بیوسنتز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره برگ لیمو ترش و به کارگیری آن برای تکمیل ضد میکروبی روی پارچه

چکیده

آماده سازی نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره آبدار برگ های لیمو ترش (Citrus Limon) انجام شده است که به عنوان عامل احیا کننده و کپسول کننده نانو ذرات نقره عمل می کنند. این نانو ذرات نقره برای تکمیل پایدار روی پارچه های پنبه ای و ابریشمی استفاده شده است. فعالیت ضد قارچی قابل ملاحظه ای در مورد پارچه های عمل شده مشاهده شده است. فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات نقره ی حاصل از برگ های لیمو به خاطر همکاری اثر نقره و ترکیبات روغنی ضروری موجود در برگ های لیمو، یک افزایش فعالیت نشان داد. تحقیق حاضر سنتز خارج سلولی نانو ذرات نقره بسیار پایدار به وسیله انتقال زیستی و با استفاده از عصاره برگ های لیمو با احیاء یون Ag^{+} به Ag^{0} را نشان می دهد. به علاوه، نانو ذرات نقره برای رفتار ضد قارچی پارچه های استفاده شده است، که با تعیین فعالیت ضد قارچی مواد منسوج به روش پخش آگار در برابر Fusarium oxysporum و Alternaria brassicicola تست شده اند. تشکیل نانو ذرات فلزی به وسیله FT-IR، طیف سنج UV-مرئی، میکروسکوپ الکترونی انتقالی، میکروسکوپ الکترونی روبشی و میکروسکوپ نیروی اتمی مشاهده شده است.

مترجم: محسن عادلی

مقدمه

در عصر حاضر، تولید نانو ذرات با استفاده از عصاره گیاه، به عنوان یک روش ساده و اقتصادی مورد توجه قرار گرفته است. برای اولین بار Jose-Yacaman et al. تشکیل نانو ذرات طلا و نقره را به وسیله گیاه زنده گزارش کرد Gardea-Torresdey et al. Sastry et al .(۲۰۰۲, ۲۰۰۳). به بیوسنتز نانو ذرات فلزی به وسیله عصاره برگ گیاهان دست یافت و کاربرد های آن ها را کشف کرد (Shankar et al. ۲۰۰۳a, b). آن ها احیاء زیستی یون های کلرات و نقره را با تغذیه برگ های شمعدانی یا Neem (یک نوع درخت استوایی همیشه سبز) مطالعه کردند. (Shankar et al. ۲۰۰۴a). آن ها همچنین مکانیسم تشکیل نانو ذرات مثلثی به وسیله عصاره برگ لیمو را کشف کردند. آن ها دریافتند که به نظر می رسد نانو ذرات مثلثی به وسیله یک فرایند شامل احیاء سریع، اجتماع و سخت شدن نانو ذرات کروی مایع مانند در دمای محیط ، رشد می کنند (Shankar et al. ۲۰۰۴b). آن ها همینطور نانو ذرات طلا را با استفاده از عصاره برگ تمبر هندی سنتز کرده و کاربرد های آن ها را در حساس کردن کاغذ مطالعه کردند .
(Ankamwar et al. ۲۰۰۵).

اخیرا Sastry et al. سنتز نانو ذرات مثلثی شکل طلا و نانو ذرات نقره را با استفاده از عصاره گیاه Aloe Vera نشان داده است.
(Chandran et al. ۲۰۰۶).

آزمایش مواد

برگ های مرکب لیمو (لیمو ترش) سبز تیره از IIT, Kanpur جمع شده و برای تولید نانو ذرات نقره استفاده شد. دو زنجیره قارچی خالص viz. Fusarium oxysporum و Alternaria brassicicola از بخش MTCC مؤسسه هندی تحقیق نبض Kanpur, India به دست آمده است.

مواد و واسطه ها

آگار دکستروز سیب زمینی (PDA) آماده شده توسط Himedia برای برقرار داشتن یا منتشر کردن کشت قارچ، استفاده شده است. پپتن و دکستروز برای متعادل ساختن رشد قارچ در محیط تغذیه، استفاده شده است. نمک نیترات نقره ($AgNO_3$) از Spectrochem, Kanpur خریداری شده است. متانول و مواد شیمیایی دیگر از (Ranbaxy) Rankem بودند.

آماده سازی عصاره زیستی

بیست گرم برگ تازه لیمو با آب شیر و سپس با آب مقطر شستشو شده، در معرض هوا خشک شده و نهایتا بریده شده و به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه درون ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر جوشان خیسانده شده و با کاغذ صافی Whatman شماره ۴۲ صاف شده است. این عصاره زیستی همیشه به صورت تازه استفاده شد.

آماده سازی نانو ذرات نقره (SNP) با استفاده از عصاره زیستی

پنج میلی لیتر عصاره برگ به ۴۵ میلی لیتر محلول ۰/۰۰۲ مولار $AgNO_3$ در یک فلاسک مخروطی در دمای اطاق و در تاریکی اضافه شده است. بعد از یک ساعت تشکیل ذرات نقره درون فلاسک شروع شد.

آنالیز طیف UV-مرئی

احیاء زیستی Ag^+ در محلول آبی به وسیله نمونه بندی پریودیک قسمت هایی (۰/۲ ml) از سوسپانسیون و سپس رقیق کردن نمونه ها با ۲ میلی لیتر آب دی یونیزه شده و نهایتا اندازه گیری طیف UV-مرئی رقت های نهایی، نشان داده شده است. آنالیز طیف سنجی UV-مرئی نانو ذرات نقره تولید شده، تابعی از زمان مورد نیاز برای احیاء زیستی در دمای اطاق روی طیف سنج مدل Thermo Hekios α و در وضوح ۱ نانو متر، بوده است.

آنالیز طیف انتقال مادون قرمز Fourier

محلول باقیمانده شامل نانو ذرات به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۸۰۰ rpm سانتریفوژ شده و سوسپانسیون حاصله در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر استریله شده رسوب دهی شده است. فرایند سانتریفوژ کردن و رسوب دهی سه مرتبه تکرار شده است.
بنابراین سوسپانسیون خالص سازی شده در ۶۰°C به طور کامل خشک شده است. سرانجام، نانو ذرات خشک شده با Vertex ۷۰ FTIR مدل Bruker آنالیز شده اند.

مشاهده TEM و AFM نانو ذرات نقره

سوسپانسیون سانتریفوژ شده و رسوب داده شده برای آنالیز TEM به صورت نمونه درآمد. نمونه های TEM حاصل از سوسپانسیون آبی نانو ذرات نقره، با قرار دادن یک قطره از سوسپانسیون روی توری های مسی پوشانده شده با کربن و زمان دادن جهت تبخیر شدن آب، آماده شده اند.
داده TEM روی یک دستگاه FEI TECNAI ۰۲ دارای نرم افزار TECNAI G^2 جمع شده است. داده AFM روی دستگاه تصویر برداری مولکولی Agilent جمع شده و تصاویر روی نرم افزار PicoScan جمع شده اند. میکرو مش Cantilevers (Cu-Au) با رأس خمیدگی کمتر از ۱۰ نانومتر در بررسی تصویر برداری مولکولی استفاده شده است.
ابتدا دستگاه اسکن رنگ به منظور تغییرات شید و مقادیر Lab در پنبه و ابریشم رنگرزی شده با SNP استفاده شده است. میکروگراف‌های SEM با ۲۰۰ FEI Quanta گرفته شده است.

آبکاری فلزی آگار دکستروز سیب زمینی PDA

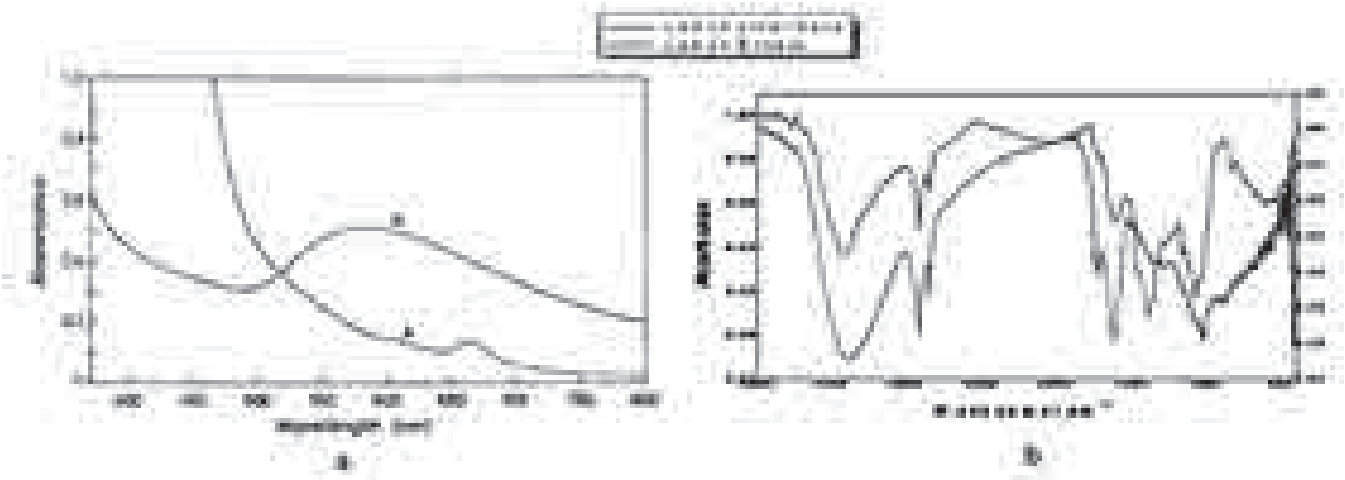
به دقت توزین شده و در آب مقطر حل شده است، سپس داخل فلاسک مخروطی ریخته شده و قبل از اینکه برای استریلیزه شدن نگه داری شود درب آن با پنبه بسته شد. بعد از استریلیزه شدن، حدود ۲۰ میلی لیتر آگار در هر صفحه کشت میکروب استریلیزه شده ریخته شده و سپس زمان داده شده تا سرد شود، بنابراین آگار تبدیل به جامد شده و سپس تلقیح انجام گرفته است.

رنگرزی پنبه و ابریشم با نانو ذرات نقره

پارچه های پنبه ای و ابریشمی از قبل شستشو داده شده و رنگرزی شده با عصاره برگ لیمو به عنوان پارچه کنترل استفاده شده است، در حالی که پارچه های پنبه ای و ابریشمی عمل شده با نانو ذرات نقره به عنوان نمونه پارچه ای جهت تشخیص تکمیل منسوج پایدار با روش شستشوی بعدی و به علاوه ارزیابی فعالیت ضد قارچی استفاده شده است.
نمونه های کنترل با غوطه ور کردن پارچه ها در ۲۰٪ عصاره آبدار برگ های لیمو، در دمای ۶۵-۷۰°C و به مدت ۲ ساعت با نسبت ماده به محلول ۱:۲۵ آماده شده اند. سپس در سایه و بدون چلاندن خشک شده اند.
به طور مشابه پارچه های پنبه ای و ابریشمی از قبل شستشو داده شده، به مدت ۴ ساعت درون نانو محلول نقره تولید شده به وسیله برگ های لیمو غوطه ور شده سپس برداشته شده و در سایه خشک شده اند. پارچه های پنبه ای عمل شده قهوه ای مایل به خاکستری بود و پارچه ابریشمی عمل شده قهوه ای مایل به سبز بود.

تست تکمیل منسوج پایا

تکه هایی با ابعاد ۳ cm *۲/۵ (عرض * طول) از پارچه های پنبه ای و ابریشمی رنگرزی شده / پوشش داده شده با نانو ذرات نقره برای تست ثبات شستشویی به منظور ارزیابی نتایج تکمیل



پایا، اســتفاده شــده اســت. پنج عدد شستشوی بعدی انجام شــده است. شستشــو ها با خیساندن پارچه های عمل شــده در آب مقطر و نگه داشتن نمونه ها به مدت ۴ ســاعت در دمای اطاق انجام شده اســت. بعد از خشک کردن، تغییرات در رنگ نمونه هــا و لکه گذاری روی پارچه ســفید اندازه گیری شــده اســت. به علاوه، این نمونه ها برای تخمین فعالیت ضد قارچی نیز استفاده شده اند.

ارزیابی فعالیت ضد قارچی مواد منسوج

در این روش، تکه هــای پارچه کنترل و نمونه در تماس نزدیک با ماده واسطه یعنی PDA که قبلا با یک ماده تلقیح کننده (۰/۵ ml) از ارگانیســت مورد تست رگه رگه شده است، قرار گرفته اند. بعد از ۱۸ الی ۲۴ ساعت، یک رگه از منطقه پیوسته یا کم نقطه در طرفی از پارچه که نشان دهنده کارایی ضد قارچی پارچه می باشد، شمارش شده است.

نتایج و بحث

بیوسنتز نانو ذرات نقره به وسیله عصاره برگ لیمو

به خوبی معلوم اســت که نانو ذرات نقره به خاطر تحریک ارتعاش های پلاســمون سطحی این نانو ذرات، در محلــول آبی یک رنگ قهوه ای مایل به زرد نشان می دهند.
Shankaret al.۲۰۰۴a,b; Ankamwar) .(et al. ۲۰۰۵; Chandran et al. ۲۰۰۶

احیاء یون نقره به نانــو ذرات نقره طی در معرض عصاره برگ لیمــو قرار گرفتن، به وســیله تغییر رنگ و همینطور به وســیله طیف سنجی UV–مرئی مشخص شــده است. به طور کلی مشخص شد که طیف ســنجی UV–مرئی می تواند برای ارزیابی نانو ذرات با ســایز و شکل کنترل شده در سوسپانســیون های آبی به کار گرفته شود. طیف UV–مرئی که بــرای نشــان دادن واکنش، در فاصله های متفاوت ضبط شــده است، نشان می دهد که رزونانس پلاســمون سطحی (SPR) به شــدت با زمان افزایش یافته است. همینطور احیاء نانــو ذرات نقره را در مدت ۱ ســاعت نیز نشــان می دهد. شکل ۱a طیف جذبی UV–مرئی ضبط شــده از محلول نانو ذرات نقره در ۲،۵ ساعت بعد از واکنش (منحنــی A) و عصاره برگ های لیمو (منحنی B) را نشان می دهد. نانو ذرات طلای به دست آمده از گل های لاله عباسی (Mirabilis) نیز به طور مشابه توســط Vankar و Bajpai ۲۰۱۰، آنالیز شده است.

همانطور که در شــکل ۱b نشان داده شده است، از طیف جذبی FT–IR توده زیســتی برگ های لیموی خشــک شــده قبل و بعد از احیاء زیستی، اطلاعاتی راجع به تغییر شیمیایی گروه های واکنش

	L	a*	b*	C	H	ΔE
Unwashed	79.181	2.90	4.04	5.73	54.57	7.74
Wash I	79.207	2.54	4.06	5.58	62.87	7.46
Wash III	79.379	4.88	6.14	7.84	51.66	8.64
Wash V	79.222	4.60	5.91	9.09	60.70	10.59

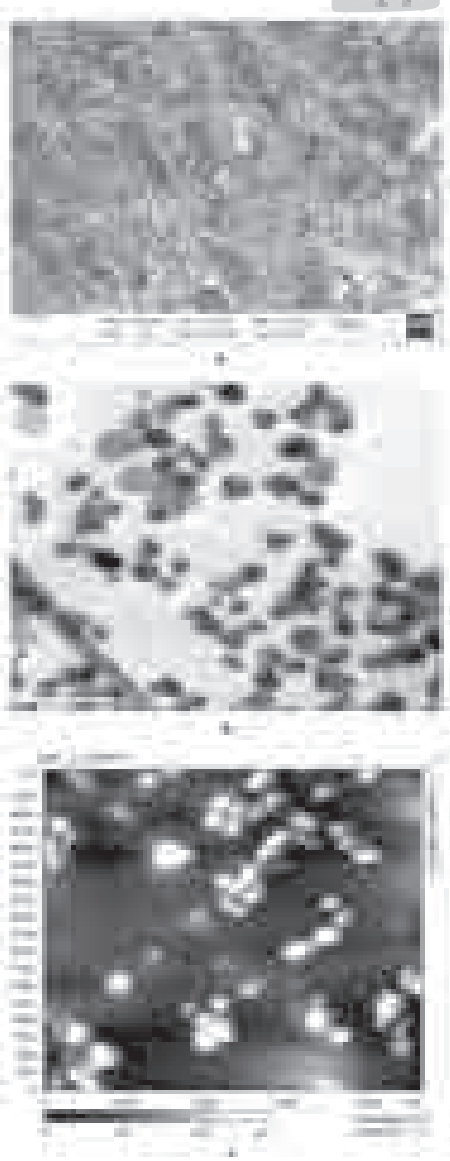
جدول ۱. ثبات شستشــویی پارچه پنبه ای عمل شده با نانو ذرات نقره

	L	a*	b*	C	H	ΔE
Unwashed	72.807	5.18	15.54	16.38	71.53	9.11
Wash I	72.896	4.45	15.65	16.27	74.09	8.56
Wash III	72.428	6.615	14.41	15.88	65.36	10.05
Wash V	73.044	5.28	16.21	17.05	71.92	9.59

جدول ۲. ثبات شستشــویی پارچه ابریشمی عمل شده با نانو ذرات نقره

پذیر درگیر شـــده در احیاء زیستی می تواند ارزیابی شود. باند ۱۱۰۱ cm^{-1} که ممکن است مربوط به گـــروه های C–O– پلی ال هایـــی مانند فلاون ها، ترپنوید ها و پلی ســـاکارید ها باشد، به عنوان یک پیک قابل توجه در توده زیستی مشاهده شده است. آنالیز FT–IR عصاره زیستی قبل و بعد از اضافه کردن محلول نقره، باندهایی قوی در ۱۰۲۱، ۱۴۴۳، ۱۶۳۴ و ۳۴۲۸ cm^{-1} نشان داد. باند ۱۰۲۱ cm^{-1} به ارتعاش کششی C–N آمین مربوط می شـــد. باند ۱۴۴۳ cm^{-1} به خمش C–H و OH مربوط می شـــد و ۳۴۲۸ cm^{-1} بـــه خصوصیات کشـــش NH– موجود در آمید(II) نســـبت داده شـــده است. باند ضعیف تر ۱۶۳۴ cm^{-1} به آمید I مربوط می شد، که به خاطر کشش کربونیل موجود در پروتئین ایجاد شده است.

میکروگـــراف الکترونی روبشـــی SNP حاصل از برگ های لیمو (شـــکل ۲a) تأیید می کند که این نانو ذرات به تعداد زیادی تشکیل می شوند و از نظر اندازه تقریبا یکنواخت هستند. پنبه و ابریشم با این نوع از SNP ها رنگرزی شـــده اند. این یکنواختی اندازه و شکل به طور قابل توجهی ثبات شستشویی منســـوج و در نتیجـــه فعالیت ضـــد قارچی پنبه و ابریشم رنگرزی شده را افزایش می دهد. مشخص شد که اندازه بعضی از ذرات در این تصویر TEM (شکل ۲b) بین ۸ و ۱۲ nm می باشد. اندازه های مشخصی در ۸/۲۷، ۱۳/۷۹ و ۱۴/۴۸ nm تعیین شدند. مشخص شـــد که اندازه بعضی از ذرات در این تصویر TEM بین ۱۵ و ۳۰ nm می باشـــد. به همین شـــکل ذراتی با اندازه‌های ۱۹/۲۳، ۲۸/۸ و ۳۰ nm نشان داده شد. در شکل ۲c نانو ذرات نقره تحت تصویر توپوگرافی (مکان نگاری) نشان داده شده اند. میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)، نانو ذرات به خوبی دیسپرس شده و ناهمگن از نظر شکل را نشان داد.



شـــکل ۲. a SEM ، b TEM ، c AFM نانو ذرات نقره به دست آمده از برگ های لیمو

تکمیل منسوج پایدار

پایداری و ثبات تکمیل نانو روی پنبه و ابریشـــم با تغییـــر مقادیر CIEL a*b* ، که مقادیر پذیرفته شده ی بین المللی برای تغییر در روشنایی/ تاریکی و مشخصه رنگ می باشـــند، به ترتیب در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده اســـت. پارچه های تکمیل شده ی نانو (پنبه و ابریشم) حتی بعد از پنج مرحله شستشـــو تغییـــرات کوچکی در مقادیر L نشـــان می‌دهند. Swatches پارچه نتایج مشابهی نشان می‌دهد (شکل ۳a , b). این پایداری پارچه مسئول فعالیت ضد قارچی یا ضد میکروبی پنبه و ابریشـــم رنگرزی شده با SNP ها بود. چون که لایه کشی / پوشـــش دهی SNP ها روی پوشاک مانند یک حفاظ عمل کرده که رشد قارچ را محدود می کند.

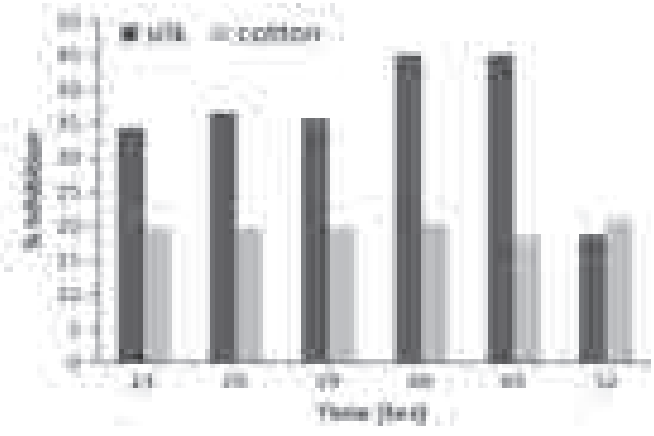
فعالیت ضد قارچی پارچه ی رنگرزی شده با نانو نقره

در این آزمایـــش، پارچه ی پنبه ای و ابریشـــمی رنگرزی شده با نانو نقره لیمو به پشت روی محیط کشـــت میکروب Fusarium و Alternaria قرار گرفته و کشت به مدت ۲۰ ساعت طول کشیده و بازداری مهاجرت بعد از هر ۳ ساعت بررسی شده و با صفحه کنترل مقایســـه شـــد. همانطور که در شـــکل های ۴ و ۵ نشان داده شده است، به منظور محدودیت رشـــد در هر دو طـــرف پارچه، ممانعت ذاتی هر دو رشته قارچی به دست آمده است.

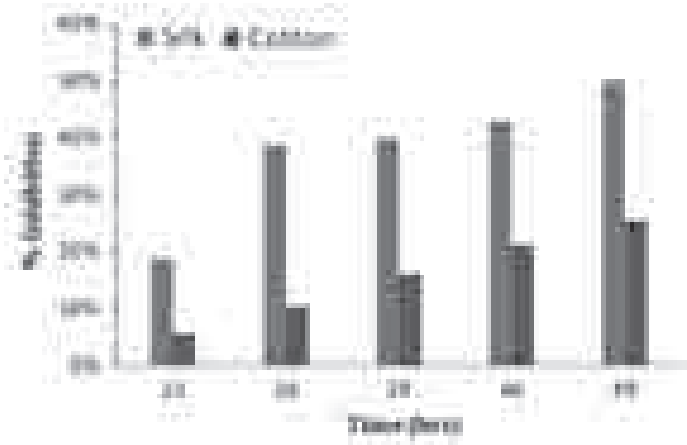
مکانیزم عمل

مکانیزم عمل ضد میکروبی یون های نقره به طور کامل معلوم نیســـت؛ به هر حـــال، تأثیر یون های نقره روی میکروب، می تواند به وســـیله تغییرات ســـاختاری و مورفولوژیکی مشاهده شود. پیشنهاد

شکل ۳. پایداری تکمیل نانو نقره روی (a) پنبه با نانو نقره بعد از شستشوی I،II ، III، IV و V و (b) ابریشم با نانو نقره بعد از شستشوی I،II ، III، IV و V.



شکل۴. درصد بازداری Fusarium oxysporum به وسیله پارچه رنگرزی شده با SNP.



شکل ۵. درصد بازداری Alternaria brassicicola به وسیله پارچه رنگرزی شده با SNP.

شـده که، زمانـی که مولکول هـای DNA در حالت آزاد هسـتند، تاشـدگی DNA می تواند به طور مؤثری اداره شـود. اما زمانی که DNA به شکل متراکم باشـد، توانایی تاشدگی اش را از دسـت می دهد، بنابراین زمانی که یون های نقره به داخل سـلول میکروبی نفوذ می کنند مولکول DNA به حالت متراکم شـده تبدیل می شود و توانایی تاشدگی اش را از دست می دهد که منجر به مرگ سـلول می شـود. همچنین گزارش شده است که فلزات سنگین با چسبیدن به گروه تیول، با پروتئین‌ها واکنش می‌دهند و پروتئین غیر فعال می شود.

(Liau et al. ۱۹۹۷; Feng et al. ۲۰۰۰).

نانو ذرات نقره به خاطر مساحت سطح بزرگ شان که منجر به تماس بهتر آن ها با میکرو ارگانیسـم ها می شود، نسبت به نمک های دیگر خصوصیت ضد میکروبی کافی نشان می دهند. نقره به صورت ذاتی یک ماده ضد میکروب و ضد باکتری اسـت. تولید کننده ها می توانند با قرار دادن نانو ذره نقره درون منسوجات، موادی بسـازند که با استفاده از یـک مقدار کم نقره، میکـروب های موجود روی سـطح ماده پوشـاک را بکشـند. بنابراین برای جلوگیری از فاسد شدن ناشی از رشد میکروبی در نواحی فاسد می توانند با نانو ذرات نقره عمل کنند. نانو ذرات نقره مسـاحت سطح نسبتا بزرگی دارند که بـه نحو ایده الی برای کنتـرل مؤثر میکروب ها، کپک ها و قارچ ها، قرار گرفته اسـت. در مورد مکانیزم دقیق فعالیت ضـد قارچی نانو ذرات نقره سند بیشتری نیست.

فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات نقره به دست آمده از برگ های لیمو به خاطـر تأثیر همکاری کننده نقـره و ترکیبات روغن ضـروری موجود در برگ های لیمو، افزایشی در فعالیت نشان داده است.

نتیجه گیری

احیاء یون های نقره به وسـیله عصاره برگ های لیمـو منجر به تشـکیل نانو ذرات نقـره پایدار با مورفولوژیک های چند شـکل در محدوده سـایز بزرگ تر از ۱۰۰ nm شـده اسـت. نرخ واکنش برای سنتز نانو ذرات با این روش به وسیله عصاره برگ های لیمو ۲,۵ سـاعت است که بسیار سریع تر از سنتز غیر مسـتقیم برگ گشنیز (۱۲ ساعت) (Narayanan and Sakthivel ۲۰۰۸) و همینطور سریع تر از سنتز غیر مستقیم میکروب ها (۲۴ الی ۱۲۰ ساعت) (Prakash et al. ۲۰۱۰) می باشـد. در این مطالعه، سنتز نانو ذرات نقره به روش شیمی سبز و با استفاده از عصاره برگ های لیمو گزارش شـد که می تواند کاربردهای زیادی در بیو پزشکی و داروسازی داشته باشد. به علاوه، نشان داده شده است که استفاده از یک عامل احیاء زیسـتی طبیعی، تجدید پذیر و ارزان قیمت مانند برگ های لیمو می تواند در محلول آبی و در دمای محیط، با اجتناب از حلال های پرخطر و سـمی، سـاختار های فلزی تولید کند. فعالیت ضد قارچی SNP به دسـت آمده از برگ های لیمو، به خاطر تأثیـر همکاری کننده نانـو ذرات نقره و ترکیبات روغن ضروری برگ های لیمو، افزایشی در فعالیت نشان داده است، که تأثیر افزایش یافته در داده ها مشاهده شده است.

منابع در دفتر مجله موجود است.