سنتز بیولوژیکی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره برگ‌های لیمو و کاربرد آن برای تکمیل ضد میکروبی بر روی پارچه

مترجم: عباس حاجی پور

چکیده

تهیه نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبدار برگ های لیمو (لیمو ترش [1]) که به عنوان عامل کاهنده و محیط کپسوله ساز برای نانوذرات نقره عمل می کند، انجام شد. این نانوذرات نقره برای تکمیل نساجی با ثبات روی پارچه های پنبه ای و ابریشمی استفاده می شوند. فعالیت چشمگیر ضد قارچ در پارچه های تکمیل شده مشاهده می گردد. فعالیت های ضدمیکروبی نانوذرات نقره بدست آمده از برگ های لیمو افزایش فعالیت به سبب تاثیر همکاری اجزاء نقره و روغن اساسی برگ های لیمو نشان داد. پژوهش حاضر سنتز خارج سلولی نانوذرات بسیار پایدار نقره را بوسیله تغییر شکل زیستی با استفاده از عصاره برگ های لیمو با کاهش کنترل شده یون Ag^+ به Ag^0 نشان می دهد. نانوذرات نقره بیشتر برای تکمیل ضد قارچ پارچه ها استفاده شد که با ارزیابی فعالیت ضدقارچی مواد نساجی توسط روش انتشار آگار [2] در برابر قارچ Fusarium oxysporum و Alternaria brassicicola آزمایش شد. آرایش نانوذرات فلزی توسط اسپکتروسکوپی FT-IR، UV-Visible، میکروسکوپ الکترون عبوری، میکروسکوپ الکترون روبشی، میکروسکوپ نیروی اتمی تشریح شد.

مقدمه

نانوذرات با استفاده از عصاره های گیاهی که اخیرا مورد توجه واقع شده اند، یک روش ساده و مقرون به صرفه است. جوس یاکامان [3] و همکارانش برای اولین بار تشکیل نانوذرات نقره و طلا را بوسیله گیاهان زنده گزارش کردند. ساستری و همکارانش به سنتز بایولوژیکی نانوذرات فلزی توسط عصاره برگ گیاه دست یافتند و کاربردهای بالقوه آن را جستجو کردند. آنها کاهش زیستی یونهای کلروآئورات یا یونهای نقره را توسط آبگوشت (broth) از برگ های شمعدانی و همچنین برگ های چریش مطالعه کردند. بعدها آنها مکانیزم تشکیل نانوسه گوشهای طلا را بوسیله عصاره علف لیمو کشف کردند. آنها دریافتند که نانوسه گوشها به نظر می رسد بوسیله فرایند شامل کاهش سریع، همگذاری و پخت در دمای اتاق نانوذرات کروی طلای شبیه به مایع رشد می کنند. همچنین آنها نانوذرات طلای سه گوش را با استفاده از عصاره برگ آلوچه سنتز کردند و کاربرد بالقوه آنها را در سنجش بخار مطالعه کردند. همین اواخر، ساستری [4] و همکارانش سنتز نانوسه گوشهای طلا و نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره گیاه آلوئه ورا نشان دادند.

تجربیات

مواد

برگ های لیمو ترش از IIT، کانپور جمع آوری شدند و برای تولید نانوذرات نقره استفاده شدند. دو نژاد قارچ خالص یعنی قارچ فوزاریوم و الترناریا براسی سی کولا از بخش MTCC موسسه تحقیقاتی پالس هند، کانپور، هند تهیه شدند.

وسایل و مواد شیمیایی

پتیتو دکستروز آگار آماده (PDA) ساخت Himedia جهت حفظ و هم چنین گسترش کشت قارچ استفاده شد. پپتون و دکستروز جهت ساخت وسیله ای برای مشاهده رشد قارچ در آبگوشت استفاده شدند. نمک نیترات نقره ($AgNO_3$) از Spectrovhem، کانپور، خریداری شد. متانول و دیگر مواد شیمیایی ساخت (Rankem Ranbaxy) بودند.

تهیه عصاره زیستی

بیست گرم برگ تازه لیمو با آب شیر و سپس با آب مقطر شسته شد و در هوا خشک گردید و سپس کاملا ریز شدند و در ۱۰۰ میلی لیتر آب جوش مقطر به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه خیس خوردند و از طریق کاغذ Whatman شماره ۴۲ فیلتر شدند. این عصاره برای تولید نانوذرات نقره استفاده شد. این عصاره زیستی همواره به صورت تازه استفاده می شود.

تهیه نانودرات نقره (SNP) با استفاده از عصاره زیستی

پنج میلی لیتر عصاره برگ ها به ۴۵ میلی لیتر محلول ۰/۰۰۲ M $AgNO_3$ در ml ۱۰۰ در محفظه مخروطی در دمای اتاق در تاریکی اضافه شد. بعد از ۱ ساعت تشکیل نانوذرات نقره در محفظه شروع به ظاهر شدن کرد.

1- Citrus limon
2- Agar diffusion method
3- Jose-Yacaman
4- sastry

آنالیز طیفی UV–Visible

کاهش زیستی Ag^{+} در محلول آبی توسط نمونه‌گیری دوره‌ای یکسان (ml ۰/۲) سوسپانسیون، سپس رقیق کردن نمونه ها با ۲ میلی لیتر آب دی یونیزه و در نتیجه اندازه‌گیری طیف UV–Visible رقیق کننده‌های حاصل مورد سنجش قرار گرفت. آنالیز اسپکتروسکوپی UV–Visible نانوذرات نقره تهیه شده به عنوان تابعی از زمان مورد نیاز برای کاهش زیستی در دمای اتاق در اسپکتروسکوپی مدل Thermo Heλios α در رزولوشن ۱ نانومتر انجام شد.

آنالیز طیفی تبدیل فوریه مادون قرمز

محلول باقیمانده شامل نانوذرات در ۴۸۰۰ rpm برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سوسپانسیون حاصل در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر استریل دوباره دیسپرس شد. فرایندهای سانتریفوژ کردن و دوباره دیسپرس کردن سه بار تکرار شد. پس از آن، سوسپانسیون تصفیه شده به طور کامل در ۶۰ °C خشک شد. در نهایت، نانوذرات خشک شده توسط FTIR 70 Vertex مدل Bruker آنالیز شدند.

مشاهدات TEM و AFM نانوذرات نقره

سوسپانسیون سانتریفوژ شده و دوباره دیسپرس شده برای آنالیز TEM نمونه برداری شد. نمونه های TEM از سوسپانسیون آبی نانوذرات نقره بوسیله قرار دادن یک قطره از سوسپانسیون روی گرید مسی پوشش داده شده با کربن و تبخیر آب تهیه شد. اطلاعات TEM در دستگاه FEI TECNAI 02 با نرم افزار TECNAI G^{2} جمع آوری شد. اطلاعات AFM روی دستگاه تصویر برداری مولکولی Agilent جمع آوری شد و تصاویر بر روی نرم افزار Picoscan گردآوری شد. تیرک‌های Masch μ (مس– طلا) با انحناء نوک (Tip) کمتر از ۱۰ نانومتر در پروب تصویربرداری مولکولی استفاده شد. دستگاه Premier ColorScan برای تغییر شید و مقادیر Lab در پنبه و ابریشم رنگرزی شده SNP استفاده شد. تصاویر SEM بر روی FEI Quanta 200 گرفته شد.

روکش پتیتو دکستروز آگار

PDA به دقت وزن شد و در آب مقطر حل گردید سپس در محفظه مخروطی نگه داشته شد و با پنبه، قبل از نگهداری آن برای استرلیزه کردن بسته شد. بعد از استریلیزه کردن حدود ۲۰ میلی لیتر آگار در صفحات پتری استریل شده ریخته شد سپس به این صفحات اجازه داد شد تا خنک شوند بطوریکه آگار منجمد شد و سپس تلقیح انجام شد.

رنگرزی پنبه و ابریشم بوسیله نانوذرات نقره

پارچه‌های پنبه ای و ابریشمی از قبل شسته شده و رنگرزی شده با عصاره برگ لیمو به عنوان پارچه شاهد استفاده شدند در حالیکه پنبه و ابریشم عمل شده با نانوذرات نقره به عنوان پارچه نمونه برای ارزیابی پایداری تکمیل نساجی در روش شستشوی بعدی و بعدا برای فعالیت ضد قارچی، استفاده شدند. نمونه های شاهد بوسیله خیساندن پارچه در محلول آبدار عصاره برگ لیمو ۲۰٪ در ۷۰ °C–۶۵ به مدت ۲ ساعت نگهداری ماده با نسبت وزن به حجم ۱:۲۵، تهیه شدند. سپس بدون فشردن در سایه خشک شدند. به همین ترتیب پنبه و ابریشم از قبل شسته شده در محلول نانو نقره تولید شده توسط برگ های لیمو به مدت ۴ ساعت خیسانده شدند و سپس بیرون آورده و در سایه خشک گردیدند. پارچه عمل شده پنبه قهوه ای مایل به خاکستری بود و پارچه عمل شده ابریشم قهوه ای مایل به سبز بود.

بررسی دوام تکمیل منسوج

تکه‌های پنبه و ابریشم رنگرزی شده و پوشش داده شده با نانو ذرات نقره با ابعاد ۳×۲/۵ سانتی متر(طول×عرض) برای پایداری شستشو جهت ارزیابی نتایج دوام تکمیل منسوج استفاده شدند. پنج شستشو بعدی انجام شد. شستشو ها بوسیله خیس کردن کامل پارچه ها در آب مقطر که نمونه ها به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شده بودند، انجام شدند. پس از خشک کردن، تغییرات در رنگ نمونه و رنگ دهی به پارچه سفید تعیین شد. این نمونه ها بعدا برای ارزیابی فعالیت ضد قارچی مورد استفاده قرار گرفتند.

ارزیابی فعالیت ضد قارچی مواد نساجی

روش رگه های موازی

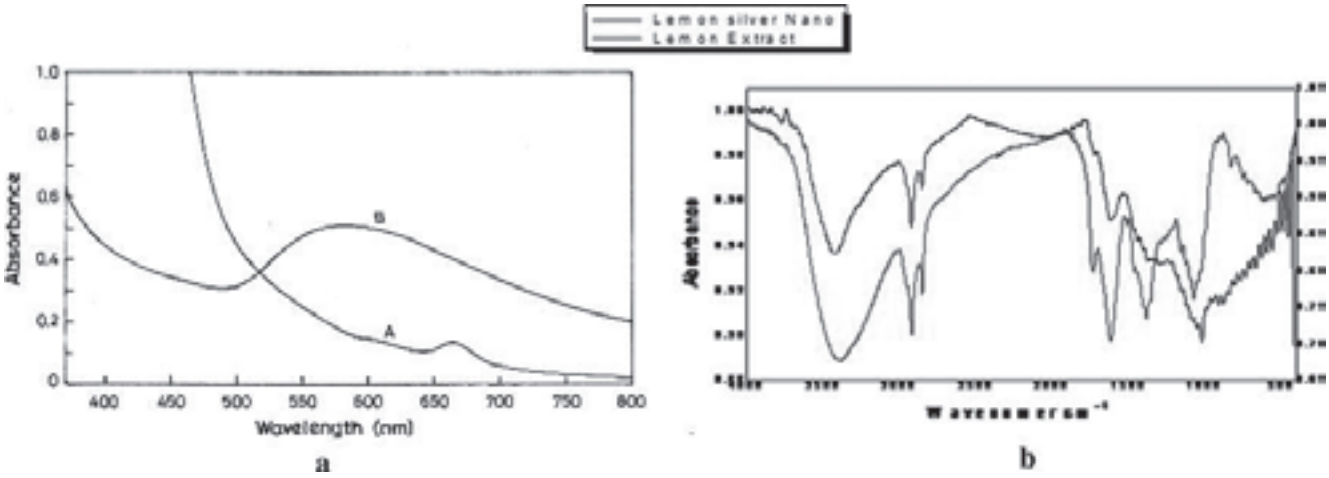
در این روش هم، تکه های پارچه شاهد و نمونه در تماس نزدیک وسایل، یعنی PDA که قبلا با تلقیح (۰/۰۵ میلی لیتر) موجود زنده آزمایش رگه‌ای شده بود، قرار گرفتند. بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت رگه مناطق متوالی یا کم مجتمع در اطراف پارچه نشان دهنده تاثیر ضد قارچی پارچه، محاسبه شد.

نتایج و بحث

سنتز بیولوژیکی نانوذرات نقره توسط عصاره برگ‌های لیمو

به خوبی شناخته شده است که نانوذرات نقره در محلول آبی به علت تحریک ارتعاشات سطح پلاسمون در نانوذرات نقره رنگ زرد قهوه ای نشان می دهند. کاهش یونهای نقره به نانوذرات نقره در طی پرتودهی به عصاره برگ گیاه بوسیله تغییر رنگ و هم چنین توسط اسپکتروسکوپی UV–Vis دنبال شد. به طورکلی تشخیص داده شده است که اسپکتروسکوپی UV–Visible می تواند برای بررسی نانو ذرات کنترل شده در اندازه و شکل در سوسپانسیون آبی، استفاده شود. طیف‌های UV–Visible که در فواصل مختلف برای نظارت بر واکنش، پیدایش باند رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) افزایش یافته در شدت با گذشت زمان، ثبت شدند. طیف همچنین تولید نانوذرات نقره در ۱ ساعت را نیز نشان می دهد. شکل a۱ طیف جذبی UV–Visible ثبت شده از محلول نانوذرات نقره بعد از ۲/۵ ساعت از گذشت واکنش (منحنی A) و عصاره برگ‌های لیمو (منحنی B) نشان می دهد. نانوذرات طلا از گلهای لاله به طور مشابهی توسط Vankar و Bajpai در سال ۲۰۱۰ آنالیز شدند.

طیف‌های جذبی FT-IR زیست توده خشک شده برگهای لیموی قبل و بعد از کاهش زیستی، همانطور که در شکل b۱ نشان داده شد، اطلاعات مربوط به تغییر شیمیایی گروه‌های عاملی درگیر در کاهش زیستی می تواند ارزیابی شود. باند $1101\ cm^{-1}$ که ممکن است توسط گروه‌های C–O– پلی اول ها مانند فلاون ها، ترپنوئیدها و پلی ساکاریدها شرکت داده شده باشد، در زیست توده به صورت یک پیک مشخص ظاهر شد. آنالیز FT–IR عصاره طبیعی قبل و بعد از افزایش محلول نقره باندهای قوی در ۱۰۲۱، ۱۴۴۳، ۱۶۳۴ و $3429\ cm^{-1}$ نشان داد. باند $1021\ cm^{-1}$ به کشش ارتعاشی C-N آمین مربوط می‌باشد. باند $1443\ cm^{-1}$ خمش C-H و OH مربوط است و باند $3428\ cm^{-1}$ به مشخصات کششی NH– باند آمین (II) نسبت داده شد. باند ضعیف تر $1634\ cm^{-1}$ مربوط به آمید I است و به سبب کشش کربونیل در پروتئین های



شکل ۱. طیف مرئی نانوذرات نقره عصاره برگهای لیمو (A) و عصاره برگهای لیمو (B)؛ طیف‌های FT-IR نانوذرات نقره عصاره برگهای لیمو (مشکی) و عصاره برگهای لیمو (آبی)

افزایش یافته است.

تصاویر الکترونی روبشی (شکل ۲a) SNP از برگهای لیمو تایید می‌کنند که تعداد زیادی از آنها تشکیل شده اند و از نظر اندازه تقریبا یکسان هستند. ابریشم و پنبه با این نوع SNPs رنگرزی شدند. یکنواختی در اندازه و شکل بطور قابل ملاحظه ای ثبات شستشویی منسوج و در نتیجه فعالیت ضد قارچی پنبه و ابریشم رنگرزی شده را افزایش می دهد.

اندازه ذره در این تصویر TEM (شکل ۲b) در محدوده ۸ و ۱۵ نانومتر بدست آورده شدند. اندازه های خاص معلوم شده ۸/۲۷، ۱۳/۷۹ و ۱۴/۴۸ بودند. اندازه ذره از تصاویر TEM (شکل ۲b) در محدوده بین ۱۵ و ۳۰ نانومتر بدست آورده شد. نانوذرات دیگر نیز اندازه ۱۹/۲۳، ۲۸/۸ و ۳۰ نانومتر را نشان دادند.

در شکل ۲c نانوذرات نقره به صورت تصاویر توپوگرافی نشان داده شده است. میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) نانوذرات خوب دیسپرس شده و بشکل ناهمگون را نشان داد.

دوام تکمیل نساجی

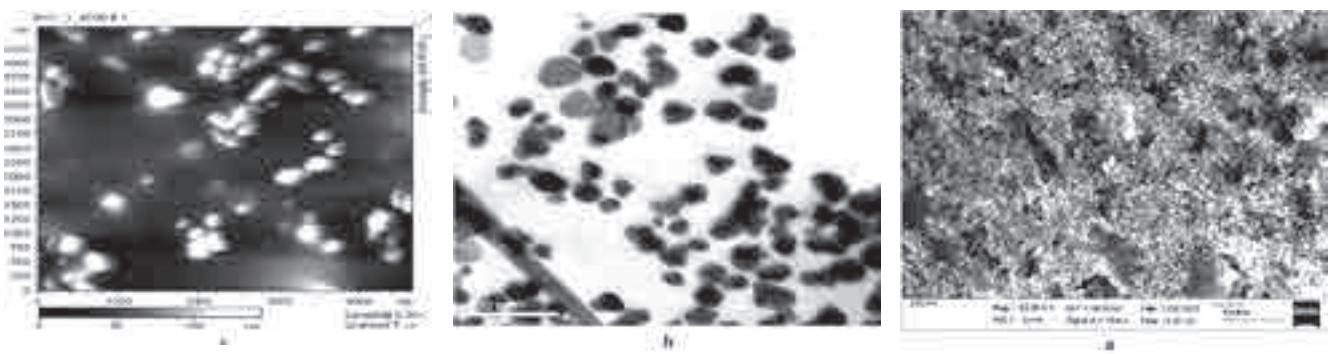
پایداری و دوام تکمیل نانو روی پنبه و ابریشم به ترتیب در جدول ۱ و ۲، از طریق تغییر در مقادیر CIELa*b* که به طور بین المللی مقادیر پذیرفته شده برای تغییر در روشنایی/ تاریکی و شاخص رنگ هستند، نشان داده شده است.. پارچه های تکمیل شده با نانو شده (هم ابریشم و هم پنبه) تغییرات بسیار کمی در مقادیر L حتی بعد از پنج بار شستشو نشان می دهند. نمونه‌های پارچه نتایج مشابهی را نشان می دهند (شکل 3a , b). این پایداری پارچه رنگرزی شده برای فعالیت ضد قارچی یا ضد میکروبی پنبه و ابریشم رنگرزی شده SNPs کافی بود بطوریکه لایه یا روکش SNPs بر لباس همانند محافظ برای محدود کردن رشد قارچ عمل می‌کند.

فعالیت ضد قارچی پارچه رنگرزی شده با نانو نقره

در این آزمایش، پارچه پنبه ای و ابریشمی رنگرزی شده با نانو نقره لیمو تحت کشت Fusarium و Alternaria در طرف مخالف قرار داده شدند و برای این منظور، ۲۰ ساعت کشت استفاده شد و مهار کولنی بعد از هر ۳ ساعت بررسی شد و با صفحه شاهد مقایسه شد. بازداری ذاتی هر دو گونه قارچ بر حسب محدودیت رشد در هر دو پارچه، همانطور که در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است، بدست آورده شد.

مکانیزم عمل

مکانیزم فعالیت ضد میکروبی یونهای نقره به طور کامل فهمیده نشده است؛ اما تاثیر یونهای نقره روی میکروب می تواند توسط تغییرات ساختاری و مورفولوژیکی مشاهده شود. پیشنهاد شده است که هنگامیکه مولکول‌های DNA در حالت آزاد هستند تکثیر DNA می تواند به طور موثر انجام شود. اما هنگامیکه DNA در حالت تغلیظ شده است قابلیت تکثیر خود را از دست می دهد، از اینرو زمانیکه یونهای نقره درون سلول میکروبی نفوذ می کنند



شکل ۲. AFM c ، TEM b ، SEM a نانوذرات نقره حاصل از برگهای لیمو

	L	a*	b*	C	H	δE
Unwashed	79.181	2.90	4.94	5.73	59.57	7.74
Wash I	79.207	2.54	4.96	5.58	62.87	7.46
Wash III	79.379	4.88	6.19	7.88	51.68	8.64
Wash V	79.222	6.86	5.91	9.05	40.70	10.55

جدول۱. پایداری شستشویی پنبه تکمیل شده با نانوذرات نقره

	L	a*	b*	C	H	δE
Unwashed	72.817	5.18	15.54	16.38	71.53	9.16
Wash I	72.896	4.45	15.65	16.27	74.09	8.58
Wash III	72.426	6.615	14.41	15.88	65.36	10.05
Wash V	73.044	5.28	16.21	17.05	71.92	9.59

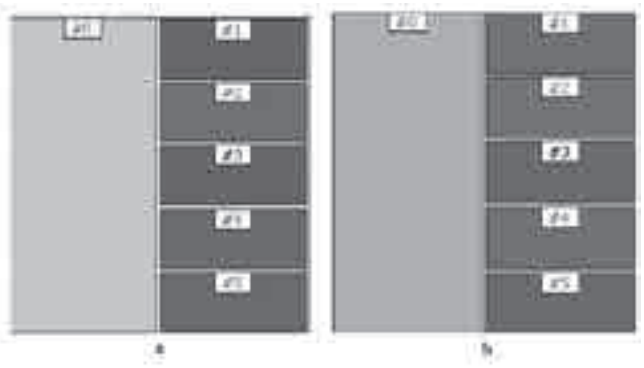
جدول۲. پایداری شستشویی ابریشم تکمیل شده با نانوذرات نقره

مولکول DNA به شکل غلیظ شده تبدیل می‌شود و از دست دادن قابلیت تکثیرشان به مرگ سلول می انجامد. هم چنین، گزارش شده است که فلزات سنگین با پروتئین ها بوسیله متصل شدن با گروه‌های تیول واکنش می دهند و پروتئین ها غیر فعال می شوند.

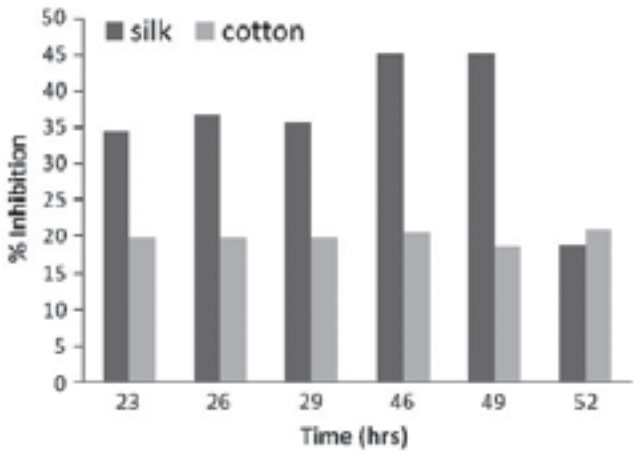
نانوذرات نقره ویژگی های ضد میکروبی موثری در مقایسه با دیگر نمک ها به سبب مساحت سطح بسیار بالایشان نشان می دهند که تماس بهتری با میکروارگانیسم ها را فراهم می کند. نقره به طور ذاتی یک ماده ضد میکروب و ضد باکتری است.

با وارد کردن نقره به منسوجات، تولید کنندگان می توانند موادی تولید کنند که از مقدار کمی نقره برای کشتن میکروبهای موجود در سطح مواد لباس استفاده کنند، بنابراین جهت کمک به جلوگیری از افزایش ضایعات حاصل از رشد میکروبی در مناطق مرطوب می تواند با نانوذرات نقره تکمیل شود. نانوذرات نقره مساحت سطح نسبتا بزرگ دسترس پذیری دارند و برای کنترل موثر میکروب ها، کپک ها و قارچ ها مناسب هستند.

اسناد زیادی درباره مکانیسم دقیق فعالیت ضد قارچی نانوذرات نقره وجود ندارد. فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره بدست آمده از برگهای لیمو به دلیل تاثیر مضاعف نقره و اجزاء اصلی روغن برگهای لیمو، افزایش در فعالیت را نشان داد.



شکل۳. تکمیل با دوام با نانونقره بر روی (a) پنبه با نانو نقره بعد از شستشوی اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم (b) ابریشم با نانو نقره بعد از شستشوی اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم

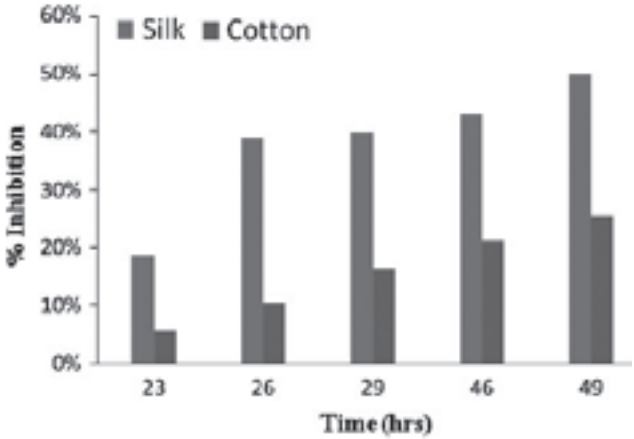


شکل٤. درصد مهار Fusarium oxysporum بوسیله پارچه رنگرزی شده با SNP

نتیجه گیری

کاهش یونهای نقره بوسیله عصاره برگهای لیمو منجر به تشکیل نانوذرات پایدار با مورفولوژی چند شکلی درمحدوده اندازه نانوذرات نقره بالای ۱۰۰ نانومتر می شود. سرعت واکنش برای سنتز نانوذرات توسط این روش بوسیله عصاره برگ‌های لیمو ۲/۵ ساعت است که از سنتز واسطه برگ گشنیز(۱۲ ساعت) بسیار سریعتر است و از سنتز واسطه میکروب ها (۲۴-۱۲۰ ساعت) سریعتر است. نانوذرات نقره سنتز شده بوسیله روش شیمی سبز گزارش شده در این مطالعه با استفاده از عصاره برگهای لیمو می تواند کاربردهای قوی در کاربردهای زیست پزشکی و داروسازی داشته باشد.

بعلاوه، نشان داده شده است که استفاده از عوامل کاهنده بیولوژیکی طبیعی، تجدیدپذیر و کم هزینه مانند برگهای لیمو می تواند نانوساختارهای فلزی در محلول آبی در دمای محیط بدون حضور حلال های خطرناک و سمی در دمای محیط تولید کند. به دلیل تاثیر مضاعف نانوذرات نقره و اجزاء اصلی روغن برگ‌های لیمو، همانطور از داده‌ها مشاهده شد تاثیر افزایش یافت و فعالیت ضد قارچی SNP بدست آمده از برگهای لیمو افزایش فعالیت را نشان داد.



شکل۵. درصد مهار Alternaria brassicicola بوسیله پارچه رنگرزی شده با SNP