



سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره دو گونه نعنای خوراکی (M.spicata) و نعنای فلفلی (M.piperita) و بررسی اثرات ضد باکتریایی آن

رویا مرادی مجد، حمید دهقانزاده*، ظهرا ب اداوی

گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده	مقاله پژوهشی اصیل
مقدمه نانو ذرات نقره به عنوان ابزار دارویی برای عفونت‌ها در مقابل میکروب‌ها استفاده می‌شود. اغلب باکتری‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت پیدا کرده‌اند و در آینده نزدیک نیاز مبرم به جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها با مواد جدید دارای خاصیت ضد باکتریایی وجود دارد. در این پژوهش از عصاره آبی و متانولی دو گونه نعنای فلفلی و نعنای خوراکی جهت سنتز نانو ذرات نقره و بررسی اثر ضدباکتریایی آنها استفاده شد. مواد و روش‌ها از یک روش بیوسنتز خارج سلولی سازگار با محیط زیست یعنی عوامل احیاکننده عصاره نعنای خوراکی و نعنای فلفلی برای تولید نانو ذرات نقره استفاده شد. تولید نانو ذرات نقره از روش‌های تغییر رنگ، طیف‌سنجی مادون قرمز و اسپکتوفتومتری تایید گردید. فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها وجود نانوذرات نقره توسط حداکثر میزان جذب در ۴۲۰ نانومتر، تغییر رنگ تا قهوه‌ای تیره و طیف‌سنجی مادون قرمز مورد تایید قرار گرفت. نانو ذرات نقره سنتز شده با عصاره نعنای فلفلی و خوراکی بازدارندگی بهتری بر فعالیت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با باکتری اشرشیاکلی داشتند. در مورد محیط کشت استافیلوکوکوس اورئوس، عصاره آبی و الکلی با ۱۰ گرم ماده عصاره‌گیری شده، بترتیب بیشترین و کمترین قطر هاله عدم رشد را دارا بود. نتیجه‌گیری نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده به وسیله عصاره آبی نعنای خوراکی و نعنای فلفلی در برابر باکتری‌های آزمایش شده، فعالیت ضدباکتریایی خوبی داشته و می‌توانند در زمینه‌های مختلف به عنوان یک عامل ضدباکتری استفاده شوند. کلیدواژه‌ها نعنای خوراکی، نعنای فلفلی، سنتز سبز، نانو ذرات نقره، اثرات ضد باکتریایی	تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۸ *نویسنده مسئول: حمید دهقانزاده؛ گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. تلفن: ۰۳۱۴۵۸۲۳۰۲۲ پست الکترونیک: Dehghanzadeh@pnu.ac.ir



مقدمه

نانوتکنولوژی به علت تولید نانوذرات در اندازه، شکل، ترکیب شیمیایی و پراکنش متفاوت و کاربردهای بسیار آن‌ها برای بشر، حوزه تحقیقاتی جذابی به حساب می‌آید. امروزه نانوتکنولوژی به علت کاربرد وسیع و فراوان در علوم و صنایع با سرعت بالایی در حال رشد می‌باشد (۱). نانوذرات معمولاً خواص بهتری از نمونه‌های خالص همان عنصر از خود نشان می‌دهند، زیرا سطح ویژه بالاتری نسبت به ذرات درشت‌تر دارند. نانوذرات نقره به عنوان ابزار دارویی برای عفونت‌ها در مقابل میکروب‌ها استفاده می‌شود (۲). اغلب باکتری‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت پیدا کرده‌اند و در آینده نزدیک نیاز مبرم به جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها با مواد جدید دارای خاصیت ضدباکتریایی وجود دارد. نانوذرات نقره با غلظت پائین در محیط بدن غیر سمی هستند، پس می‌توانند گزینه مناسبی برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها به شمار آیند (۳).

به طور کلی سنتز نانو ذرات معمولاً به دو روش فیزیکی و شیمیایی انجام می‌شوند. سرعت تولید روش‌های فیزیکی برای دستیابی به سنتز نانو ذرات فلزی بسیار کم است و مهمتر از آن هزینه بسیار زیادی دارد (۴). در روش‌های سنتز شیمیایی، ثبات ذرات و تولید در مقیاس زیاد دشوار است. استفاده از گیاهان به علت سازگاری با محیط و فراوانی آن‌ها، معمولاً فاقد این مشکلات هستند. به همین دلیل تقاضا برای تولید نانوذرات با روش‌های دوستدار محیط زیست وجود دارد (۵). استفاده از گیاهان، عصاره گیاهی و یا بیوماس گیاهی می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های فیزیکی و شیمیایی این فرآیند محسوب شود. با توجه به این که سنتز نانوذرات از اجزای گیاه وقت‌گیر و نسبتاً دارای هزینه بالایی است، همچنین احاطه آنزیم‌ها و تخریب بافت سلولوزی گیاه نیازمند زمان زیادی است، تولید نانو ذرات

فلزی توسط عصاره‌های گیاهی به طور گسترده به عنوان یک روش ساده و علمی بیشتر مورد استفاده قرار گرفته است (۴).

پژوهشگران معتقدند ترکیباتی همچون اسیدهای آمینه، اسیدسیتریک، ترکیبات فنلی، ترپنوئیدها، ترکیبات هتروسیکلیک، آنزیم‌ها، پلی‌ساکاریدها، تانن و ساپون موجود در اندام‌ها و قسمت‌های مختلف گیاهان (برگ، دانه، میوه و ریشه) سبب کاهش یون‌های فلزی در فرایند سنتز نانو ذرات شده و باعث افزایش سلامت نانو ذرات تولیدی می‌شود (۶). گزارش‌های متعددی در رابطه با استفاده از سنتز زیستی نانوذرات نقره و فعالیت ضد میکروبی آن‌ها وجود دارد. اولین بار نانوذرات طلا با استفاده از عصاره گیاه شمعدانی سنتز شد (۷). تولید زیستی نانوذرات با استفاده از گیاهانی مانند *Artemisia nilagirica* (۸)، *Thymus kotschyanus* (۹) انجام شده است. تولید نانو ذرات زیرکونیوم از عصاره بلوط و اثرات ضد باکتریایی آن گزارش شده است (۳). همچنین تولید نانو ذرات طلا توسط گیاه سانسوریا گزارش شده است (۱۰). در تولید نانو ذرات نقره از عصاره اکالیپتوس بیان شد که نانوذرات نقره سنتز شده به وسیله عصاره آبی گل اکالیپتوس کامالدولنسیس فعالیت ضد باکتریایی خوبی در برابر باکتری‌های آزمایش شده داشت (۲). همچنین تولید نانوذرات نقره از عصاره گیاه نعناع جنس اسپیکاتا و پایداری بیشتر نانو ذرات نقره تولیدی از اکالیپتوس گزارش شده است (۱۱). در مطالعه‌ای، یون‌های طلا و نقره طی فرآیند بیوسنتز با استفاده از ترکیبات موجود در عصاره برگ دارچین به نانوذرات تبدیل شدند و احیای یون‌ها به ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره نسبت داده شد (۱۲).

نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) و نعناع خوراکی (*Mentha spicata* L.) از جمله گیاهان دارویی و معطری هستند که در حال حاضر در مناطق مختلف کشور کشت



مقطر مخلوط و در حمام آب جوش (۶۰ درجه سانتی گراد) به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و عصاره گیاهی با فیلتر واتمن فیلتر گردید. سپس در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. در نهایت مجدداً عصاره گیاهی با فیلتر واتمن، فیلتر و در دمای ۴ درجه سانتی گراد یخچال نگهداری شد.

سنتز نانوذرات نقره با استفاده از منبع گیاهی

جهت سنتز، دو حجم ۱/۵ و ۳ میلی لیتر از هر نمونه عصاره نعنای داخل فالكون‌های جداگانه ریخته شد. سپس به هر فالكون مقدار ۳۰ میلی لیتر محلول آبی نیترات نقره ۱ مولار برای کاهش یون‌های Ag^+ اضافه شد و فالكون‌ها در داخل انکوباتور ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. غلظت مطلوب نیترات نقره برای سنتز نانوذرات نقره مورد استفاده قرار گرفت (۲).

اسپکتروفتومتری نانوذرات نقره

کاهش یون‌های فلزی Ag^+ توسط عصاره گیاهی با اندازه‌گیری طیف UV-visible پس از گذشت ۲۴ ساعت از واکنش مشاهده شد. محلول واکنش به نسبت ۱:۴ با توجه به نوع حلال (آب مقطر یا متانول) رقیق و سپس میزان جذب محلول در دامنه ۹۰۰-۲۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (Shimadzu) اندازه‌گیری شد.

طیف‌سنجی مادون قرمز^۱

طیف‌های مادون قرمز را می‌توان برای هر سه حالت ماده یعنی گاز، مایع و جامد به دست آورد. برای هر کدام از این حالات، روش آماده‌سازی نمونه متفاوت است. برای طیف گرفتن از نمونه سنتز شده در این پژوهش، ابتدا ۲ گرم برمید پتاسیم را داخل هاون چینی ریخته و خوب ساییده تا کاملاً پودر و یکدست شد. سپس مقداری از آن را در قالب

می‌شود. برگ‌های نعنای شامل ۴-۵ درصد روغن فرار هستند که از ۷۸-۵۰ درصد منتول آزاد و ۲۰-۵ درصد منتول ترکیب شده با سایر ترکیبات تشکیل شده است. این گونه تولیدکننده ترپن‌ها و انواع ترکیبات دیگر هستند که این ترکیبات را به طور عمده در غدد اپیدرمی برگ‌ها، ساقه‌ها و اندام‌های زایشی خود ذخیره می‌کنند (۱۳). عمده‌ترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس نعنای منتول است. منتول به عنوان یک ترکیب ضد عفونی کننده قوی به کار برده می‌شود (۱۴). در طب سنتی از گیاه نعنای به عنوان ضد نفخ، خنک‌کننده و مسکن استفاده می‌شود و در صنایع دارویی دارای کاربردهای فراوان می‌باشد. در این پژوهش از عصاره آبی و متانولی در دو گونه نعنای فلفلی و نعنای خوراکی برای تولید سبز نانوذرات نقره و بررسی اثر ضدباکتریایی ذرات تولید شده استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و تهیه عصاره گیاه نعنای

گیاه نعنای خوراکی (*M. spicata* L.) و نعنای فلفلی (*M. piperita* L.) از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه صنعتی اصفهان جمع‌آوری و تهیه شد. گیاهان در کرت‌های یک متر مربعی و از طریق تکثیر ریزوم کشت داده شدند. نمونه‌های دو گونه در سایه کاملاً خشک و به وسیله آسیاب پودر شدند. دو گونه نعنای در دو غلظت ۱۰ و ۳۰ گرم ماده خشک عصاره‌گیری گردید. روش عصاره‌گیری شامل دو روش یکی با استفاده از متانول که در این روش به مدت سه روز و در سه نوبت عصاره‌گیری انجام و عصاره با استفاده از فیلتر و با مکش خشک گردید. در روش دوم، عصاره‌گیری با آب که در این روش، برگ‌های هر دو گونه با آب مقطر شسته شده و به مدت ۵ روز در سایه خشک گردید. پودر بدست آمده در درجه حرارت ۱۲۱ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. ۲۰ گرم از این پودر با ۲۰۰ میلی لیتر از آب

1. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy: FTIR

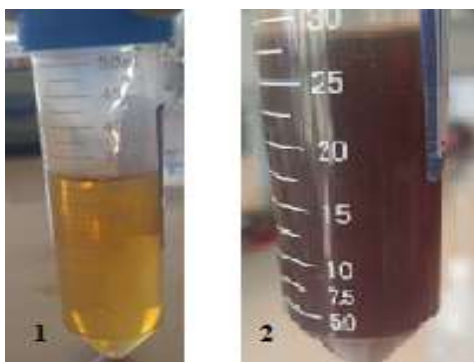


برای مقایسه اثرات عصاره از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار^۱ و در سطح احتمال ۵ درصد ($P=0.05$) استفاده گردید.

یافته‌ها

نتایج سنتز نانوذرات

در انجام این پژوهش، پس از اضافه کردن محلول آبی نیترات نقره به عصاره‌های متانولی و آبی گیاه نعناع، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از انکوبه کردن نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رنگ نمونه‌ها تغییر کردند. در اثر احیای یون‌های نقره و تولید نانو ذرات، رنگ نمونه‌ها از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای تیره تا سیاه رنگ در اثر برهم کنش عصاره گیاهی و محلول نمک نقره تغییر یافت (شکل ۱). احیای کامل یون‌های نانوذرات نقره با تغییر رنگ محیط نشان داده شد. رنگ محلول با افزودن عصاره گیاهی به محلول نیترات نقره به رنگ قهوه‌ای تا سیاه تغییر نمود که نشان دهنده احیای نیترات نقره و تشکیل نانو ذرات نقره در محلول است.



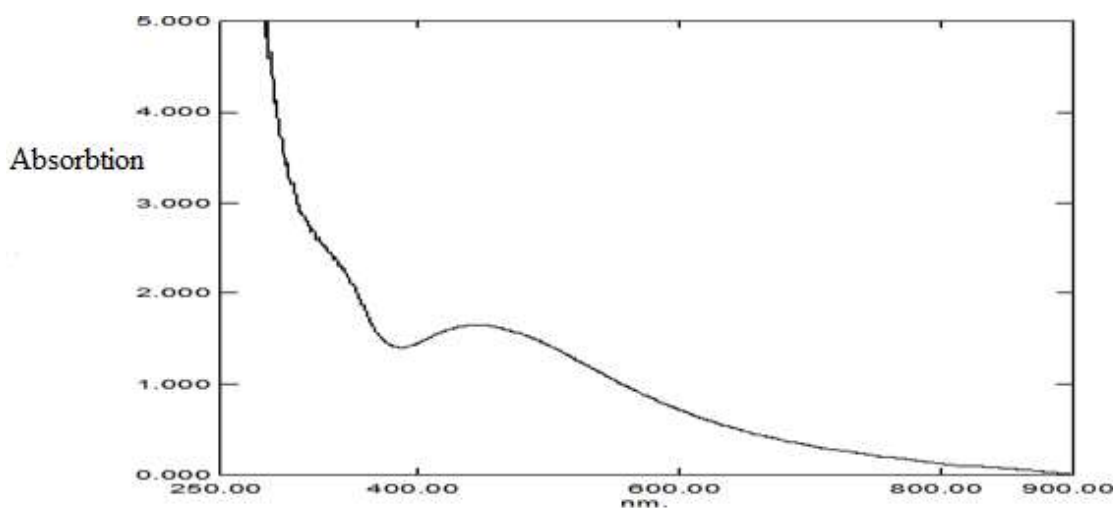
شکل ۱ - تغییر رنگ واکنش تولید نانوذرات نقره با استفاده از عصاره نعناع؛ ۱: قبل از واکنش و ۲: بعد از واکنش

فلزی مخصوص ریخته و داخل دستگاه پرس هیدرولیک تحت فشار قرار داده و ۵ دقیقه بعد از دستگاه خارج شد تا یک قرص شفاف به دست آمد. پس از آن، قرص برمید پتاسیم تولید شده را بر روی جایگاه دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز قرار داده و یک قطره از محلول سنتز شده را بر روی قرص برمید پتاسیم ریخته و اقدام به گرفتن طیف گردید.

بررسی خواص ضدباکتریایی

باکتری‌های استاندارد گرم منفی *Escherichia coli* و گرم مثبت *Staphylococcus aureus* از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری گردید. باکتری‌ها در شرایط استریل بر روی محیط نوترین آگار کشت داده شدند. آثار ضد باکتریایی نانوذرات نقره بر روی باکتری‌ها با استفاده از روش دیسک فیوژن بررسی شد. در این روش، ابتدا دیسک‌های بلانک در محلول کلونی‌دهی نانوذرات نقره با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زیر هود قرار داده شدند تا دیسک‌ها کاملاً خشک شوند. پس از خشک شدن دیسک‌ها، در فاصله معینی از یکدیگر بر روی محیط مولر هینتون آگار آغشته به باکتری مورد نظر قرار داده شد. یک دیسک آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. بعد از قرار دادن دیسک‌ها، درب پتری دیش‌ها را بسته و سپس محیط‌های کشت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، قطر منطقه مهارتی اندازه‌گیری شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۱ انجام گرفت.

1. Least Significant Difference; LSD

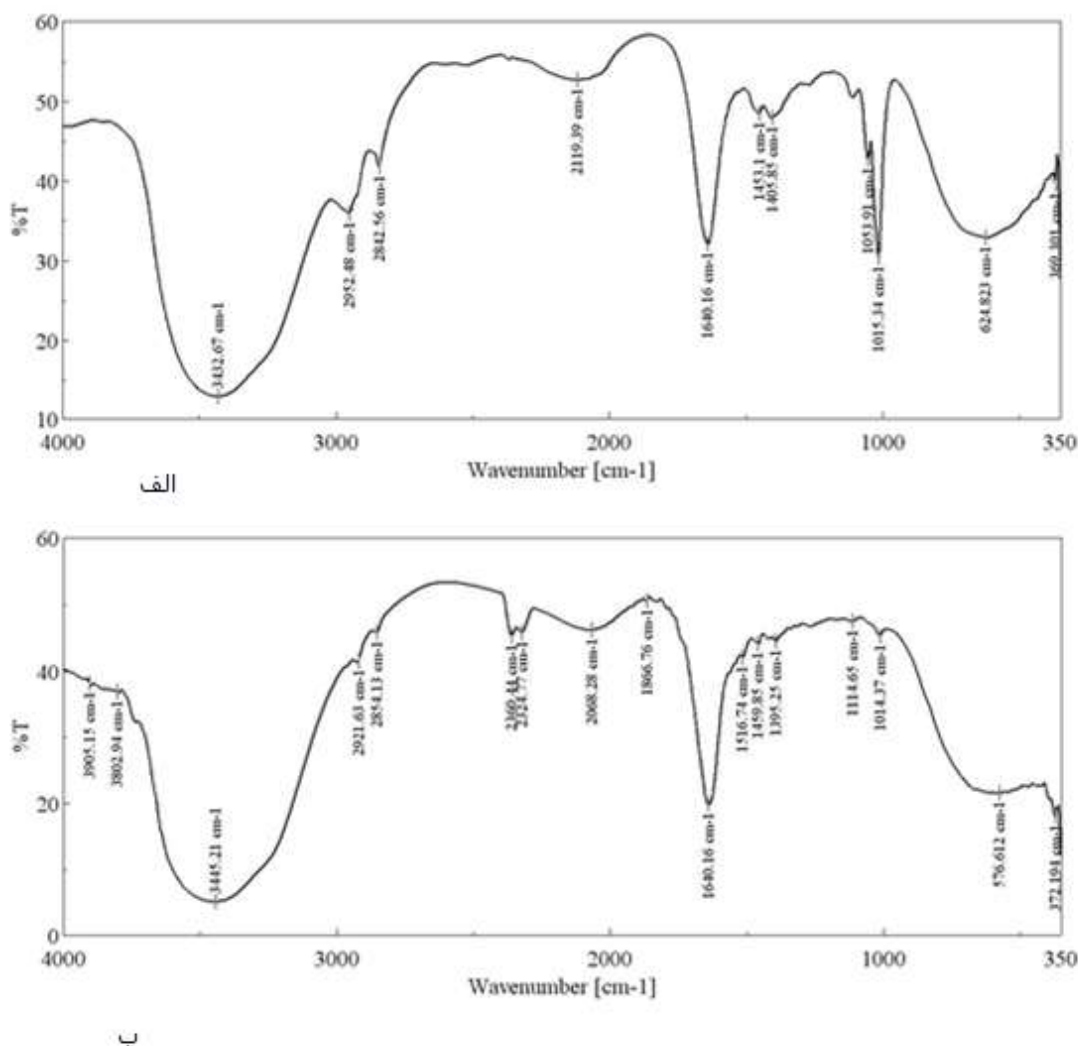


شکل ۲- طیف اسپکتروفتومتری نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گیاه نعنای

یا لیپیدهای عصاره است (۱۶). عصاره بعد از احیا نیترات نقره، طیف‌های FTIR مشابه قبل از احیا نمک نقره ولی با شدت کمتر را نشان داد. این کاهش پیک نشان از فعالیت انواع مختلف ترکیبات فنلی، الکلی، قندها و پروتئین‌های موجود در عصاره است. بعلاوه حضور باند جدید در ۱۸۶۶، ۲۰۶۸، ۱۵۱۶، ۱۴۵۹، ۱۳۹۵ و پیک ۱۰۱۴ افزایش یافت (شکل ۳). با توجه به مشابه بودن الگوی طیفی مادون قرمز برای عصاره گیاه و نانوذرات نقره می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات حاوی ترکیبات موجود در عصاره هستند که به صورت لایه‌ای اطراف نانوذرات قرار می‌گیرند. ساز و کار مشخصی که بتواند تشکیل نانوذرات را طی سنتز توضیح دهد، هنوز شناخته نشده است. اما در مورد سنتز سبز نقره اعتقاد بر این است که سطح فعال مولکول‌های ترپنوئیدی باعث کاهش یون‌های فلزی و تثبیت نانوذرات می‌شود.

تایید سنتز نانوذره با روش اسپکتروفتومتری فرابنفش
پس از ایجاد تغییر رنگ در محیط واکنش، بررسی اسپکتروفتومتری انجام شد. ملاحظه شد که نانوذرات نقره حاصل در طول موج ۴۲۰ نانومتر (رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات نقره) دارای بیشترین جذب بود (شکل ۲).

تایید سنتز نانوذرات با روش طیف سنجی مادون قرمز
پیک پهن و جذب شدید در محدوده ۳۴۰۰ مربوط به نوسانات کششی گروه عاملی هیدروکسیل (OH) در الکل‌ها، فنل‌ها و اسیدکربوکسیلیک است. باند ۲۹۳۲ می‌تواند مربوط به نوسانات کششی آمین‌های نوع دوم (N-H) آمیدها یا نوسانات کششی C-H زنجیره‌های هیدروکربنی باشد. باند 1600 cm^{-1} می‌تواند مربوط به باند آمید پروتئین‌ها و یا نوسانات کششی C-O آمینواسیدهای موجود در عصاره باشد (۱۵). باند ۱۴۰۵ مربوط به پیوند CH-CH موجود در قندها

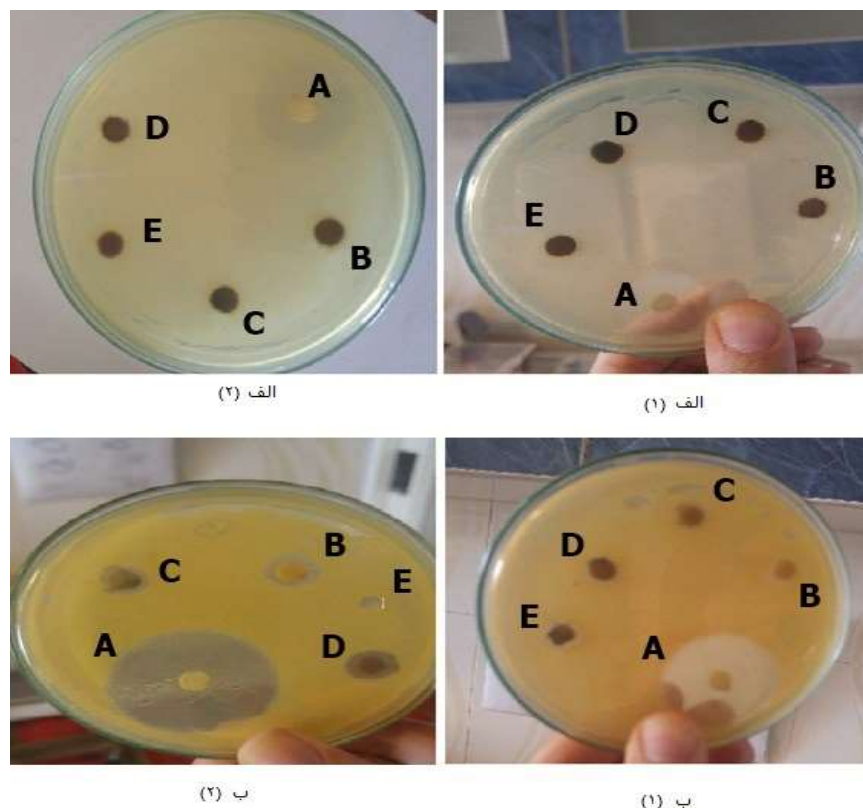


شکل ۳- طیف‌سنجی مادون قرمز (الف) عصاره برگ نعناع، (ب) پس از انجام واکنش عصاره با نیترات نقره

فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده شد، محلول‌های حاوی نانوذرات نقره دارای فعالیت ضد میکروبی بر علیه باکتری-های آزمایش بود و هاله قابل تشخیص که حاصل جلوگیری از رشد میکروب توسط نانوذرات نقره است در تیمارهای اصلی مشاهده شد و این در حالی است که در شاهد هیچ هاله‌ای مشاهده نشد.

فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره از طریق منطقه مهار شده تخمین زده شد. برای هر عصاره ۳ تکرار در نظر گرفته شد. فعالیت ضد میکروبی نانوذرات تولید شده نیز با مشاهده و اندازه‌گیری هاله محدودیت رشد باکتری در اطراف دیسک‌های حاوی محلول نانوذرات نقره برای میکروارگانیسم‌های آزمایش شده به اثبات رسید ($P=0.05$).



شکل ۴- هاله عدم رشد در محیط کشت با کاربرد عصاره *M. spicata* (۱) و *M. piperita* (۲). الف) اشرشیاکلی (ب) استافیلوکوکوس اورئوس. A: تتراسیکلین، B: ۳۰ گرم عصاره متانولی، C: ۳۰ گرم عصاره آبی، D: ۱۰ گرم عصاره آبی، E: ۱۰ گرم عصاره متانولی

عصاره گیری ۳۰ گرم با استفاده از متانول بود و در مورد عصاره آبی با میزان ۱۰ گرم ماده عصاره گیری، کمترین میزان قطر هاله عدم رشد را دارا بود. در مورد محیط کشت استافیلوکوکوس اورئوس، عصاره آبی با ۱۰ گرم ماده عصاره-گیری شده، بیشترین (۶ سانتی متر) و عصاره متانولی با ۱۰ گرم ماده عصاره گیری شده، کمترین (۱/۵ سانتی متر) میزان قطر هاله عدم رشد را دارا بود ($P=0/05$).

نتایج حاصل از تست هاله نشان داد که قطر هاله تشکیل شده برای باکتری اشرشیاکلی نسبت به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس کمتر بود ($P=0/05$). همچنین نتایج نشان داد که گونه *M. spicata* و گونه *M. piperita* دارای فعالیت ضدباکتریایی بودند.

نانو ذرات نقره سنتز شده با عصاره نعناع فلفلی و خوراکی بازدارندگی بهتری بر فعالیت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با باکتری اشرشیاکلی داشتند (جدول ۱ و ۲). با توجه به نتایج جدول ۱، در مورد اشرشیاکلی در گونه *M. spicata* تفاوتی در نوع حلال و میزان ماده مورد استفاده جهت عصاره گیری در قطر هاله عدم رشد وجود نداشت و در مورد استافیلوکوکوس اورئوس نیز با استفاده از حلال آبی و ۳۰ گرم وزن گیاه عصاره گیری شده، دارای بیشترین قطر هاله عدم رشد و با حلال متانول و ۳۰ گرم ماده عصاره گیری شده دارای کمترین میزان قطر هاله عدم رشد را دارا بود. در مورد گونه *M. piperita* با توجه به جدول ۲ در محیط کشت اشرشیاکلی، بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد مربوط به



جدول ۱- قطر هاله عدم رشد (سانتی متر) در گونه *M. spicata* با استفاده از حلال آب و متانول^۱

<i>M. spicata</i> (30g)+Methanol	<i>M. spicata</i> (30g)+H ₂ O	<i>M. spicata</i> (10g)+Methanol	<i>M. spicata</i> (10g)+H ₂ O	Agno ₃	تتراسیکلین	میکروارگانیزم
-b	۱b	۱b	۱b	-	۱۱	اشرشیاکلی
۱/۵a	۵a	۴a	۴a	-	۱۷	استافیلوکوکوس اورئوس

۱: میانگین‌های هر ستون که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری بر اساس آزمون LSD فاقد اختلاف معنی‌داری هستند (P=۰/۰۵).

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد (سانتی متر) در گونه *M. piperita* با استفاده از حلال آب و متانول^۱

<i>M. piperita</i> (30g)+Methanol	<i>M. piperita</i> (30g)+H ₂ O	<i>M. piperita</i> (10g)+Methanol	<i>M. piperita</i> (10g)+H ₂ O	Agno ₃	تتراسیکلین	میکروارگانیزم
۱b	۰/۵b	۰/۵b	-b	-	۱۱	اشرشیاکلی
۲/۵a	۲a	۱/۵a	۶a	-	۱۷	استافیلوکوکوس اورئوس

۱: میانگین‌های هر ستون که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری بر اساس آزمون LSD فاقد اختلاف معنی‌داری هستند (P=۰/۰۵).

بحث

در سالیان اخیر مقاومت گسترده باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌ها سبب شد تا محققین به دنبال راهکاری مناسب برای کشف مواد جایگزین آنتی بیوتیک‌ها باشند. بیوسنتز نانوذرات با استفاده از عوامل بیولوژیکی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، اکتینومیست‌ها، مخمرها، جلبک‌ها و گیاهان ثبت شده است (۱۷). سنتز نانوذرات نقره از محلول نیترات نقره و با استفاده از نعنای خوراکی و نعنای فلفلی با تغییر رنگ محلول شناسایی شد. در این تحقیق تغییر رنگ مشاهده شده از زرد کم رنگ به قهوه‌ای تیره تا سیاه در اثر برهمکنش عصاره گیاهی و محلول نمک نیترات نقره با نتایج حاصل از پژوهش احمد^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۰ و رحمتیان^۲ و همکاران در سال ۲۰۲۰ مشابه بود و اولین نشانه از تولید نانوذرات نقره محسوب می‌شود (۳، ۱۱).

طیف جذبی نانوذرات نقره تشکیل شده در محیط واکنش نشان داد که پیک در محدوده ۴۲۰ نانومتر بوده که زمینه مناسب برای تشکیل نانوذرات نقره را فراهم می‌کند (۱۱). تغییر رنگ و طیف جذبی حاصله از اسپکتروفتومتری محلول عصاره گیاهی و نیترات نقره و وجود پیک جذبی قوی در

حدود ۴۲۰ نانومتر تأییدی بر تولید نانوذرات نقره می‌باشد که بسیار مشابه نتایج روپان^۳ و همکاران در سال ۲۰۱۳ می‌باشد (۱۸). در بررسی بیوسنتز نانوذرات با *M. piperita* نیز بیشترین جذب نوری را در محدوده ۴۵۰-۴۰۰ نانومتر گزارش شده است (۱۹). همچنین در تحقیق دیگر در بررسی *M. asaitica* بیشترین جذب نوری در محدوده ۴۵۰-۴۰۰ اعلام که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد (۲۰). تغییر رنگ و پیک مشاهده شده در طول موج بین ۴۰۰ تا ۴۲۰ نانومتری در طیف اسپکتروسکوپی مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی ناشی از نوسانات جمعی الکترون‌های آزاد القا شده به وسیله تعامل با میدان الکترومغناطیسی است که برای هر نوع ذره و در هر اندازه، اختصاصی و مختص خود آن نانوذرات می‌باشد (۱۱).

بسیاری از عصاره‌های گیاهی با توجه به وجود ترپنوئیدها و احیا قندها در آن‌ها، می‌توانند در سنتز نانو ذرات فلزی مورد استفاده قرار گیرند (۲۱). متابولیت‌هایی در عصاره این گیاه حضور دارند که به‌عنوان پایدار کننده و کاهنده عمل می‌کنند. بنابراین، عصاره برگ نعنای دارای عامل کاهنده خوبی برای سنتز نانو ذرات نقره است. می‌توان ساز و کار مربوط را

1. Ahmad
2. Rahmatyian

3. Roopan



این گونه توجیه کرد که پس از پراکنده شدن یون‌های نقره در عصاره آبی نعناع، کمپلکس (نعناع- Ag^+) تشکیل می‌شود. در سنتز نانوذرات نقره حاصل از عصاره رزماری، طیف مادون قرمز وجود آمین‌های نوع اول و دوم به عنوان ترکیبات آلی در عصاره را نشان داد (۲۲).

اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره توسط بسیاری از محققان مورد بررسی قرار گرفته و پتانسیل موثر آن‌ها بر علیه طیف وسیعی از میکروب‌ها از جمله باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها به اثبات رسیده است (۲۳). تاکنون نانوذرات نقره توانایی بالاتری برای مهار رشد میکروبی نسبت به عصاره‌های آبی نشان داده‌اند. علی‌رغم استفاده گسترده از نانوذرات نقره، روش فعالیت میکروارگانیسم‌ها به طور کامل شناخته شده نیست. با این حال، گزارش‌ها حاکی از آن است که نانوذرات نقره به دلیل اندازه کوچک به راحتی وارد سلول‌های باکتری می‌شوند و بر روند فرایندهای داخل سلولی و پروتئین مانند سنتز RNA و DNA تاثیر می‌گذارند. علاوه بر این، فرض براین است که یون‌های نقره (به ویژه Ag^+) حاصل از نانوذرات نقره قادر به برهمکنش با اجزای فسفردار DNA یا واکنش با پروتئین‌های گوگردی هستند که منجر به توقف حیات سلولی و در نهایت مرگ سلول می‌شود (۲۴، ۲۵). نتایج نشان داد که گونه *M. spicata* و گونه *M. piperita* دارای فعالیت ضد باکتریایی هستند. تاثیر کمتر فعالیت ضد میکروبی نانوذرات بر علیه باکتری‌های اشرشیاکلی نسبت به باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس گزارش شده است (۴).

در یک بررسی با استفاده از اسانس *M. spicata* بر روی هشت سویه باکتری، کمترین حساسیت در کبسیلاپنومونیه و استافیلوکوکوس اورئوس وجود داشته است (۲۶)، در حالی که در پژوهش حاضر، میزان حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به عصاره *M. spicata* و *M. piperita* بیشتر بود. همچنین در بررسی خاصیت آنتی باکتریال عصاره *M.*

asiatica، گزارش شد که فعالیت ضد میکروبی عصاره بر روی باکتری اشرشیاکلی بیشتر از استافیلوکوکوس اورئوس بود (۲۱). همچنین در مطالعات دیگری بر روی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره علیه باکتری‌هایی مانند اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس گزارش شد که تاثیر مهارکنندگی بر باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت چشمگیرتر بود (۲۷). این مطالعات ابراز داشته‌اند که تفاوت بین باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در مقابل نانوذرات نقره به ساختار دیواره سلولی آن‌ها مربوط می‌شوند (۲۸). یکی از علل حساسیت پایین‌تر اشرشیاکلی می‌تواند به این دلیل باشد که غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی چون اشرشیاکلاهی به‌طور غالب از لیپو پلی- ساکاریدی محکم تشکیل شده‌اند که سد مقاومی در برابر نانوذره محسوب و سبب محدود کردن انتشار اجزاء هیدروفوبیک عصاره‌ها به دیواره سلول می‌گردد (۲۹).

محدودیت عمده این تحقیق عدم اندازه‌گیری خاصیت ضد میکروبی نانوذرات با استفاده از روش تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی به دلیل کم بودن نمونه‌ها بود. همچنین از دیگر محدودیت‌های این تحقیق، پراکنش زیاد نانوذرات در اندازه‌های مختلف بود که با روش‌های مختلف از قبیل تغییرات دما، مدت زمان، غلظت‌های مختلف و برهمکنش محلول نمکی و عصاره گیاهی می‌توان دامنه تغییرات اندازه نانوذرات را کاهش و به یک شرایط بهینه دست پیدا کرد.

نتیجه‌گیری

طور کلی نتایج این پژوهش پتانسیل بالای عصاره نعناع خوراکی و نعناع فلفلی را در احیای یون‌های فلزی نقره و تبدیل آنها به اتم‌های نقره در ابعاد نانومتریکی نشان داد. وجود فعالیت ضد میکروبی بالای نانوذرات نقره سنتز شده به ویژه علیه باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس، استفاده از آنها در زمینه‌های مختلف به منظور از بین بردن



میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا پیشنهاد می‌شود. برای مشخص کردن نحوه عمل تولید نانوذرات نقره توسط گیاه و مکانیسم فعالیت ضد میکروبی این ذرات، اطلاعات بیشتری مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم

رویا مرادی مجد، دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان با راهنمایی آقایان دکتر حمید دهقان‌زاده و دکتر ظهرا ب اداوی بوده که در تیرماه ۱۳۹۷ دفاع گردیده است.

تعارض منافع

این تحقیق تعارض منافع ندارد.

References

1. Kaviya S, Santhanalakshmi J, Viswanathan B, Muthumary J, Srinivasan K. Biosynthesis of silver nanoparticles using Citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity. Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 2011. 79:594-598. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.03.040>
2. Dolatabadi S, Emrani S, Mehrafuz E, Zhiani R. Green synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles using *Eucalyptus camaldulensis*. J Neyshabur Univ Med Sci. 2017; 5 (3): 74-85. [Persian]. URL: <http://journal.nums.ac.ir/article-1-398-fa.html>
3. Ahmad N, Sharma S, Alam MK, Singh V, Shamsi S, Mehta B, Fatma A. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2010 81, 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.06.029>
4. Mousavi S, Mombeni-Goodajdar B. Green Synthesis of ZrO₂ Nanoparticles Using Extract of Oak Plant and its Antimicrobial Activity. J. Of Nanomat. 2021.13(45): 39-48. [Persian]. http://nm.iau-shahrood.ac.ir/article_680107.html
5. Ahmad N, Sharma S. Green synthesis of silver nanoparticles using extracts of *Ananas comosus*. Green and Sustainable Chemistry. 2012. 2(04):141. DOI: [10.4236/gsc.2012.24020](https://doi.org/10.4236/gsc.2012.24020)
6. Oxana V, Kharissova HV, Rasika Dias Boris I, Kharisov BOP, Victor M, Jiménez P. The greener synthesis of nanoparticles. Trends in Biotech. 2013. 31 (4): 240-248. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.003>
7. Bugrov AN, Almjashveva OV. Effect of hydrothermal synthesis conditions on the morphology of ZrO₂ nanoparticles. Nanosys: Physics, Chemi, Mathe. 2013. 4(6):810-815. <http://nanojournal.ifmo.ru/.../paper08>
8. Vijayakumar M, Priya K, Nancy F, Noorlidah A, Ahmed A. Biosynthesis, characterisation and antibacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Artemisia nilagirica*. Indus Crops and Prod. 2013. 41: 235-240. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.017>
9. Hamelian M, Zangeneh MM, Amisama A, Varmira K, Veisi H. Green synthesis of silver nanoparticles using *Thymus kotschyanus* extract and evaluation of their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects. Appl Organometal Chem. 2018. 32:e4458. <https://doi.org/10.1002/aoc.4458>
10. Peyvandi S. Biosynthesis of gold nanoparticles by *Sansevieria* (*Sansevieria cylindrica* L.). (Dissertation for Master of Science Education). Payame Noor University. 2018. [Persian].
11. Rahmatiyani M, Dadmeh M, Tavassoli M. Biological synthesis of silver nanoparticle based on *Eucalyptus obliqua* and *Mentha spicata* plant extracts and evaluation of their physical properties. Crop Biotech. 2020 9(4): 61-70. [Persian]. http://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/article_7311.html



12. Huang J, Li Q, Sun D, Lu Y, Su Y, Yang X, Wang H, Wang Y, Shao W, He N, Hong J, Chen C. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. Nanotech. 2007. 18: 105104. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/10/105104>
13. Karimi J, Mohsenzadeh S. Plant synthesis of silver nanoparticles by *Achillea wilhelmsii* Pharmaceutical plant. Razi J. Med. Sci. 2013. 20: 64-69. <http://rjms.iums.ac.ir/article-1-2720-en.html>
14. Dai J, Orsat V, Raghavan GSV, Yaylayan V. Investigation of various factors for the extraction of peppermint (*Mentha piperita* L.) Leaves. J. of. Food. Engin.. 2010. 96: 540 – 3. DOI: [10.1016/j.jfoodeng.2009.08.037](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.037)
15. Hemmalakshmia S, Priyangaa S, Kanakasabapathi D. Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy Analysis of *Erythrina variegata* L. 2017. J. Pharm. Sci. & Res. 9(11): 2062-2067 <https://www.jpsr.pharmainfo.in/Documents/Volumes/vol9Issue11/jpsr09111718.pdf>
16. Ashokkumar R, Ramaswamy M. Phytochemical Screening by FTIR Spectroscopic Analysis of Leaf Extracts of Selected Indian Medicinal Plants. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sc. 2014. 3, 395-406. <https://www.ijcmas.com/vol-3-1/R.Ashokkumar%20and%20M.%20Ramaswamy.pdf>
17. Kaushika N, Thakkar MS, Snehit S, Mhatre RY, Parikh M.S. Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomedicine: NBM. 2010. 6(2):257-62. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002>
18. Roopan SM, Madhumitha G, Rahuman AA, Kamaraj C, Bharathi A, Surendra TV. 2013. Low-cost and eco-friendly phyto-synthesis of silver nanoparticles using *Cocos nucifera* coir extract and its larvicidal activity. Ind. Crops Prod. 2013. 43:631-635. DOI:[10.1016/j.indcrop.2012.08.013](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.013)
19. Kumar B, Shukla AK, Samad A. Development and characterization of the menthofuran-rich inter-specific hybrid peppermint variety CIMAP-Patra. Mol breeding. 2014. 34(2): 717-724 <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11032-014-0069-4>
20. Sarkar D, Paul G. Green Synthesis of Silver Nanoparticles using *Mentha siatica* (Mint) Extract and Evaluation of their Antimicrobial Potential. Int. J. Curr. Res. Biosci. Plantbiol. 2017. 4(1): 77-82. <http://ijcrbp.com/abstractview.php?ID=230&vol=4-1-2017&SNo=9>
21. Song W, Zhang J, Guo J, Zhang J, Ding F, Li L, Sun Z. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. Toxicol lett. 2010. 199(3): 389-397. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427410017285?via%3Dihub>
22. Heydari R, Rashidpour M, Azadpour M. Green Synthesis of Silver nanoparticles Using Aqueous Extract of *Rosmarinus Officinalis* L.: Synthesis and Antibacterial Activitie. J. Of Nanomat. 2016. 8(26):99-106. [Persian]. http://nm.iau-shahrood.ac.ir/article_540554.html
23. Nanda A, Saravanan M. Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and Its Antimicrobial Activity against MRSA and MRSE. Nanomedicine: NBM. 2009. 5, 452-456. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2009.01.012>
24. Kim SH, Lee HS, Ryu DS, Choi SJ, Lee DS. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Korean J Microbiol Biotech. 2011. 39(1):77-85. http://faratarjome.ir/u/media/shopping_files/store-EN-1482649231-9260.pdf
25. Ravishankar Rai V, Jamuna Bai A. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials, science against microbial pathogens: communicating current research and echnological advances. In: Méndez-Vilas A, editor. Formatex, Microbiology Series. 2011. 3(1):197-209. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.459.8922&rep=rep1&type=pdf>



26. Zare Bidaki M, Arab M, Khazaei M, Afkar E. Anti-bacterial effect of *Mentha spicata* L. essential oil on eight standard species of gastrointestinal pathogens. J Birjand Univ Med Sci. 2014. 21 (3) :274-28. [Persian]. URL: <http://journal.bums.ac.ir/article-۱-۱۶۸۰-fa.html>
27. Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine: NBM. 2012. 8(1): 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.007>
28. Vankar PS, Shukla D. Biosynthesis of silver nanoparticles using lemon leaves extract and its application for antimicrobial finish on fabric. Appl Nanosci. 2012. 2: 163-168. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13204-011-0051-y>
29. Salmani M, Mirhosseini M, Moshtaghi Laregani M, Akrami KH. Survey of Silver Nanoparticles Antibacterial Activity Against Gram-Positive and Gram-negative Bacteria in Vitro . J. Tolooebehdasht Sci. 2017. 15 (1) :74-84. URL: <http://tbj.ssu.ac.ir/article-1-1636-fa.html>



Green synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles using *Mentha piperita* L and *Mentha spicata* L. extracts.

Roya Moradi Majd, Hamid Dehghanzadeh*, Zahrab Adavi

Department of Agricultural Sciences, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

Original Article

Received: 22 Aug 2021

Accepted: 29 Des 2021

*Corresponding Author:

Hamid Dehghanzadeh,
Departement of Agricultural
Sciences, Payame Noor
University (PNU), Tehran,
IRAN

TEL: 03145823022

Email:

Dehghanzadeh@pnu.ac.ir

ABSTRACT

Introduction

Silver nanoparticles (AgNPs) are used as a medicinal tool for infections against microbes. Most bacteria have been resistant to antibiotics and in the near future, there is an urgent need to replace antibiotics with new substances with antibacterial properties. This study aimed to the biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using aqueous and methanol extract of *Mentha piperita* L and *Mentha spicata* L and determined of antibacterial activity of produced AgNPs.

Materials and Methods

An environmentally friendly extracellular biosynthetic technique was used for the production of AgNPs. The reducing agents used to produce the nanoparticles were from the aqueous and methanol extract of *Mentha piperita* L and *Mentha spicata* L. The AgNPs were characterized by color changes, FTIR analysis, and UV-visible spectroscopy. The antibacterial activity of AgNPs was investigated through bacteria disc fusion assays.

Results

An absorption peak at 420 nm and the color change to dark brown were corresponding to the plasmon absorbance of AgNPs and then were performed by the FTIR method. Silver nanoparticles synthesized with *Mentha piperita* L and *Mentha spicata* L extracts against *Staphylococcus aureus* had better inhibitory activity than *Escherichia coli*. In the case of *Staphylococcus aureus* culture medium, aqueous and alcoholic extracts with 10 gr of extracted material, had the highest and lowest diameter of growth inhibition zone, respectively (P=0.05).

Conclusion

The results confirmed that extracellular synthesis of AgNPs mediated by *Mentha piperita* L and *Mentha spicata* L. extract indicated a good bactericidal activity against the tested bacteria and can be used in various fields as an antibacterial agent.

Keywords

Mentha piperita L, *Mentha spicata* L, Green synthesis, AgNPs, Antibacterial effect

► Please cite this article as: Moradi Majd R, Dehghanzadeh H, Adavi Z. Green synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles using *Mentha piperita* L and *Mentha spicata* L. extracts. J Neyshabur Univ Med Sci 2022;9(4):148-160.