مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل

دوره بیستم، شمارهٔ ۱۰، مهر ۱۳۹۷، صفحه ۳۵-۲۸

سنتز سبز نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره برگ گیاه اکالیپتوس ملیودورا و ارزیابی اثرات ضد میکروبی آن

بهنام رفیعی (MSc)[۱*]، سپیده غنی (MSc)[۲]، داود صادقی (PhD)[۳]، مریم احسنی (BSc)[۴]

۱-باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

۲-گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳-مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

۴- گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

دریافت: ۹۷/۱/۵، اصلاح: ۹۷/۶/۱۴، پذیرش: ۹۷/۶/۲۵

خلاصه

سابقه و هدف: تولید سبز نانوذرات روشی دوستدار محیط زیست بوده که در آن از حلالهای طبیعی استفاده می شود. روشهای سنتز سبز نانوذرات به دلیل کاهش هزینه، زمان و انرژی، نسبت به روشهای شیمیایی و فیزیکی اولویت دارد. هدف از این مطالعه سنتز نانو ذرات اکسید روی به روش سبز و بررسی فعالیت ضد باکتریایی این نانوذرات می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، عصاره آبی اکالیپتوس ملیودورا با محلول سولفات روی۰/۱ مولار به نسبت ۱:۱ ترکیب شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد تا نانوذرات ساخته شود. سنتز نانوذرات اکسیدروی با روشهای اسپکتروفتومتری، اندازه گیری میانگین قطر نانوذرات، پراش اشعه ایکس و میکروسکوپ الکترونی (SEM) تایید گردید. سپس میزان MIC نانوذرات اکسیدروی بر روی سویه های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس PTCC۱۴۳۱، باسیلوس سرئوس PTCC۱۰۱۵ و اشرشیاکلی PTCC۱۳۹۹، سودوموناس آئروژینوزا PTCC۱۵۷۱ اندازه گیری شد.

یافته ها: پیک جذبی نانو ذرات اکسید روی، در طول موج ۳۵۰ نانومتر مشاهده شد. نانو ذرات اکسیدروی با تکنیک SEM به شکل کروی و اندازه حدود ۵۰-۳۰نانومتر بودند. بیشترینMIC بر روی سودوموناس آئروژینوزا با ۰/۰۰۱۹ mg/ml و کمترینMIC بر روی باسیلوس سرئوس با۰/۰۶۲ mg/ml مشاهده شد. همچنین در مقایسه نانوذرات اکسید روی، عصاره اکالیپتوس و سولفات روی بیشترین اثر ضد میکروبی مربوط به نانوذرات اکسید روی بود و MIC آنها تفاوت معنی داری از لحاظ تاثیر روی باکتریهای مورد آزمایش با یکدیگر داشتند ($p<۰/۰۵$).

نتیجه گیری: براساس نتایج این مطالعه نانو ذرات سنتز شده اکسید روی و عصاره آبی اکالیپتوس و همچنین سولفات روی دارای خاصیت آنتی باکتریایی می باشند، اما بیشترین اثرات ضد میکروبی توسط نانو ذرات اکسید روی مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضد باکتریایی، سنتز سبز، نانو ذرات اکسید روی.

مقدمه

نانوفناوری امروزه شاهد پیشرفتهای چشمگیری در زمینه تولید نانومواد و استفاده از روشها و مواد جدید بوده است، با توسعه و کشف روشهای جدید نگرانیها در مورد آلودگی محیط زیست توسط نانوذرات از طریق روشهای شیمیایی و محصولات جانبی آنها بیشتر شده است، بنابراین نیاز به روشهای شیمی سبز که سالم، غیر سمی و سازگار با محیط زیست هستند احساس می شود(۲و۱)، لذا نانوذرات سنتز شده به روشهای بیولوژیک بخاطر داشتن ویژگیهای نوین و همچنین سازگاری با محیط زیست نقش مهمی را در پزشکی نوین بر عهده دارند(۳). اســتفاده از موجودات زنده مانند میکروارگانیسـمها از قبیـل قــارچ، بــاکتری، مخمــر، اکتینومیســت و یــا ماکروارگانیسمها مثل گیاهان، جلبـکهـا به عنوان واسطه ای در سنتز نـانوذرات از ترکیبـات معدنی، می توانند روشی دیگر در کنار روشهـای شیمیایی و فیزیکی برای تولید نانو ذرات باشـد(۴)، از جمله می توان به سنتز نانوذرات آهن توسط باکتری باسیلوس مگاتریوم اشاره نمود(۵). بطور کلی روشهای تولید زیستی نانو ذرات نسبت به روشهای فیزیکی و شیمیایی به دلیل کاهش هزینه، انرژی و زمان الویت دارد، این روش نیازمند استفاده از حلالهای سمی و مواد خطرناک برای محیط زیست نمی باشد. تولید سبز نانو ذرات روشی دوستدار طبیعت است که در آن از حلالهای طبیعی استفاده می شود ساخت و تجمع نانوذرات

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۹۴۵۹۵ باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک می باشد.

* مسئول مقاله: بهنام رفیعی

آدرس: اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان. تلفن: ۳۳۴۱۲۲۵۱-۰۸۶

E-mail: rafiee.17b@gmail. com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.10.4.0]

[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.10.28]

با استفاده از روشهای شیمی سبز از سال ۱۹۹۰ مورد توجه واقع شد و در طی زمان، استفاده از گیاهان سبز برای تهیه زیستی نانوذرات یک امکان هیجان انگیز ایجاد کرده و تا حدود زیادی شناخته شده است(۶). لذا گیاهان و فرآورده های گیاهی در جهت تولید نانو ذرات خیلی بیشتر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته اند، علاوه براین، نانو ذرات تولید شده توسط گیاهان دارویی با ریسک کمتری می تواند در مواردی مانند انتقال دارو کاربرد داشته باشد همچنین تحقیقات نشان داده که نانوذرات ساخته شده توسط گیاهان نسبت به نانو ذرات حاصل از فعالیت سایر موجودات سریع تر ساخته شده و با ثبات تر هستند(۷)، شکل و اندازه نانو ذرات ساخته شده توسط گیاهان با نانوذرات حاصل از سایر موجودات متفاوت است بنابراین مزیت تولید گیاهی نانوذرات بر سایر روشهای زیستی مثل استفاده از باکتریها، جلبکها و مخمرها و قارچها، قابل اعتماد و ایمن تربودن روشهای گیاهی و سالمتر بودن، ارزانتر بودن و تجدید پذیر بودن آنست(۸).

از آن جمله می توان به بیوسنتز نانوذرات نقره توسط گیاه عشقه و همچنین به بیوسنتز نانوذرات طلا با استفاده از تراوشهای بذر گیاه شبدر ایرانی، اشاره نمود (۱۰و۹). نانوذرات در سطح جهانی با توجه به ویژگیهای هیجان انگیز و منحصر به فردی که دارند میتوانند در زمینه هایی مثل تشخیص، نانوپزشکی و خواص ضد میکروبی کاربرد داشته باشند. بطوریکه نانوتکنولوژی برای حل مشکل مقاومت آنتی یوتیکی نیز وارد عمل شده است(۱۳-۱۱). یکی از مهمترین نانوذرات اکسید روی می باشد که در اکثر کشورها بشکل صنعتی مورد استفاده قرارگرفته است(۱۴). بطوریکه نانوذرات روی در بسته بندی مواد غذایی، در بیوسنسورها، در تصویربرداری از سلولها ودرمان سرطان، در مواد آرایشی بهداشتی، در تصفیه آب و فاضلاب و همچنین نانوذرات فلزی اکسید روی دارای کاربرد ضد میکروبی نیز هستند و بخاطر کاربردهای فراوان در دو دهه اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است(۲۰-۱۵). ازنانو ذرات اکسید روی برای مقابله با باکتریهای گرم منفی و گرم مثبت استفاده شده وهمچنین بعنوان یک ماده ضد قارچ نیز کاربرد دارد (۲۱و۱۴). مکانیسم عمل ضد میکروبی اکسید روی شبیه سایر نانوذرات می باشد و عمدتا از طریق تخریب دیواره باکتری عمل می‌کند (۱۹). اصولا مکانیسم اثرات سمی نانوذرات بخوبی شناخته نشده است ولی تحقیقات اخیر، این اثرات سمی را با سطح تماس زیاد نانوذرات، نفوذ پذیری آنها به داخل سلولها و ارگانیسمها، ایجاد آسیب غشایی، آسیب به DNA، ایجاد التهاب در سلول و تغییر در تعاملات سلولی مرتبط می دانند(۲۲). لذا هدف از این تحقیق سنتز سبز نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره برگ گیاه اکالیپتوس ملیودورا و همچنین بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی بر علیه تعدادی از باکتری گرم مثبت و گرم منفی شایع بیماریزا (سویه های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا*) می باشد که هدف از این مطالعه سنتز نانو ذرات اکسید روی به روش سبز و بررسی فعالیت ضد باکتریایی این نانوذرات می باشد.

مواد و روش ها

سنتز نانو ذرات روی با استفاده از عصاره اکالیپتوس ملیودورا: به منظور تهیه عصاره گیاه اکالیپتوس ملیودورا، برگ گیاه اکالیپتوس ملیودورا از باغ گیاهان دارویی دزفول جمع آوری شد، سپس با روش جوشاندن عصاره گیری انجام شد و نهایتا جهت استریل کردن عصاره گیاهی، از فیلترهای ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. سپس محلول سولفات روی ۰/۱ مولار تهیه و توسط کاغذ صافی صاف گردید. سپس عصاره بدست آمده با محلول سولفات روی با نسبت ۱ به ۱ ترکیب گردید، سنتز نانوذرات در دمای اتاق در طی زمان ۱۵ دقیقه انجام گرفت.

تعیین مشخصات نانو ذرات اکسید روی

اسپکتروفوتومتری(Uv-vis): طیف جذبی نانو ذرات توسط اسپکتروفتومتر (Uv-visSERIES8000CECIL) انجام شد. میزان جذب نانو ذرات روی در محدوده طول موج ۲۰۰nm –۷۰۰ بررسی گردید.

اندازه گیری میانگین قطر نانوذرات (Dynamic Light Scattering)، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی نانوذرات(Poly Dispersity Index): جهت اندازه گیری(DLS) و پتانسیل زتا که معرف پایداری نانو ذرات می باشد و نیز(PDI) از دستگاه زتاسایزر (ساخت شرکت Malvern-England) استفاده گردید.

پراش اشعه ایکس (X-Ray Diffraction): محلول حاوی نانو ذرات روی، با دور (۱۲۰۰۰rpm) سه مرتبه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، آنگاه محلول رویی دور ریخته شد و رسوب در آون خشک گردید. سرانجام پودر خشک شده برای بررسی نانو ذرات کریستالی با دستگاه XRD مورد بررسی قرار گرفت.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscopy): با استفاده از دستگاه SEM مدل HITACHI S-4500 شکل و اندازه نانو ذرات اکسید روی مورد بررسی قرار گرفت. به طوری که ۱۵میکرولیتر از محلول نانو ذرات روی بر روی گریدهای مخصوص SEM ریخته شد و پس از خشک شدن مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین خاصیت ضد باکتریایی

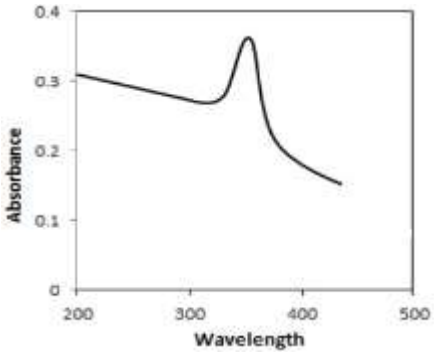
روش دیسک دیفیوژن: برای بررسی خاصیت ضد باکتریایی، سویه های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس۱۴۳۱PTCC، باسیلوس سرئوس ۱۰۱۵PTCC به عنوان باکتریهای گرم مثبت و اشرشیاکلی ۱۳۹۹PTCC، سودوموناس آئروژینوز ۱۵۷۱PTCC به عنوان باکتریهای گرم منفی به کار برده شدند. از هر باکتری با غلظت نیم مک فارلند، ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. برای هر ۴ باکتری، ۴ پلیت حاوی یک دیسک آغشته به ۶ میکرولیتر از سوسپانسیون نانو ذره اکسید روی، یک دیسک آغشته به ۶ میکرولیتر محلول ۰/۱ مولار سولفات روی و یک دیسک آغشته به ۶ میکرولیتر عصاره اکالیپتوس استفاده گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد به عنوان شاخص خاصیت ضد باکتریایی نمونه ها اندازه گیری و ثبت شد. جهت جلوگیری از احتمال وقوع خطا در کلیه مراحل کار، این آزمایشها ۳ بار تکرار گردید و نتایج ثبت شد.

روش رقت سازی لوله ای: میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری (MIC)، در محیط کشت (Tryptic Soy Broth=TSB)، به ۴ مجموعه ۱۰ تایی لوله که حاوی ۱ml محیط TSB استریل بود، به لوله اول ۱ ml محلول نانو ذره سولفات روی اضافه گردید. پس از هم زدن ۱ml از لوله اول به لوله دوم و سپس ۱ml از لوله دوم به لوله سوم و به همین ترتیب تا لوله آخر اضافه شد و سرانجام ۱ml از لوله آخر به بیرون ریخته شد. به تمامی لوله ها ۱ml سوسپانسیون باکتری فعال که مطابق با لوله نیم مک فارلند استاندارد شده بود، اضافه گردید. تمامی لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای مناسب قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت با توجه به کدورت در لوله ها میزانMIC تعیین گردید. جهت جلوگیری از احتمال وقوع خطا در کلیه مراحل کار، این آزمایشها ۳ بار تکرار گردید و نتایج ثبت شد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.10.4.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.10.28]

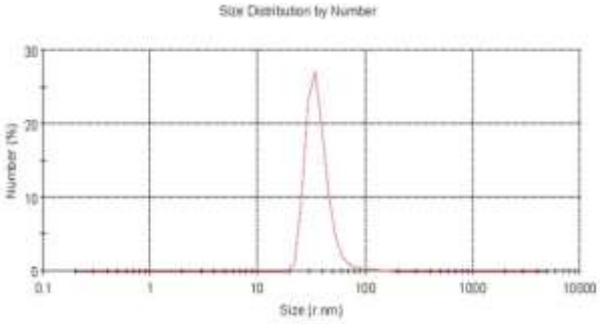
یافته ها

اسپکتروفتومتر (UV-Vis): در آنالیز نانو ذرات روی با اسپکتروفتومتری Uv-vis، پیک جذبی، نانوذرات روی در طول موج ۳۵۰nm مشاهده شد که بیانگر وجود نانو ذرات روی در محلول واکنش است(شکل۱). بیشینه پیک جذبی نانو ذرات روی، در طول موجهای۴۰۰nm-۳۰۰ می باشد(۲۳).

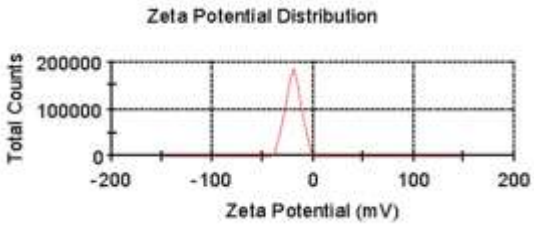


شکل ۱. طیف جذبی Uv-vis نانو ذرات روی

اندازه میانگین قطر نانوذرات (DLS)، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی نانوذرات (PDI): در این مطالعه با استفاده از دستگاه زتا سایزر در محدوده PH:۸ میانگین قطر نانودرات روی سنتز شده در محدوده ۳۷نانومتر بدست آمد (شکل۲)، همچنین (PDI) برابر با ۰/۴۳ بدست آمد که نشان دهنده یکنواختی بالا و مناسب محلول کلوئیدی نانوذرات سنتز شده می باشد، مضاف بر این، پتانسیل زتا نیز ۱۹/۶- میلی ولت ثبت گردید که بیانگر پایداری بسیار مناسب نانوذرات روی می باشد(شکل۳).



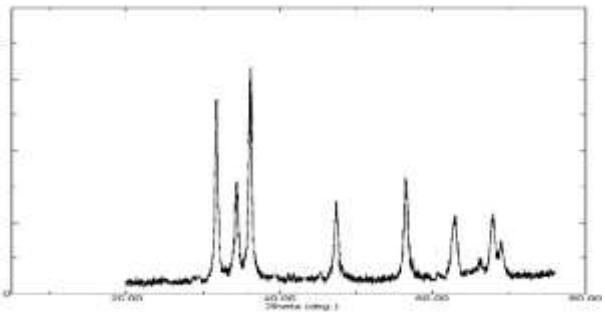
شکل۲. نمودار میانگین اندازه قطر نانوذرات روی



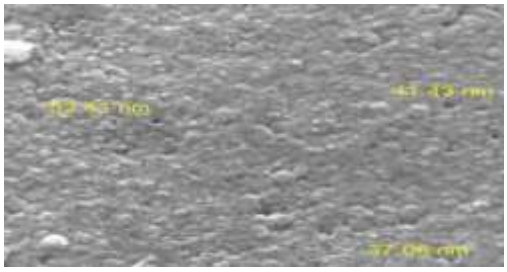
شکل۳. نمودار پتانسیل زتا نانوذرات روی

پراش اشعه ایکس(XRD): آنالیزXRD به منظور اثبات تشکیل نانو ذرات روی انجام گرفت. الگوی طیف به دست آمده از ویرایش اشعه ایکس در زاویه θ دارای پیک‌های(100-002-101-102-110-103-200-112-201) بود (شکل ۴) که با الگوی پراش اشعه ایکس ماده(ZnO) تطابق داشته و فاز جانبی دیگری مشاهده نمی‌شود(شکل۲).

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): تصاویر(SEM)، نانو ذرات روی درشکل۳ نمایش داده شده است. از این شکل برای تایید مورفولوژی و اندازه نانو ذره روی استفاده می شود. با توجه به تصاویرSEM نانو ذرات روی کروی شکل بودند و اندازه نانو ذرات بین ۵۰nm-۳۰ است(شکل۴).



شکل۴. الگوی XRD از نانو ذرات اکسید روی



شکل۴. تصویر SEM نانو ذرات کروی اکسید روی

دیسک دیفیوژن: نتایج بیشترین اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی بر روی سودوموناس آئروژینوزا با قطر هاله عدم رشد ۳۰ml و کمترین اثر ضد میکروبی بر روی باسیلوس سرئوس با قطر هاله عدم رشد ۲۰ml بودند (جدول ۱). که طبق نتایج بدست آمده خاصیت ضد میکروبی نانو ذرات روی بیشتر از خاصیت ضد میکروبی عصاره *اکالیپتوس ملیودورا* و سولفات روی بود.

حداقل غلظت بازدارندگی(MIC: Minimum inhibitory concentration): نتایج بررسیهای مربوط به خواص ضد میکروبی نانو ذرات روی نشان داد که بیشترین اثر ضد میکروبی بر روی سودوموناس آئروژینوزا با mg/ml MIC:۰/۰۰۱۹ و کمترین اثر ضد میکروبی بر روی باسیلوس سرئوس با mg/ml MIC:۰/۰۶۲ بودند (جدول ۲).

آنالیزهای آماری: تمامی آزمونهای آماری استفاده شده در این تحقیق کروسکال والیس است. شاخص مورد ارزیابی درکروسکال والیس میانه بوده و بر اساس کای اسکور(x^2) بیان شده است و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.بطوریکه در مورد قطر هاله های عدم رشد، سه گروهمادە ضد میکروبی از نظر تاثیر روی قطرهاله عدم رشد بر روی هر چهارنوع میکروارگانیسم تفاوت آماری معنی داری با هم داشتند (جدول۱). در مورد آنالیزآماری (MIC) نیز، سه گروه ماده ضد میکروبی از نظر تاثیر برروی هر چهارنوع میکروارگانیسم تفاوت آماری معنی داری با هم داشتند و سولفات روی به طور معنی داری MIC پایینتری در هر چهار نوع میکروب می باشد (جدول۲).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.10.4.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.10.28]

جدول۱. نتایج حاصل از اندازه گیری قطر هاله عدم رشد

باکتری	قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر									آنالیز آماری
	عصاره اکالیپتوس			نانو ذرات اکسید روی			سولفات روی			
	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	
باسیلوس سرئوس	۶/۵	۷	۷	۲۰	۲۰	۲۰	۱۳/۷	۱۴	۱۴	chi-squared=7.579 with 2 d.f. probability=0.0226
سودوموناس آئروجینوزا	۱۷/۸	۱۸/۲	۱۸	۳۰	۲۹/۵	۳۰	۱۴/۸	۱۴/۸	۱۵	chi-squared=7.200 with 2 d.f. probability=0.0273
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۵	۱۵/۲	۱۵	۲۵	۲۵	۲۴/۶	۱۵/۷	۱۵/۸	۱۶	chi-squared=7.200 with 2 d.f. probability=0.0273
اشرشیا کلای	۱۱/۸	۱۲	۱۲	۲۸	۲۸	۲۷/۵	۱۶	۱۶/۲	۱۶	chi-squared=7.200 with 2 d.f. probability=0.0273
کل										X2= 7.538 with 2 d.f. p=0.0231

جدول۲. نتایج حاصل از اندازه گیری MIC

	باکتری	حداقل غلظت بازدارندگی از رشد بر حسب mg/ml									آنالیز آماری
		عصاره اکالیپتوس mg/ml بر حسب			نانو ذره روی mg/ml بر حسب			سولفات روی mg/ml بر حسب			
		تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	X2(p-value)
۱	باسیلوس سرئوس	۰/۰۶۲	۰/۰۶۲	۰/۰۶۲	۰/۰۰۷۸	۰/۰۰۷۸	۰/۰۰۷۸	۰/۰۱۵	۰/۰۱۵	۰/۰۱۵	Chi-squared =7.23 with 2 d.f. probability=0.027
۲	سودوموناس آئروژینوزا	۰/۰۰۳۹	۰/۰۰۳۹	۰/۰۰۳۹	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۱۹	۰/۰۱۵	۰/۰۱۵	۰/۰۱۵	chi-squared = 7.200 with 2 d.f. probability =0.0273
۳	استافیلوکوکوس اورئوس	۰/۰۰۳۹	۰/۰۰۳۹	۰/۰۰۳۹	۰/۰۰۳۹	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۱۹	۰/۰۱۵	۰/۰۱۵	۰/۰۱۵	chi-squared =7.200 with 2 d.f. probability=0.0273
۴	اشرشیا کلی	۰/۰۰۷۸	۰/۰۰۷۸	۰/۰۰۷۸	۰/۰۰۳۹	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۱۹	۰/۰۱۵	۰/۰۱۵	۰/۰۱۵	chi-squared =7.24 with 2 d.f. probability =0.0275
	کل										X2 = 8.297 with 3 d.f. p=0.0403

بحث و نتیجه گیری

دراین مطالعه مشخص شد که عصاره آبی برگ گیاه اکالیپتوس توانایی تولید نانوذرات اکسید روی از سولفات روی را دارد و در ادامه مشخص شد که این نانوذرات اکسید روی دارای فعالیت ضد باکتریایی هستند و در مقایسه با عصاره آبی اکالیپتوس ملیودورا و نیز سولفات روی دارای اثرات ضد میکروبی قوی تری هستند. نتایج تحقیق Pantidos و همکاران در رابطه با سنتز بیولوژیک نانو ذرات فلزی توسط باکتری، قارچ و گیاهان نشان داد که روشهای سبز سنتز نانو ذرات انرژی و هزینه کمتری نیاز دارند (۲۴). در مطالعه ای که توسط Mohamed و همکاران انجام گرفت نانو ذرات آهن توسط قارچ آلترناریا سنتز گردید(۲۵). در مطالعه دیگری توسط Awwad و همکاران، یک روش سبز و آسان برای سنتز نانو ذرات مغناطیسی به کار گرفته شد(۲۶). Raut و همکاران با استفاده از عصاره برگ گیاه ریحان نانوذرات اکسید روی ساختند و اندازه نانو ذرات را با SEM بررسی نمودند، بطوریکه اندازه نانوذرات سنتز شده در حدود ۱۱ تا ۲۵ نانومتر و شکل نانوذرات ۶ وجهی بود(۲۷)، این در حالیست که نانوذرات اکسید روی سنتز شده در مطالعه ما، دارای محدوده اندازه ۳۰ تا۵۰ نانومتر بوده و شکل نانوذرات کروی بود. در مطالعه مشابه دیگری توسط Yedurkar و همکاران که با استفاده از استات روی و عصاره برگ گیاه *Ixora Coccinea* نانو ذرات اکسید روی ساختند که اندازه نانو ذرات حدود ۸۰ تا۱۳۰ نانومتر اندازه گیری شد و شکل نانوذرات کروی بود(۲۸)، که از لحاظ اندازه با مطالعه ما متفاوت ولی از لحاظ شکل نانو ذرات با مطالعه ما همپوشانی دارد. در مطالعه دیگری توسط Bhumi وهمکاران با استفاده ازاستات روی وعصاره برگ گیاه *Catharanthus roseu* نانو ذرات اکسید روی سنتز کردند که سایز

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.10.4.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.10.28]

نانوذرات در محدوده ۲۳ تا ۵۷ نانومتر قرار داشت و از لحاظ شکل کروی بودند، علاوه بر این در تحقیق مذکور خواص ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی بر روی باکتریهای سودوموناس، استرپتوکوکوس، *اشرشیاکلی* و *باسیلوس تورنجینسیس* مورد ارزیابی قرار گرفت که به ترتیب بیشترین ا ثر ضد میکروبی بر روی سودوموناس و کمترین اثر ضد میکروبی بر روی *اشرشیا کلی* مشاهده شد(۲۹)، این در حالیست که در مطالعه ما نیز بیشترین اثر بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* دیده شد و کمترین اثر بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید، ولی بطور کلی قدرت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی در تحقیق ما بر اساس قطر هاله عدم رشد نسبت به تحقیق مذکور بالاتر بود.

همچنین در تحقیق دیگری که توسط Bala و همکاران انجام شد با استفاده از استات روی و عصاره برگ گیاه چای ترش(*Hibiscus subdariffa*) نانوذرات اکسید روی ساختند که سایز نانو ذرات در محدوده ۱۲ تا ۴۶ نانومتر قرار داشت(۳۰)، که تا حدودی با سایز نانودرات سنتز شده در تحقیق ما همپوشانی دارد، علاوه بر این اثرات ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی را بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی مورد ارزیابی قرار دادند که ثابت شد اثرات ضد میکروبی دارند که هم راستا با نتایج تحقیق ما بوده است. در مطالعه دیگری نیز که توسط Awwad و همکاران صورت پذیرفت با استفاده ازسولفات روی و عصاره برگ گیاه زیتون اقدام به بیوسنتز نانوذرات اکسید روی نمودند که مشخص شد شکل نانو ذرات بصورت نانوصفحات و Nano flower هایی با اندازه حدود ۵۰۰ نانومتر بودند(۳۱)، که در تحقیق ما چنین موردی مشاهده نشد و نانوذرات بشکل کروی و با اندازه حدود ۳۰ تا ۵۰ نانومتر بودند.

از طرفی در مطالعه دیگری با استفاده از عصاره برگهای گیاه *Costus pictus* نانو ذرات اکسید روی ساختند، نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی نشان داد که نانو ذرات با میانگین اندازه ۴۰ نانومتر و دارای اشکال هندسی شش وجهی و میله ای بودند. همچنین این نانوذرات اکسید روی بر روی باکتریهای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سوبتلیس* دارای اثرات ضد میکروبی بودند(۳۲)، که با مطالعه ما همپوشانی داشته، ولی از لحاظ شکل نانوذرات ارتباط معنی داری وجود ندارد که بی تردید با نوع گیاه مورد استفاده و ترکیبات موجود در عصاره گیاهی بی‌ارتباط نیست در همین راستا مطالعه دیگری با استفاده از عصاره برگهای گیاه *Parthenium hysterophorus* نانوذرات اکسید روی ساخته شد که محدوده اندازه نانوذرات ۴۵-۱۶ نانومتر بود که به اشکال کروی و شبه کروی و استوانه ای بودند و دارای اثرات ضد میکروبی بر روی باکتریهای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سوبتلیس* و *کلبسیلا پنومونیه* بودند(۳۳)، که با مطالعه ما همخوانی دارد. در مطالعه دیگری در ایران توسط Motakef-Kazemi و همکاران، نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره گیاه جعفری ساخته شد که قطر نانوذرات حدود ۵۰ نانومتر و به شکل کروی بودند و آنالیزDLS نانوذرات دارای پیک در ۵۰ نانومتر بود و از لحاظ اثر ضد میکروبی نانوذرات روی ساخته شده توانایی ضد میکروبی بر علیه اشرشیا کلی داشته اند(۳۴)، که تا حدود زیادی با مطالعه ما همخوانی داشته است.

در مطالعه دیگری توسط Upadhyaya و همکاران، نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره گیاه *Lawsonia inermis* ساخته شد و نتایج حاصل از SEM نشان داد که نانودرات سنتز شده دارای شکل شش وجهی و دارای سایز ۱۰۰ نانومتر هستند(۳۵)، که با مطالعه ما تفاوت قابل ملاحظه ای دارد که بی شک با تکنیک ساخت و نوع گیاه مورد استفاده و همچنین نوع ماده اولیه آنها که نیترات روی بوده است بی ارتباط نیست، بایستی خاطر نشان کرد که در تحقیقات مختلف در دنیا بیوسنتز نانوذرات اکسید روی توسط عصاره های گیاهی مختلف از جمله برگ آلوئه ورا، گل های گیاه شبدر قرمز و ریزوم زنجبیل انجام گرفته است(۳۵). در این مطالعه نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره آبی اکالیپتوس ملیودورا ساخته شدند که بیشترین اثر ضد باکتریایی را بر روی سودوموناس آئروژینوزا داشتند و کمترین تاثیر را روی باسیلوس سرئوس نشان دادند، از طرفی فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید روی، عصاره آبی اکالیپتوس و سولفات روی نیز با هم مقایسه شد که نانوذرات اکسید روی بیشترین تاثیر ضد باکتریایی را روی همه باکتریهای مورد آزمایش داشتند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان واحد اراک جهت حمایت از این تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.10.4.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.10.28]

Green synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Eucalyptus Mellidora Leaf Extract and Evaluation of its Antimicrobial Effects

B. Rafiee (MSc)[*1], S. Ghani (MSc)[2], D. Sadeghi (PhD)[3], M. Ahsani (BSc)[4]

1. Young Researchers and Elite Club, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, I.R.Iran
2.Department of Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
3. Biology Research Center, Faculty and Research Institute of Basic Sciences, Imam Hossein University of Technology, Tehran, I.R.Iran
4. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Arak University, Arak, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(10); Oct 2018; PP: 28-35
Received: Mar 25th 2018, Revised: Sep 5th 2018, Accepted: Sep 16th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Green production of nanoparticles is an environmentally friendly method in which natural solvents are used. Green nanoparticle synthesis methods have priority over chemical and physical methods due to the reduction of cost, time and energy. The purpose of this study was to biosynthesize zinc oxide nanoparticles and evaluate the antibacterial activity of these nanoparticles.

METHODS: In this experimental study, the extract of *Eucalyptus melliodora* was combined at a ratio of 1: 1 with 0. 1 M zinc sulfate and kept at room temperature for 15 minutes. Synthesis of zinc oxide nanoparticles was confirmed by spectrophotometric methods, mean diameter of nanoparticles meaturement, X-ray diffraction and electron microscopy (SEM). Then, the MIC of zinc oxide nanoparticles was measured on standard strains of Staphylococcus aureus 1431PTCC, Bacillus cereus 1015PTCC, Escherichia coli 1399PTCC and Pseudomonas aeruginosa 1571PTCC.

FINDINGS: The absorption peak of ZnO NPs was observed at of 350 nm. The SEM showed ZnO nanoparticles was spherical shape of size ranging from 30 to 50 nm. The highest MIC was observed for Pseudomonas aeruginosa with 0. 0019 mg / ml and the lowest MIC for Bacillus cereus with 0. 62 mg / ml. Also, in comparison with ZnO nanoparticles, Eucalyptus extract and Zinc sulfate had the most antimicrobial activity for zinc oxide nanoparticles and their MIC had significant difference in the effect on the bacteria tested ($p < 0.05$).

CONCLUSION: The results of this study showed biological nanoparticles of ZnO and aqueous extract of Eucalyptus as well as zinc sulfate have antimicrobial properties, but the most antimicrobial effects were observed by ZnO NPs.

KEY WORDS: *Anti-Bacterial Activity, Green synthesis, Zinc Oxide Nanoparticles.*

Please cite this article as follows:
Rafiee B, Ghani S, Sadeghi D, Ahsani M. Green synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Eucalyptus Mellidora Leaf Extract and Evaluation of its Antimicrobial Effects. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(8):22-7.

[*] **Corresponding Author: B. Rafiee (MSc)**
Address: Young Researchers and Elite Club, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, I.R.Iran
Tel: +98 86 33412251
E-mail: rafiee.17b@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.10.4.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.10.28]

References

1.Nagati V, Koyyati R, Donda MR, Alwala J, Kundle KR, Padigya PR. Green Synthesis and characterization of Silver nanoparticles from Cajanus cajan leaf extract and its antibacterial activity. Int J Nanomater Biostruc. 2012; 2(3): 39-43.

2.Atta AM, Al-Lohedan HA, Ezzat AO. Synthesis of silver nanoparticles by green method stabilized to synthetic human stomach fluid. Molecules. 2014;19(5):6737-53.

3.Poovizhi J, Krishnaveni B. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles synthesized from calotropis procera. Int J Pharmaceut Sci Drug Res. 2015; 7(5): 425-431.

4.Karimi J, Mohsenzadeh S. Plant synthesis of silver nanoparticles by Achilleawilhelmsii Pharmaceutical plant. Razi Journal of Medical Sciences. 2013; 20(111): 64-9.

5.Ghani S, Rafiee B, Sadeghi D, Ahsani M. Biosynthesis of Iron Nano-Particles by Bacillus Megaterium and Its Anti-Bacterial Properties. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(7):13-19. [In Persian]

6.Supraja S, Mohammed AS, Chakravarthy N, Jayaprakash PA, Elumalai S, Kalimuthu K, et al. Green synthesis of silver nanoparticles from Cynodon Dactylon leaf extract. Int J Chem Tech Res. 2013; 5(1):271-7.

7.Ramesh P, Rajendran A, Meenakshisundaram M. Green syntheis of zinc oxide nanoparticles using flower extract cassia auriculata. J NanoSci NanoTechnol. 2014; 2(1): 41-5.

8.Chandran SP, Chaudhary M, Pasricha R, Ahmad A, Sastry M. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using aloevera plant extract. Biotechnol Prog. 2006; 22(2):577-83.

9. Abbasifar A, Ghani S, Ahsani Irvani M, Rafiee B, Valizade Kaji B, Akbari A. Antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by using extracts of hedera helix. Zahedan J Res Med Sci. 2017;19(1):e5920.

10.Khatami M, Soltaninejad M, Kaikavoosi K. Biosynthesis of gold nanoparticles using persian clover seed extracts. Qom Univ Med Sci J. 2016;10(2):23-30. [In Persian]

11.Jamdagni P, Khatri P, Rana JS. Nanoparticles based DNA conjugates for detection of pathogenic microorganisms. Int Nano Lett. 2016; 6(3):139-46.

12. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. Pharm Res. 2016;33(10): 2373-87.

13. Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. J Adv Res. 2016; 7(1):17-28.

14.Handy RD, von der Kammer F, Lead JR, Hassellöv M, Owen R, Crane M. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. Ecotoxicology. 2008;17(4):287-314.

15.Han W, Yu Y, Li NT, Wang LB. Application and safety assessmentfor nano-composite materialsin food packaging. Chin Sci Bull. 2011;56(12):1216-25.

16.Zhao M, Huang J, Zhou Y, Chen Q, Pan X, He H, Ye Z. A single mesoporous ZnO/Chitosan hybrid nanostructure for a novel free nanoprobe type biosensor. Biosens Bioelectron. 2013;43(1):226-30.

17.Serpone N, Dondi D, Albini A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. Inorganica Chim Acta 2007;360(3):794-802.

18.Bhande RM, Khobragade CN, Mane RS, Bhande S. Enhanced synergism of antibiotics with zinc oxide nanoparticles against extended spectrum β-lactamase producers implicated in urinary tract infections. J Nanopart Res. 2013;15(1):1-13.

19.Chen T, Zhao T, Wei D, Wei Y, Li Y, Zhang H. Core-shell nanocarriers with ZnO quantum dots-conjugated Au nanoparticle for tumor-targeted drug delivery. Carbohydr Polym. 2013;92(2):1124-32.

20.Reeves JF, Davies SJ, Dodd NJ, Jha AN. Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO 2) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. Mutat Res. 2008;640(1-2):113-22.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.10.4.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.10.28]

21.Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Daskalakis N, Jeuken L, Povey M, et al. Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of Zno nanoparticles against E. Coli. J Nanopart Res. 2010;12(5):1625-36.
22.Sanaeimehr Z, Javadi I, Namvar F. Antiangiogenic and antiapoptotic effects of green-synthesized zinc oxide nanoparticles using Sargassum muticum algae extraction. Cancer Nanotechnol. 2018;9(1):3.
23.Jagtap UB, Bapat VA. Green synthesis of silver nanoparticles using Artocarpus heterophyllus lam. Seed extract and its antibacterial activity. Indust Crop Pro. 2013;46:132-7.
24.Pantidos N, Horsfall LE. Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. J Nanomed Nanotechnol. 2014;5(5):1-10.
25.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.
26.Awwad AM, Salem NM. A Green and facile approach for synthesis of magnetite nanoparticles. Nanosci Nanotechnol. 2012; 2(6):208-13.
27.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.
28.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.
29.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.
30.Bala N, Saha S, Chakraborty M, Maiti M, Das S, Basub R, Nandyc P. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Hibiscus subdariffa leaf extract: effect of temperature on synthesis, anti-bacterial activity and anti-diabetic activity. RSC Adv. 2015; 5(7):4993.
31.Awwad AM, Albiss B, Ahmad AL. Green synthesis, characterization and optical properties of zinc oxide nanosheets using Olea europea leaf extract. Adv Mat Lett. 2014; 5(9):520-4.
32. Suresh J, Pradheesh G, Alexramani V, Sundrarajan M, Hong S. Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticle using insulin plant (Costus pictus D. Don) and investigation of its antimicrobial as well as anticancer activities. Adv Nat Sci: Nanosci. Nanotechnol. 2018;9: 015008.
33.Datta A, Patra C, Bharadwaj H, Kaur S, Dimri N, Khajuria R. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using parthenium hysterophorus leaf extract and evaluation of their antibacterial properties. J Biotechnol Biomater. 2017; 7:271.
34. Hajiashrafi Sh, Motakef Kazemi N. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using parsley extract. Nanomed Res J. 2018;3(1): 44-50.
35.Upadhyaya H, Shome S, Sarma R, Tewari S, Bhattacharya M, Panda S. Green Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of ZnO Nanoparticles. Am J Plant Sci. 2018;9: 1279-91.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.10.4.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.10.28]