خواص ساختاري، خواص اپتیکي، مورفولوژي و ریخت شناسي با دستگاه‌هاي UV-vis، پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکتروني روبشي میدان گسیلي (FESEM) و میکروسکوپ الکتروني عبوري ،(TEM FTIR و Edax) مورد آنالیز و بررسي قرار گرفتند.

بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات اکسید روی

فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید روی سنتز شده بر علیه دو گونه استاندارد مهم بیماری زای انسانی شامل (RTCC۱۸۹۰) *Aeromonas hydrophila* و (PTCC۱۸۸۷) *Streptococcus iniae* که از مرکزکلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی تهیه شده بود مورد ارزیابی قرار گرفت.

آماده سازی باکتری ها

هر سویه خالص باکتری در محیط کشت (TSB) کشت و به مدت ۲٤ ساعت به صورت هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. نهایتا برای استفاده به غلظت نیم مک فارلند(CFU/mL ^{۷} ۱۰) رسید که این امر به وسیله استفاده از دستگاه کدورت سنجی در ٦۳۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر(china,MB۵۸۰) تنظیم شد.

بررسی حداقل غلظت بازدارندگی عصاره گیاه با روش رقت در لوله

کمترین غلظت یک عامل ضد میکروبی که می تواند رشد میکروبی را پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون مهار کند، به عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC) شناخته می شود. به منظور ارزیابی کارایی عصاره و بدست آوردن MIC، ۱۰ گرم از عصاره بن سرخه با ۹,۵ میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون براث و ۰,۵ میلی لیتر دیمتیل سولفواکسید (DMSO) مخلوط شده و غلظت ۱ گرم بر میلی لیتر ساخته شد. از این غلظت برای تکنیک MIC استفاده شد، به این صورت که به ۱۱ لوله استریل مقدار ۱ میلی لیتر محیط کشت مولرهینتون براث و lμ ۱۰۰ از کشت تازه باکتریایی با غلظت CFU/ml ^{۸} ۱۰* ۱/۵ اضافه شد . سپس ۱ میلی لیتر از استوك اولیه ساخته شده عصاره با رقت mg/ml ۱۰۰۰ را به لوله اول افزوده و رقت های سریالی mg/ml ۱۰۲٤، ۵۱۲ ، ۲۵٦ ، ٦٤،۱۲۸ ، ۳۲ ، ۱٦ ، ۸ ، ٤ تهیه گردید. دو لوله حاوی کنترل مثبت و منفی نیز تهیه گردید. نهایتا لوله ها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت انکوبه گردید. این روش برای هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار شد.

بررسی حداقل غلظت کشندگی عصاره گیاه

به طور خلاصه، ۱ میلی لیتر از لوله MIC و دو رقت قبل ازآن در پلیت های نوترینت آگار تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شد. عدم تشکیل کلونی در پلیت ها نشان دهنده MBC بود (۲٤).

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذره سنتز شده گیاهی و شیمیایی به روش رقت در لوله

به منظور ارزیابی کارایی نانوذره و بدست آوردن MIC، در لوله های آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محیط کشت

مولرهینتون براث، سری رقت های ۱۰۲٤، ۵۱۲ ، ۲۵٦ ، ٦٤،۱۲۸، ۳۲ ، ۱٦ ، ۸ ، ٤ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوذرات تهیه شده به روش شیمیایی و گیاهی بطور جداگانه آماده شد. سپس به هر لوله ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده تلقیح گردید. لوله آزمایشی حاوی محیط کشت و باکتری تلقیح شده و بدون نانوذره به عنوان شاهد مثبت و یک لوله حاوی محیط کشت و نانوذره ولی بدون باکتری به عنوان کنترل منفی نیز تهیه شد. نهایتا لوله ها در ۳۷ درجه به مدت ۲٤ ساعت انکوبه گردید. پس از انکوباسیون، هر لوله از نظر کدورت حاصل از رشد میکروارگانیسم بررسی و کمترین رقتی که در آن به علت اثر مهار کنندگی نانوذره، کدورتی ایجاد نشده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد.۲۵ این تست براي هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار شد.

بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات به روش انتشار در چاهک

غلظت های مختلف ۱۰۰۰ ، ۵۰۰ ، ۲۵۰ ، ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از اکسید روی سنتز شده به روش سبز، آماده گردید. از سوسپانسیون باکتریایی استاندارد کدورت معادل نیم مک فارلند در سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید. هر دو باکتری مورد آزمایش به روش کشت یکنواخت بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند. سپس چاهک هایی به قطر ٦ میلی متر در محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه شد و ۲۰ میکرولیتر از هر غلظت نانوذره به صورت جداگانه در هر چاهک ریخته شد و برای هر باکتری جداگانه بررسی گردید. پلیت ها به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شدند. قطر ناحیه مهار رشد باکتری بر حسب میلی متر اندازه گیری و ثبت شد. آزمایش در سه تکرار انجام شد. از دیسک آنتی بیوتیک استاندارد سیپروفلوکساسین به عنوان کنترل استفاده شد و پس از زمان گرماگذاری، هاله عدم رشد بررسی و قطر هاله با کولیس اندازه گیری گردید (۲۵).

بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات به روش انتشار در دیسک

تهیه سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی استریل از کشت ۲٤ ساعته انجام شد که حاوی 10^8 CFU/ml × ۱,۵ باکتری در هر میلی لیتر معادل ۰,۵ مک فارلند بود. سپس از نانوذره سنتز شده در سه رقت ۸۰، ٤۰، ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد و به هر دیسک به مقدار ۲۰ میکرولیتر اضافه گردید و ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد خشک شد. درون پلیت های استریل، به مقدار کافی محیط کشت مولر هینتون آگار ریخته شد و پس از سفت شدن، مقدار میلی لیتر ۱ از سوسپانسون میکروبی کشت یک شبه به آن اضافه شد. سپس دیسک های تهیه شده در فاصله های مناسب روی پلیت قرار داده شد و پلیت ها برای مدت زمان ۲٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. از دیسک آنتی بیوتیک استاندارد سیپروفلوکساسین به عنوان کنترل استفاده شد و پس از زمان گرماگذاری، هاله عدم رشد بررسی و قطر هاله با کولیس اندازه گیری گردید (۲٦).

نتایج

اندازه گیری جذب نانوذرات سنتز شده شیمیایی و گیاهی با استفاده UV

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود با استفاده از طیف سنجی UV-VIS دو قله جذبی برای نانوذره اکسید روی به دست آمده است . حداکثر طول موج جذبی در ۳۷۵ نانومتر بدست آمده است همچنین محاسبه ی باند گپ نانوذرات طبق فرمول داده ها توسط نرم افزار Origin pro انجام و عدد ۵,۹ الکترون ولت برای نانوذره شیمیایی را نشان می دهد از مقدار باند گپ می توان به این نتیجه رسید که بیشتر ذرات دارای اندازه ای از مرتبه ی نانوهستند. در رابطه با نانوذر ی سنتز شده به وسیله ی عصاره گیاهی حداکثر طول موج جذبی ۳٥٤ نانومتر بود (شکل ۳). همچنین مطابق شکل ٤ مقدار

باند گپ برای نانوذره ی سنتز شده به وسیله ی عصاره گیاهی مقدار ۳,۱٤ الکترون ولت را نشان میدهد. از مقدار باند گپ میتوان به این نتیجه رسید که بیشتر ذرات دارای اندازه ای از مرتبه ی نانوهستند. همچنین باند گپ بدست آمده وسیله ی نرم افزار گویای این امر است که نانوذره ی اکسید روی سنتز شده ی شیمیایی ابعاد کوچک تری نسبت به سنتز شده به وسیله ی عصاره ی گیاهی دارند.

نهایتا بعد از وارد کردن داده ها در شیت های نرم افزار با استفاده از فرمولاسیون تعریف شده پلات خروجی جذبی را به عنوان نمودار X و نمودار Y را به عنوان طیف باند گپ در نظر گرفته و نهایتا از تقسیم intercept بر slope باند گپ ما بدست می آید . این باند گپ هرچقدر کمتر باشد نانوذرات ابعاد بزرگ تر و هر چقدر بیشتر باشد نانوذرات ابعاد کوچکتری دارند.

XRD

مطالعات XRD در زاویه ۲ تتا از ۲۰ درجه تا ۸۰ درجه نشان داده شده است که در زاویه ۳۱/۸۳ درجه شاخص میلر ۱۰۰، زاویه ۳٤/۵۹ درجه شاخص میلر ۰۰۲ درجه و در زاویه ۳٦/۵۰ درجه شاخص میلر ۱۰۱ درجه و در زاویه ٤۷/۵٦ درجه شاخص میلر ۲۵۰ در زاویه ی ٦۲/۷۵ شاخص میلر ۱۱۲ بود(شکل ۵).

FTIR مربوط به نانوذره ی سنتز شده گیاهی و شیمیایی

اندازه نانوذره ۳۵۳٦ نانومتر و عصاره ۳٤٦۷ نانومتر بود . که این باند مربوط به گروه ترکیبات فلزی است. طول موج ۱٦۳۹ نانومتر در نانو ذره و ۱٦٤٦ نانومتر در نانوذره ی سنتز شده باعصاره مربوط به باند CH - است . طول موج ۱۷۳۵ نانومتر برای نانوذره مربوط به کربن دوبانند کربونیل cso است. طول موج ۱٤۰۳ نانومتر برای نانو ذره و ۱۵۱۱ نانومتر برای نانوذره ی سنتز شده با عصاره مربوط به ترکیبات NH(نیتروژن - هیدروژن) است. طول موج ۱۱۷۲ برای نانو ذره و ۱۱۸۷ برای نانوذره ی سنتز شده با عصاره مربوط به C-O است. طول موج ٦۵۹ نانومتر مربوط به اکسید روی و ٦٦۷ مربوط به اکسید روی سنتز شده با عصاره است همچنین ۱۱۷۲ مربوط به نانو ذره و ۱۱۸۷ نانومتر برای نانوذره ی سنتز شده با عصاره ، مربوط به کربن - نیتروژن در گروه های آمین آلیفاتیک است (شکل ٦ و ۷).

میکروسکوپ الکتروني عبوري (TEM)

به منظور بررسی اندازه و مورفولوژی نانوذرات سنتز شده تصاویر TEM تهیه شد. ذرات به وضوح در شکل ۸ قابل مشاهده اند.نتایج حاصل نشان دادکه نانوذرات تولیدی اندازه ای زیر ۱۰۰ نانومتر دارند.

EDAX

همچنین نتایج حاصل از Edax در شکل ۹ نشان داده شده است . همانطور که در تصویر مشاهده می شود پیک های حاصل نشان دهنده حضور سیلیسیوم، اکسیژن و روی در نانوذره ی سنتز شده با عصاره گیاهی است که عنصر سیلیسیوم در نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی دیده نمیشود. حضور عناصر درگیر میتواند تفاوت در اثر ثانویه ی نانوذره داشته باشد. نتایج در واقع بیانگر ساخته شدن نانو ذره به هر دو روش شیمیایی و سنتز شده با عصاره گیاهی است.

میکروسکوپ الکتروني روبشي ميدان گسيلي (FESEM)

همانگونه که در تصویر ۱۰ و۱۱ مشاهده می شود نانوذرات سنتز شده دارای اندازه های متفاوت بودند اما مقایسه اندازه های نانوذرات سنتز شده ی شیمیایی و گیاهی نشان دهنده ی آن است که نانوذرات شیمیایی در اندازه های مختلف در مقایسه با نانوذرات گیاهی دارای ابعاد کوچکتری نسبت به نانوذرات سنتز شده ی گیاهی هستند.

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره گیاه بن سرخ

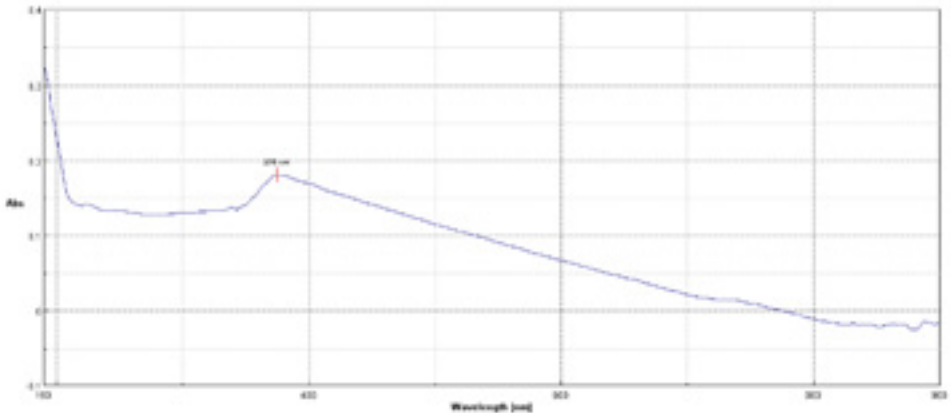
بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره بن سرخه نشان داد، عصاره اثر مهارکنندگی قابل توجه ای بر روی هر دو باکتری دارد جدول ۱ نتایج مربوط به MIC عصاره گیاه بن سرخه بر ضد باکتری های مورد بررسی به روش رقت در لوله را نشان می دهد. بیشترین حساسیت مربوط به استرپتوکوکوس اینیائه (MIC ۲٦,٦٦) و کمترین حساسیت به عصاره گیاه بن سرخه مربوط به آئروموناس هیدروفیلا (MIC ۱۳,۳۳) می باشد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی سنتز شده شیمیایی و گیاهی

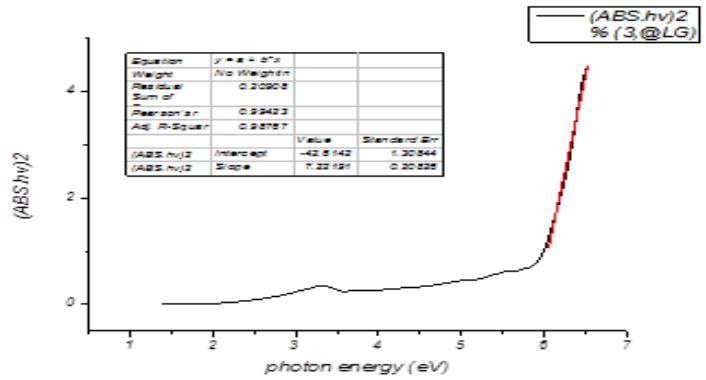
در جدول ۲ نتایج MIC و MBC برای دو باکتری استرپتوکوک اینیائه و آئروموناس هیدروفیلا به شکل مقایسه ای برای دو نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی و سنتز شده ی گیاهی نشان داده شده است. نتایج بدست آمده نشان داد که آئروموناس هیدروفیلا نسبت به استرپتوکوکوس اینیائه حساسیت کمتری به نانوذره سنتز شده ی شیمیایی و گیاهی دارد. همچنین مقایسه دو نانوذره باهم، نتایج بیان کننده ی تاثیر بهتر نانوذره ی شیمیایی

نسبت به نانوذره ی گیاهی بود و نشان می دهد که نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی در کل، تاثیر مطلوب تری بر روی باکتری ها داشته و .همچنین هر دو نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی و گیاهی تاثیر بهتری بر روی استرپتوکوکوس اینیه داشته اند .

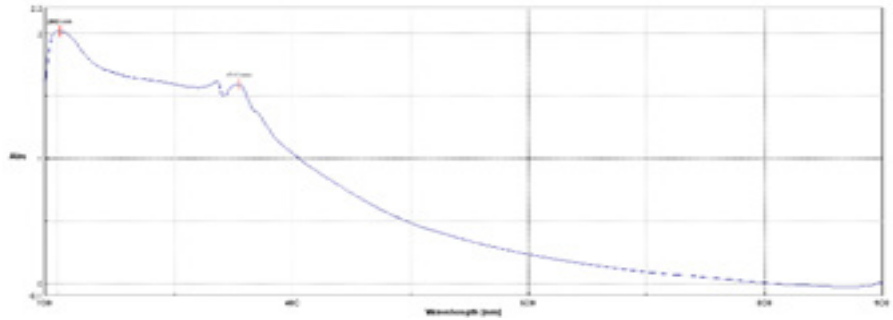
از چاهک گذاری و انتشار از دیسک برای نانوذره اکسید روی نتایج حاصل از قطر هالة عدم رشد در هر دو تست نشان می دهد اثرات مهارکنندگی رشد نانوذره ی اکسید روی بر باکتری آئروموناس هیدروفیلا نسبت به باکتری استرپتوکوکوس اینیائه مورد آزمایش کمتر بوده است. نتایج تست انتشاراز چاهک در جدول ۳ و نتایج انتشار از دیسک در جدول ٤ آورده شده است .



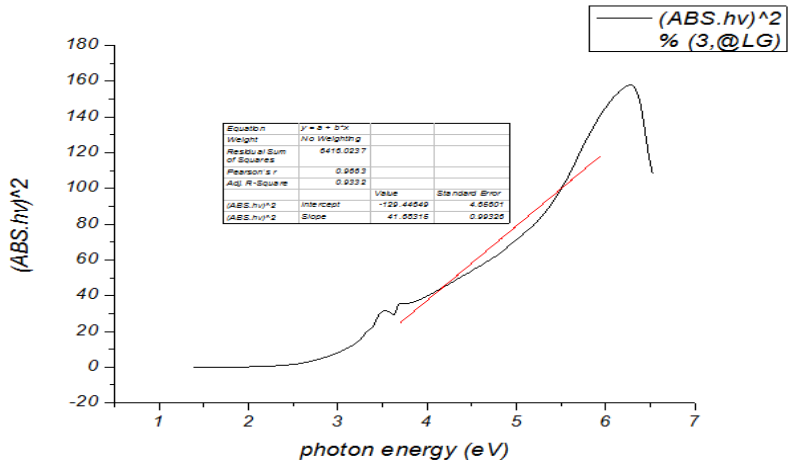
شکل ۱: اندازه گیری جذب نانوذرات اکسید روی سنتز شده شیمیایی با استفاده از UV



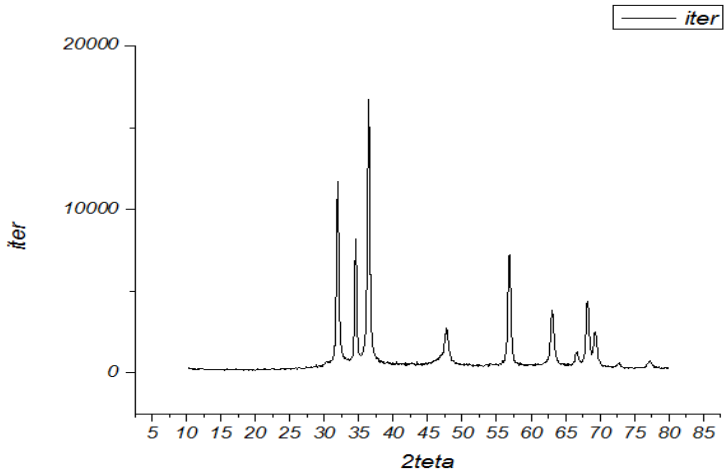
شکل ۲: محسابه باند گپ با نرم افزار origin pro برای نانوذره ی شیمیایی



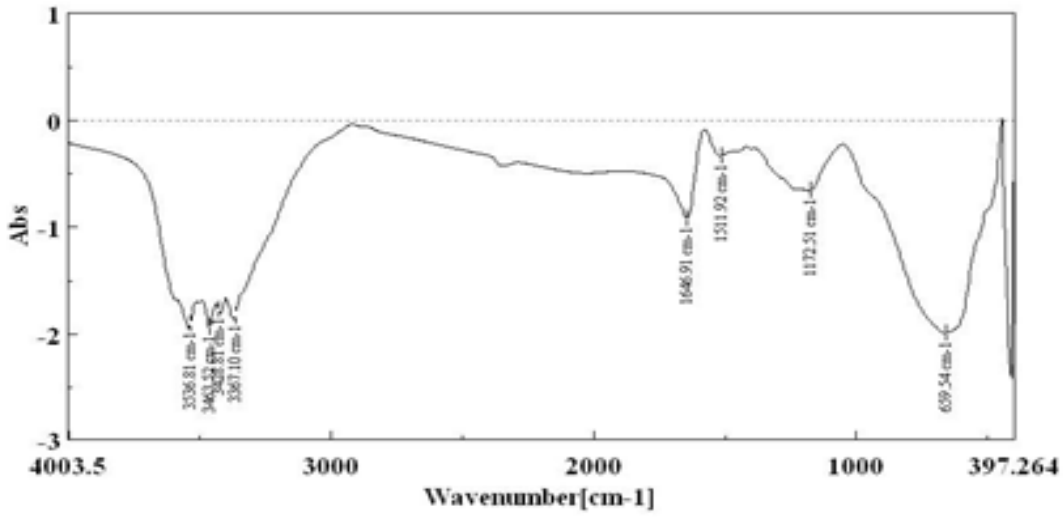
شکل ۳: اندازه گیری جذب نانوذرات اکسید روی سنتز شده گیاهی با استفادهUV



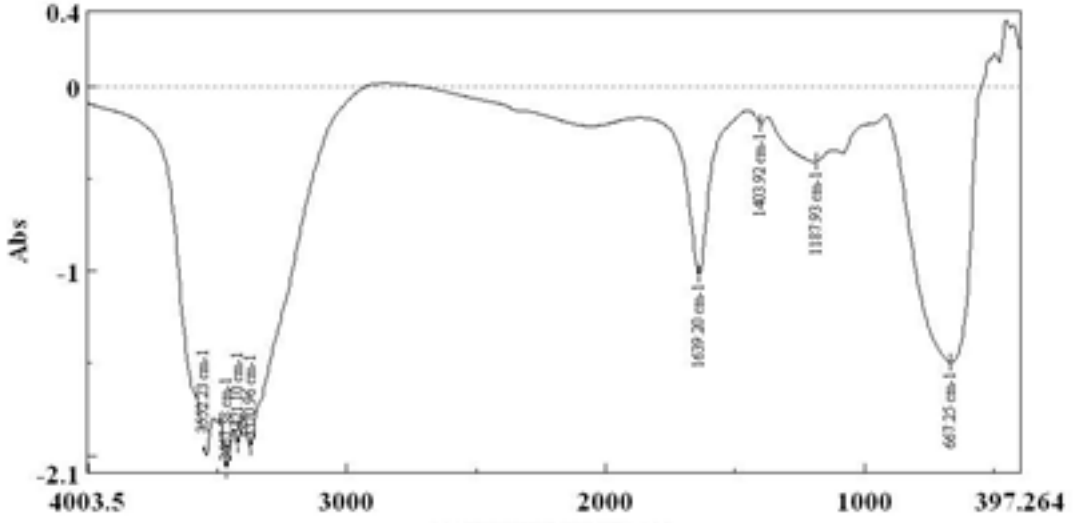
شکل ٤: محسابه باند گپ با نرم افزار origin pro برای نانوذره ی گیاهی



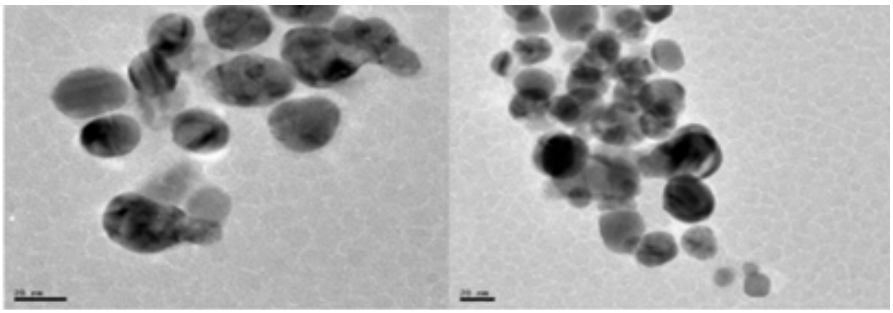
شکل ٥: نتایج حاصل ازXRD



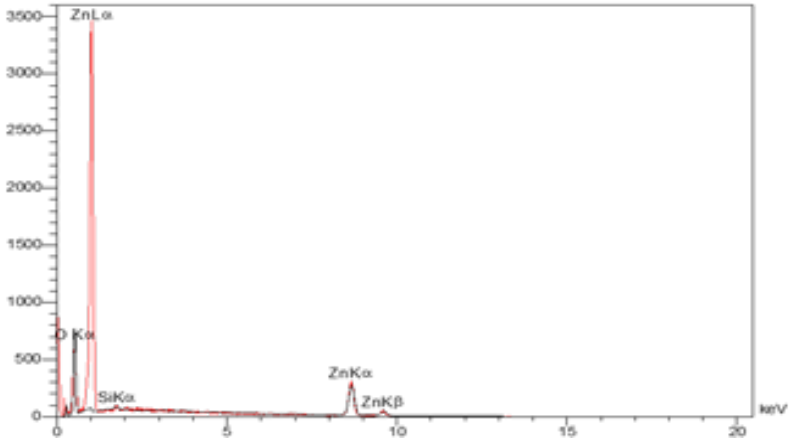
شکل ٦: نتایج FTIR برای نانوذره شیمیایی



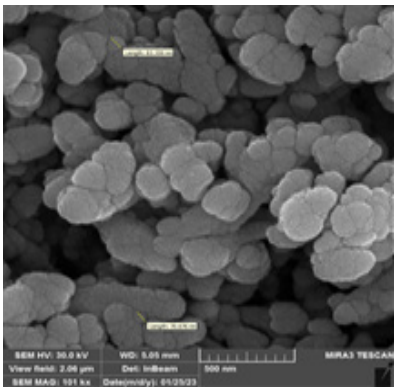
شکل ۷: نتایج FTIR برای نانوذره گیاهی



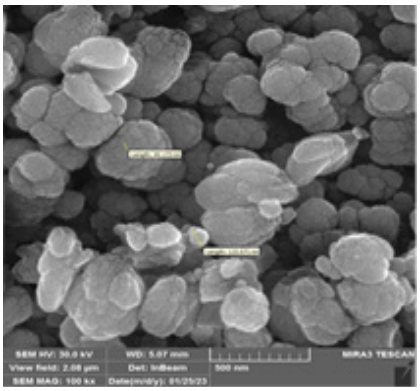
شکل ۸: نتایج تصاویر گرفته شده از نانوذرات اکسید روی توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری



شکل ۹: نمودار EDAX نانوذره شیمیایی و گیاهی



شکل۱۰: نتایج حاصل از FESEM برای نانوذره سنتز شده شیمیایی



شکل ۱۱: نتایج حاصل از FESEM برای نانوذره سنتز شده گیاهی

جدول ۱: بررسی اثر مهاری عصاره ی گیاه بن سرخه به روش MIC

عصاره آبی گیاه بن سرخه (mg/ml)	*استرپتوکوک اینیانه*	*آئروموناس هیدروفیلا*
	۱۶	۸
	۳۲	۱۶
	۳۲	۱۶
میانگین	۶۶/۲۶	۳۳/۱۳

جدول ۲: بررسی اثر مهاری نانوذرات سنتز شده گیاهی و شیمیایی به روش MIC و MBC

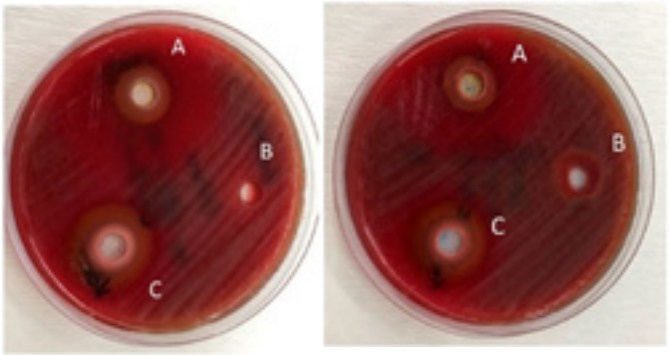
	Nanoparticle							
	ZnO2&synt				ZnO2&Chemi			
	Bacteria				Bacteria			
	A.hydrophila		*S.iniae*		*A.hydrophila*		*S.iniae*	
	MIC	MBC	MBC2	MIC2	MIC	MBC	MIC2	MBC2
	64	64	32	32	32	64	32	32
	64	128	64	32	128	128	16	64
	128	128	64	64	32	64	16	32
Mean	85.33	106.17	53.33	42.66	64.00	85.33	21.333	42.66

جدول ۳: قطر هاله عدم رشد باکتری ها برحسب میلی متر در غلظت های مختلف نانوذره ی اکسید روی در تست انتشار چاهک

غلظت نانوذره µg/ml سویه ی باکتری	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
آئروموناس هیدروفیلا	۷,۲ mm	۸,۲۵ mm	۱۰,۹±۰,۵۰ mm	۱۳,۴±۰,۵۷ mm
استرپتوکوک اینیانه	۸,۹ mm	۹,۲±۰,۴۳mm	۱۱,۴±۰,۵۰ mm	۱۴±۰,۵۹ mm

جدول ٤: قطر هاله عدم رشد باکتری ها برحسب میلی متر در غلظت های مختلف نانوذره ی اکسید روی در تست انتشار دیسک

غلظت نانوذره µg/ml سویه ی باکتری	۸۰	۴۰	۲۰	سیپروفلوکساسین ۵ µg/ml
آئروموناس هیدروفیلا	۱۵mm	۱۲mm	۹mm	Grow up
استرپتوکوک اینیائه	۱۶mm	۱۴mm	۱۱mm	۳۰mm



شکل ۱۲: قطر ناحیه بازدارندگی بر حسب میلی متر در اطراف هر چاهک در غلظت های مختلف نانوذرات اکسید روی در روش انتشار چاهک

بحث

با اندازه های مختلف نیز انجام شده است. برای انجام برهمکنش عصاره گیاه و محلول نمک نیترات روی و تغییر رنگ از قهوه ای به زرد، به دمای بالا نیاز بود که با نتایج حاصل از دانشمندان سلواکومار و کارنان در تهیه نانوذره اکسید روی از گیاه Nephelium lappacuml مطابقت داشت (۲٦). دراین مطالعه مشخص شد که عصاره گیاه بن سرخ توانایی تولید نانوذرات اکسید روی از نیترات روی را دارد. همچنین مشخص گردید که نانوذرات اکسید روی بیوسنتز شده دارای فعالیت ضد باکتریایی می باشند و در مقایسه با عصاره گیاه بن سرخ، دارای اثرات ضد میکروبی قوی تری هستند. تحقیقی که توسط پانتیدوس و همکاران در رابطه با سنتز بیولوژیک نانو ذرات فلزی توسط باکتری، قارچ و گیاهان انجام شد نشان داد که روشهای سبز سنتز نانو ذرات، انرژی و هزینه کمتری نیاز دارند (۲۷). محمد و همکاران نیز طی تحقیقات خود توانستند نانو ذرات آهن توسط قارچ آلترناریا را سنتز کنند(۲۸). در تحقیق دیگری، رانت و همکاران با استفاده از عصاره برگ گیاه ریحان، بیوسنتز نانوذرات اکسید روی را انجام دادند و بررسی اندازه نانو ذرات را با SEM نشان داد که اندازه نانوذرات در حدود ۱۱ تا ۲۵ نانومتر و شکل نانوذرات ٦ وجهی بود (۲۹). در حالی که در مطالعه ما، نانوذرات اکسید روی سنتز شده دارای محدوده اندازه ٤٥ تا ۱۱۵ نانومتر بوده و شکل نانوذرات کروی بود. در تحقیق مشابه دیگری که توسط یدارکار و

همکاران انجام شد، نانوذرات اکسید روی با استفاده از استات روی و عصاره برگ گیاه Ixora Coccinea سنتز کردید که اندازه نانو ذرات حدود ۸۰ تا ۱۳۰ نانومتر و شکل نانوذرات کروی بود(۳۰)، که از لحاظ سایز و اندازه با مطالعه ما متفاوت است اما از نظر شکل نانو ذرات با مطالعه ما همپوشانی دارد. بهامی وهمکاران، نانوذرات اکسید روی را با استفاده ازاستات روی وعصاره برگ گیاه roseu Catharanthus سنتز نمودند که سایز نانوذرات در محدوده ۲۳ تا ۵۹ نانومتر و از لحاظ شکل، کروی بودند، همچنین در این مطالعه، خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی سنتز شده بر ضد باکتری های سودوموناس، استرپتوکوکوس، اشرشیاکلی و باسیلوس تورنجینسیس مورد بررسی قرار گرفت که به ترتیب بیشترین اثر ضد میکروبی بر روی سودوموناس و کمترین اثر ضد میکروبی بر روی اشرشیا کلی مشاهده گردید (۳۱). در صورتی که در مطالعه ما نیز تاثیر نانوذرات سنتز شده بر روی استرپتوکوکوس اینایئه بیشتر از *آئروموناس هیدروفیلا* مشاهده گردید. نتایج به دست آمده از مطالعه ما نشان داد که عصاره گیاه بن سرخ بر علیه هر دو باکتری نام برده تاثیرات مطلوب ضد میکروبی داشته است، اما تاثیر بهتر این عصاره بر روی باکتری های گرم مثبت مشاهده گردید که با نتایج حاصل از مطالعه ندا فاضلی (۳۲) و مجتبی علی شاهی (۳۳) مشابهت نسبی داشت. نتایج مطالعه آنان که بر روی دو طیف باکتری های گرم مثبت و منفی صورت گرفته بود نشان داد که عصاره گیاه بن سرخ تاثیر بهتری بر روی باکتری های گرم منفی دارد اگرچه نتایج آنان مانند نتایج مطالعه ما هر دو اثر ممانعتی بر روی هر دو نوع باکتری را نشان می داد. طبق نتایج به دست آمده از تحقیق ما می توان گفت که عصاره گیاه بن سرخ قابلیت سنتز نانوذرات را دارد. نتایج حاصل، کارکرد خوب این گیاه را به وضوح نشان داد. در مطالعه حاضر، به شکل مقایسه ای نانوذرات سنتز شده شیمیایی با نانوذرات سنتز شده به روش سبز و همچنین اثر مهاری آن ها بر روی دو باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* و *آئروموناس هیدروفیلا* مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت که نتایج ما با پژوهشی که توسط سیوارمن و همکاران در سال ۲۰۰۹ و ساتیاواتی و همکاران در سال ۲۰۱۰ جهت سنتز نانوذرات نقره توسط عصاره گیاه بن سرخ انجام شد، مشابهت دارد (۳٤،۳۵). نتایج حاصل از UV Vis- نشان می داد که نانوذرات سنتز شده ی شیمیایی نسبت به نانوذرات سنتز شده ی گیاهی دارای باند گپ انرژی بیشتری بودند که این امر گویایی این است که ابعاد نانوذرات شیمیایی نسبت به سنتز شده ی گیاهی کوچک تر بودند. نتایج حاصل از میکروسکپ الکترونی نیز تایید کننده این تفاوت اندازه بود. اگر چه هر دو نانوذرات در بررسی MIC و MBC نتایج مشابهی را نشان می دادند اما داده های اماری تفاوت معنا داری را از نظر عملکرد نشان داد که تاثر مطلوب تر نانوذرات شیمیایی میتواند به همن امر یعنی کوچک تر بودن و نسبت سطح به حجم متفاوت نانوذرات شیمیایی باشد. نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج بدست آمده از مطالعه احمد و همکارانش (۳٦) و دوبراکا و همکارانش (۳۷) با نتایج حاصل از مطالعه ما مشابهت زیادی داشت. ابعاد باند گپ و نتایج UV-Vis بدست آمده از نتایج آنان نیز حاکی از طول موج جذبی مشابهی با مطالعه ما بود و محدوده ی ۳٦٦ که محدوده طول موجب جذبی آنان بود با مطالعه ما که طول موجب جذبی در ۳۷۵ بود طیف مشابهی را نشان می داد هم چنین محاسبه باند گپ در مطالعه انان چیزی حدود ٤،۸ بود که با باند گپ نانوذرات ما که ۵،۹۰ بود متفاوت بود که این تفاوت نشان دهنده یکنواختی و کوچک تر بودن نانوذرات ما و تفاوت بهتر عملکرد نانوذرات حاصل از مطالعه ما را توجیه می کند. اگر چه این تفاوت میتوان به علت تفاوت در دستگاه و الکترود های دستگاه سونیکت و هم چنین نوع ماده موثره اولیه باشد. لذا به شکل کلی می توان عنوان کرد که نانوذرات سنتز شده ی شیمیایی و نانوذرات سنتز شده گیاهی تفاوت چندانی باهم ندارند و می توان بیان کرد که این گیاه به عنوان یک کارخانه زنده می تواند برای تولید نانوذرات اکسید روی مورد استفاده قرار بگیرد .بنابراین می توان گفت که گیاه بن سرخ غیر از نقش دارویی و غذایی که دارد می تواند برای تولید نانوذرات اکسید روی برای مصارف پزشکی و داروسازی استفاده شود. در مطالعه حاضر به شکل مقایسه ای برای دو نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی و

سنتز شده ی گیاهی نشان داده شده است. برای نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی بیشترین میزان میانگین MIC مربوط به *آئروموناس هیدروفیلا* (٦٣ میکروگرم بر میلی لیتر) و کمترین میزان MIC مربوط به باکتری استرپتوکوک اینیه (٢١ میکروگرم بر میلی لیتر) بود. این میزان در رابطه با نانوذره ی سنتز شده ی گیاهی برای *آئروموناس هیدروفیلا* (٨٣ میکروگرم بر میلی لیتر) و در رابطه با (٥٢ میکروگرم بر میلی لیتر) بود. نتایج بدست آمده نشان داد که *آئروموناس هیدروفیلا* نسبت به *استرپتوکوکوس اینیه* حساسیت کمتری به نانوذره سنتز شده ی شیمیایی و گیاهی دارد. همچنین در جایگاه مقایسه دو نانوذره باهم نتایج بیان کننده تاثیر بهتر نانوذره ی شیمیایی نسبت به نانوذره ی گیاهی بود . این تفاوت عدد نشان میدهد که نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی در کل تاثیر مطلوب تری بر روی باکتری ها داشته وهمچنین هر دو نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی و گیاهی تاثیر بهتری بر روی *استرپتوکوکوس اینیه* داشته اند. همچنین میانگین میزان MBC برای *آئروموناس هیدروفیلا* در رابطه با نانوذره سنتز شده شیمیایی (٨٣ میکروگرم بر میلی لیتر) و برای نانوذره ی سنتز شده ی گیاهی نیز (١٠٤ میکروگرم بر میلی لیتر) بود. میزان MBC برای نانوذره ی سنتز شده ی گیاهی برای استرپتوکوک اینیه (٥٢ میکروگرم بر میلی لیتر) و برای نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی (٤٢ میکروگرم بر میلی لیتر) بود که نتایج همچنان نشان دهنده ی تاثیر بهتر هر دو نانوذره ی سنتتیک بر روی استرپتوکوک اینیه می باشد. در مطالعه ی مشابهی که ایفنچی و همکاران (٣٨)، اثر اکسید روی سنتز شده به روش سبز بر روی دو طیف باکتری های گرم مثبت و منفی بررسی کردند نیز مشاهده شد که اثر بخشی نانوذرات اکسید روی بر روی باکتری های گرم مثبت بهتر از گرم منفی بود همچنین بیان کرده بودند که رقت ١٠٠ میکروگرم بر میلی لیتر میتواند اثر بخشی خوبی بروی *آئروموناس هیدروفیلا* داشته باشند. تفاوت این داده ها می تواند به این دلیل باشد که منبع نمونه های ما همچنین طریقه سنتز نانومواد و اندازه نانومواد سنتتیک ما متفاوت بوده است . اما به شکل کلی نتایج رقت MIC آنان برای باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* نتایج مشابهی را نشان داد که نتایج حاصل از MIC ما را تایید می کند. در مطالعه دیگری که توسط جاناکی و همکارانش (٣٩) انجام شد، نتایج مشابهی را برای هر دو طیف باکتری گرم مثبت و گرم منفی بدست آورند که با مطالعه ما کاملا مطابقت داشت و نانوذرات سنتز شده ی شیمیایی تاثیر مطلوبی بر روی هر دو طیف باکتری های گرم مثبت و منفی داشتند، لذا نتایج آنان تایید کننده ی مطالعه حاضر است. مطالعه دیگری که چودهاری و همکارانش (٤٠) بر روی اثر نانوذرات سنتز اکسید روی انجام دادند دو طیف باکتری گرم مثبت و منفی بررسی شد و نتایج آنان نیز تایید کننده ی تاثیر مطلوب نانوذره ی اکسید روی بر روی هر دو طیف باکتری های گرم مثبت و منفی بود که تایید کننده نتایج حاصل از تحقیق حاضر می باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات اکسید روی تولید شده به روش سنتز سبز، باکتري هاي مورد بررسی را کنترل کرده و همچنین به نظر می رسد نانوذرات اکسید روی در مقایسه با نانوذرات سنتز شده ی شیمیایی تاثیرات تقریبا مشابهی از خود بروز داده اند و تفاوت اثر چندانی نداشتند. و در نهایت استفاده از نانوذرات در کنار آنتی بیوتیک هاي رایج، ما را قادر خواهد کرد تا از غلظت بسیار کمتر آنتی بیوتیک ها استفاده کنیم و اثرات سوء آنها را کاهش دهیم. همچنین به نظر می رسد در مواردي که نسبت به یک نوع آنتی بیوتیک باکتري مقاومت نشان می دهد بتوان با استفاده از ترکیب آنتی- بیوتیک- نانوذره حساسیت باکتري را به عامل ضد باکتري افزایش داد.

روش تولید زیستی نانوذرات یکی از راه های جدید، کم هزینه و کم خطر برای تولید نانوذرات می باشد که از دهه ٩٠ قرن بیستم به شدت مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است (٤١). امروزه، تهیه نانوذرات زیستی با توجه به کارایی آن ها در پزشکی و علوم زیستی رو به افزایش است؛ از سوی دیگر، افزایش آگاهی نسبت به شیمی سبز و فرایندهای زیستی، استفاده از روش های سازگار با محیط زیست را برای تهیه غیرسمی نانو مواد زیستی ضروری کرده است. نانوذرات از این جهت که ، بین حالت حجیم ماده و حالت اتمی یا مولکولی مانند یک پل می باشند، حائز اهمیت می باشند (٤٢،٤٣).

نانوذرات فلزی از نظر ویژگی های الکتریکی، اپتیکی، شیمیایی و مغناطیسی که از خود نشان داده اند، مورد مطالعات فراوان قرار گرفته اند (٤٤). گونه های مختلف گیاه سیر دارای فنولیک بوده و به همین دلیل به منظور تولید نانوذرات، می تواند کاندید مناسبی باشد (٤٥). از بین گونه های مختلف گیاه سیر، گونه بن سرخ که بومی ایران می باشد، حائز اهمیت است. سنتز نانوذرات، بر اساس احیای یون های نمک آنها و خنثی شدن بار الکتریکی در آنها است. عامل احیا کننده در تولید نانوذره اکسید روی در این تحقیق، عصاره گیاه بن سرخ بوده که عمل احیا در این برهمکنش، توسط فلاونوئید عصاره گیاه انجام شده است. تایید تشکیل نانوذرات اکسید روی با دستگاه های XRD، UV-vis و .... به تایید رسید. طبق گزارش های، «استان» و دیگر همکاران توانستند از سیر، ریحان و رزماری، نانوذره اکسید روی تولید کنند.۱۸ این کار توسط دیگر دانشمندان ان از جمله آمبیکا از گیاه (vitex negundo)(٤٦)، دوی از گیاه ختمی (٤٧،٤٨) وراج از گیاه Zingiber Officinale (٤٩،٥٠) انجام شده است.

نتیجه گیری

عصاره گیاه بن سرخ تاثیرات مطلوب ضد میکروبی خصوصا بروی باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* میتواند داشته باشد. در مقایسه نانوذرات سنتز شده گیاهی با سنتز شده ی شیمایی مشخص شد که نانوذرات شیمیایی اگر چه تاثیر بهتری دادند اما تفاوت اثر بسیار ناچیز بوده و از آنجا که سنتز سبزنانومواد تاثیرات زیست محیطی بهتری داشته و مسلما عوارض کمتری دارد، میتوان گفت که نانوذرات گیاهی میتوانند جایگزین مطلوبی برای نانوذرات شیمیایی باشند. همچنین کاندیدی برای جایگزینی آنتی بیوتیک درمانی در صنعت پرورش ماهی باشد .

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهش و فناوری واحد تهران مرکزی به جهت تصویب پروپوزال و مکاتبات اداری و از آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه تهران مرکزی به جهت در اختیار قراردادن امکانات آزمایشگاه برای انجام این تحقیق تشکر می شود.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند هیچ تعارض منافعی در انجام این مطالعه وجود نداشته است.

References

1. Matin F, Mirnurollahi SM, Behzadi R. Comparision and evaluation of the effect of disinfectants Microten, Savlon(strymid-c) and Banzalkonium cholorid on Escherichia coli. Iranian journal of biological. 2023;17(4):35-47.

2. Rai M, Kon K, Gade A, Ingle A, Nagaonkar D, Paralikar P, et al. Antibiotic resistance: can nanoparticles tackle the problem. 2016.

3. Yuvakkumar R, Suresh J, Nathanael AJ, Sundrarajan M, Hong SJMS, C E. Novel green synthetic strategy to prepare ZnO nanocrystals using rambutan (Nephelium lappaceum L.) peel extract and its antibacterial applications. 2014; 41:17-27.

DOI: 10.1016/j.msec.2014.04.025.

4.Ruddaraju LK, Pammi SVN, sankar Guntuku G, Padavala VS, Kolapalli VRMJAJoPS. A review on anti-bacterials to combat resistance: From ancient era of plants and metals to present and future perspectives of green nano technological combinations. 2020;15(1):42-59.

DOI: 10.1016/j.ajps.2019.03.002.

5.Shaikh S, Nazam N, Rizvi SMD, Ahmad K, Baig MH, Lee EJ, et al. Mechanistic insights into the antimicrobial actions of metallic nanoparticles and their implications for multidrug resistance. 2019;20(10):2468.

DOI: 10.3390/ijms20102468

6.Adwan G, Abu-Shanab B, Adwan KJAPjotm. Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug–resistant Pseudomonas aeruginosa strains. 2010;3(4):266-9.

DOI:10.1016/S1995-7645(10)60064-8

7.Mobaiyen H, Jafari Sales A, Sayyahi JJJoABS. Evaluating antimicrobial effects of centaurea plant's essential oil on pathogenic bacteria: staphylococcus aureus, staphylococcus epidermidis, and escherichia coli isolated from clinical specimens. 2015;5(4):479-87.

8. JAFARI-SALES A, Pashazadeh MJIJoLS, Biotechnology. Study of chemical composition and antimicrobial properties of Rosemary (Rosmarinus officinalis) essential oil on Staphylococcus aureus and Escherichia coli in vitro. 2020;3(1):62-9.

DOI: 10.38001/ijlsb.693371.

9. TABATABAEI YF, ALIZADEH BB, Zanganeh H. The comparison among antibacterial activity of Mespilus germanica extracts and number of common therapeutic antibiotics "in vitro". 2015.

10. Raghunath A, Perumal EJIjoaa. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. 2017;49(2):137-52.

DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011.

11. Huh AJ, Kwon YJJJocr. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotic's resistant era. 2011;156(2):128-45.

12. Raghupathi KR, Koodali RT, Manna ACJL. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide **nanoparticles. 2011;27(7):4020-8.**

DOI: 10.1021/la104825u.

13. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJJNRM. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. 2013;11(6):371-84.

DOI: 10.1038/nrmicro3028.

14.Niño-Martínez N, Salas Orozco MF, Martínez-Castañón G-A, Torres Méndez F, Ruiz FJIjoms. Molecular mechanisms of bacterial resistance to metal and metal oxide nanoparticles. 2019;20(11):2808.

DOI: 10.3390/ijms20112808.

15. Brandelli A, Ritter AC, Veras FFJMnip. Antimicrobial activities of metal nanoparticles. 2017:337-63.

DOI:10.1007/978-3-319-63790-7_15.

16. Saif S, Tahir A, Chen YJN. Green synthesis of iron nanoparticles and their environmental applications and implications. 2016;6(11):209.

DOI: https://doi.org/10.3390/nano6110209.

17. Zhu X, Pathakoti K, Hwang H-M. Green synthesis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles and their usage for antimicrobial applications and environmental remediation. Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles: Elsevier; 2019. p. 223-63.

DOI:10.1016/B978-0-08-102579-6.00010-1.

18. Kavoosi S, Yaghoubi HJC, Research M. Synthesis of silver nanoparticles using green method of plant extract european marjoram (Origanum Majorana) and their antibacterial effects. 2017;30(2):161-73.

19. Stan M, Popa A, Toloman D, Silipas TD, Vodnar DC. Antibacterial and antioxidant activities of ZnO nanoparticles synthesized using extracts of Allium sativum, Rosmarinus officinalis and Ocimum basilicum.

Acta Metall Sin (Engl. Lett.); 2016. 29(3): 228-36.

DOI: 10.1007/s40195-016-0380-7.

20.Elumalai K, Velmurugan SJASS. Green synthesis, characterization and antimicrobial activities of zinc oxide nanoparticles from the leaf extract of Azedarach indica (L.). 2015; 345:329-36.

DOI: 10.1016/j.apsusc.2015.03.176.

21.Gram L, Melchiorsen J, Bruhn JBJMb. Antibacterial activity of marine culturable bacteria collected from a global sampling of ocean surface waters and surface swabs of marine organisms. 2010; 12:439-51.

DOI: 10.1007/s10126-009-9233-y.

22.Rasmussen-Ivey CR, Figueras MJ, McGarey D, Liles MRJFim. Virulence factors of Aeromonas hydrophila: in the wake of reclassification. 2016:1337.

DOI: doi: 10.3389/fmicb.2016.01337.

23.Ahmed S, Chaudhry SA, Ikram S. A review on biogenic synthesis of ZnO nanoparticles using plant extracts and microbes: a prospect towards green chemistry. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2017; 166:272-84.

DOI: https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.011.

24.Król A, Pomastowski P, Rafińska K, Railean-Plugaru V, Buszewski B. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. Advances in colloid and interface science. 2017; 249:37-52.

DOI: 10.1016/j.cis.2017.07.033.

25.Deep G, Agarwal R. Antimetastatic efficacy of silibinin: molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer. Cancer and Metastasis Reviews. 2010;29(3):447-63.

DOI: 10.1007/s10555-010-9237-0.

26.Riesenberg A, Kaspar H, Febler AT, Werckenthin C, Schwarz S. Susceptibility testing of Rhodococcus equi an interlaboratory test. Vet Microbial 2016; 194:30 -5

27.Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Habib SS, Memic AJIjon. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. 2012:6003-9.

DOI: 10.2147/IJN.S35347.

28.Karnan T, Selvakumar SAS. Biosynthesis of ZnO nanoparticles using rambutan (Nephelium lappaceumL.) peel extract and their photocatalytic activity on methyl orange dye. J Mol Struct; 2016. 1125:358-6.

DOI: 10.1016/j.molstruc.2016.07.029.

29.Pantidos N, Horsfall LE. Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. J Nanomed Nanotechnol. 2014;5(5):1 -10.

DOI: https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000233.

30.MohamedYM, Azzam AM, Amin BH, Safwat NA. Mycosynthesis of iron nanoparticles by Alternaria alternate and its antibacterial activity. African J of Biotechnol. 2015;14(4):1234 -41.

DOI:10.5897/AJB2014.14286.

31.Raut PS, Thorat V, Thakre R. Green Synthesis of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles Using Ocimum Tenuiflorum Leaves. Int J Sci Res. 2015;17(5):1225 -8.

32.Yedurkar S, Maurya Ch, Mahanwar P. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using ixora coccinea leaf extract—a green approach. Open J Synth Theory Appl. 2016;5(1):1 -14.

DOI: 10.4236/ojsta.2016.51001.

33.Bhumi G, Savithramma N. Biological Synthesis of Zinc oxide Nanoparticles from Catharanthus roseus (l.) G. Don. Leaf extract and validation for antibacterial activity. Int J Drug Dev Res. 2014; 6(1):208 -14.

34.Neda Fazeli ASN, Seyed Amir Hossein Jalali, and Hojjatolah Zamani. Antimicrobial activity of extract derived from sea anemone (Stichodactyla haddoni) against Aeromonas hydrophila. Journal of Fisheries. 2021;74(1):85-96.

DOI:10.22059/jfisheries.2021.312541.1207.

35.ALISHAHI M GM, NAJAFZADEH H, PASHMFOROOSH M. ANTIBACTERIAL EFFECTS OF SOME MEDICAL PLANT EXTRACTS ON AEROMONAS HYDROPHILA, YERSINIA RUCKERI AND STREPTOCOCCUS INIAE. SCIENTIFIC-RESEARCH IRANIAN VETERINARY JOURNAL. 2011;6(2):21-30.

36.Sivaraman SK, Elango I, Kumar S, Santhanam VJCS. A green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds. 2009;97(7).

37.Sathyavathi R, Krishna MBM, Rao DNJJoN, Nanotechnology. Biosynthesis of silver nanoparticles using moringa oleifera leaf extract and its application to optical limiting. 2010; 10:1-5.

DOI: 10.1166/jnn.2011.3581.

38.Ahmad R, Khatoon N, Sardar MJASL. Antibacterial effect of green synthesized TiO2 nanoparticles. 2014;20(7-8):1616-20.

39.Dobrucka R, Długaszewska JJSjobs. Biosynthesis and antibacterial activity of ZnO nanoparticles using Trifolium pratense flower extract. 2016;23(4):517-23.

DOI: 10.1016/j.sjbs.2015.05.016.

40.Ifeanyichukwu UL, Fayemi OE, Ateba CNJM. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles from pomegranate (Punica granatum) extracts and characterization of their antibacterial activity. 2020;25(19):4521.

DOI: 10.3390/molecules25194521.

41.Janaki AC, Sailatha E, Gunasekaran SJSAPAM, Spectroscopy B. Synthesis, characteristics and antimicrobial activity of ZnO nanoparticles. 2015; 144:17-22.

DOI: 10.1016/j.saa.2015.02.041.

42.Chaudhary A, Kumar N, Kumar R, Salar RKJSAS. Antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles synthesized from Aloe vera peel extract. 2019; 1:1-9.

DOI:10.1007/s42452-018-0144-2.

43. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J-H, Park SJ, Lee HJ, et al. antimicrobial effects of silver nanoparticles. 2007;3(1):95-101.

DOI: 10.1016/j.nano.2006.12.001.

44. Khoshal Z, Vaziri A and Rahbarian R. Green production of silver nanoparticles from Eryngium planum and its antibacterial effect on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Iranian journal of biological sciences.2023 ;17(4):77-92.

45. Kaushikthakkar N, Snehitmhatre S, Raseshparikh Y. Biological synthesis of Metallic Nanoparticles. Nanomedicine 2010; 28:257 -62.

46. Azizinshermeh O, Valizadeh J, Noroozifar M, Ghasemi A, Valizadeh M. [Optimization, characterization and anti - microbial activity of gold nanoparticles biosynthesized using aqueous extract of Sambucus ebulus . L]. Phytochem J Med Plants 2016; 1:1 -18.

47. Manokari M, Ravindran CP, Shekhawat MS. Production of zinc oxide nanoparticles using aqueous extracts of a medicinal plant Micrococca mercurialis (L.) Benth. WSN; 2016. 30:117.

48. Ambika S, Sundrarajan M. Green biosynthesis of ZnO nanoparticles using Vitex negundo L. extract: spectroscopic investigation of interaction between ZnO nanoparticles and human serum albumin. J Photochem Photobiol; 2015. 149:143-8.

DOI: https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.05.004.

49.Bala N, Saha S, Chakraborty M, Maiti M, Das S, Basu Rand and Nandy P. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Hibiscus subdariffa leaf extract: effect of temperature on synthesis, antibacterial activity and anti-diabetic activity. RSC Adv; 2015. 5(7):4993-5003.

DOI: https://doi.org/10.1039/C4RA12784F.

50.Raj LFA, Jayalakshmy E. Biosynthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using root extract of zingiber officinale. Orient J Chem; 2015. 31(1):51-6.

DOI: http://dx.doi.org/10.13005/ojc/310105.