مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۶، دی ۱۳۹۶، ۹۶۸-۹۵۳

بیوسنتز نانو ذرات نقره با استفاده از گیاهان شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) و نعناع (*Mentha piperata*) و بررسی اثر ضد میکروبی آن بر برخی باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان

شکوفه عمرانی[۱]، راحله ژیانی[۲]، میلاد دئفه جعفری[۳]

دریافت مقاله: ۹۶/۲/۱۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۶/۴/۱۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۶/۱۰/۹ پذیرش مقاله: ۹۶/۱۰/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به گسترش نگران کننده مقاومت به عوامل ضد میکروبی کلاسیک، روش درمانی نوآورانه برای مبارزه با عوامل بیماریزای مقاوم به آنتی‌بیوتیک مانند ترکیبات مشتق شده از گیاهان و نانو ذرات ضروری به نظر می‌رسد. این مطالعه به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی نانو ذرات نقره بیوسنتز شده با استفاده از گیاهان شیرین بیان و نعناع بر برخی باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی در آزمایشگاه‌های شیمی و میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی نیشابور در سال ۱۳۹۵، انجام شد. نانو ذرات نقره به روش زیستی با استفاده از عصاره‌های آبی گیاهان شیرین بیان و نعناع تولید شدند. نانو ذرات با روش‌های اسپکتروفتومتر، میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscopy) مورد بررسی قرار گرفتند. به منظوربررسی اثر ضد باکتریایی نانو ذرات،۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره، جهت آزمون میکروبراث دایلوشن استفاده شد. مقایسه نتایج میانگین دو نوع نانو ذره با استفاده ازآزمون آماری Oneway ANOVA صورت گرفت.

یافته‌ها: آنالیز طیف‌سنجی UV-Vis و وجود پیک در ۴۳۰ نانومتر حاکی از سنتز زیستی این نانو ذرات در عصاره بود و عکس SEM ، شکل نانو ذرات را کروی و میانگین اندازه آن‌ها را در حدود ۵۵ نانومتر تعیین کرد. در بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات بیوسنتز شده، نانو ذرات اثر ضد باکتریایی خوبی را علیه باکتری‌های مورد مطالعه نشان دادند. میزان MIC (Minimum inhibitory concentration) برای نانو ذرات بیوسنتز شده با عصاره شیرین بیان در برابر باکتری‌های *Streptococcus mutans*، *Actinomyces viscosus* و *Lactobacillus rhamnosus* به ترتیب ۱/۵۶، ۶/۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ($p\leq ۰/۰۵$) و میزان MIC برای نانو ذرات بیوسنتز شده با عصاره نعناع در برابر باکتری‌های ذکر شده به ترتیب ۱۲/۵، ۱۲/۵ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ($p\leq ۰/۰۵$) تعیین شد.

نتیجه‌گیری: عصاره گیاهان به دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات ثانویه فراوان، نقش احیاکنندگی و پایدارسازی نانو ذرات را ایفا می‌کنند. در این پژوهش، نانو ذرات نقره به خوبی توسط عصاره آبی گیاهان شیرین بیان و نعناع سنتز شدند و نانو ذرات سنتز شده فعالیت ضد باکتریایی خوبی را علیه باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان مورد آزمون نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: بیوسنتز، نانو ذرات نقره، حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظت کشندگی

۱- دانشجوی دکترای شیمی‌تجزیه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نیشابور، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، نیشابور، ایران
۲- (نویسنده مسئول) دانشیار گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نیشابور، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، نیشابور، ایران
تلفن: ۰۵۱-۴۲۲۳۳۴۷۲، دورنگار: ۰۵۱-۴۲۶۱۵۴۷۲، پست الکترونیکی: r_zhiani2006@yahoo.com
۳- کارشناس ارشد ،مهندسی شیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی‌نیشابور، نیشابور، ایران

مقدمه

امروزه نانوفناوری به علّت کاربرد وسیع و فراوان در علوم و صنایع با سرعت بالایی در حال رشد می‌باشد. نانوفناوری علمی است که بر پایه نانوذرات استوار است. نانوذرات، موادی با ساختار سه بعدی می‌باشند که اندازه آن‌ها از ۱ تا ۱۰۰ نانومتر متغیر است. ذرات نانو می‌توانند با استفاده از روش‌های سبز و غیر سبز ساخته شوند. روش‌های غیر سبز شامل روش‌های شیمیایی و فیزیکی هستند. در روش‌های شیمیایی، مواد شیمیایی که برای ساخت و پایداری نانوذرات استفاده می‌شوند، سمی‌اند و به تولید محصولات جانبی منجر می‌شوند که با محیط زیست ناسازگارند. همچنین ساخت شیمیایی، اغلب منجر به حضور بعضی از مواد سمی جذب شده به سطح نانوذرات می‌شود که ممکن است اثر مضر بر روی استفاده دارویی از نانوذرات بگذارد. همچنین روش‌های فیزیکی دارای معایبی می‌باشند که از آن‌ها می‌توان به نیاز به فضا، انرژی و زمان اشاره کرد. از جمله مزیت استفاده از گیاهان در سنتز نانوذرات می‌توان استفاده آسان، امنیت زیستی، غیرسمی بودن، ارزانی و دارا بودن تنوع وسیعی از متابولیت‌ها که در عمل کاهش یون دخیل هستند را نام برد [۱].

امروزه با فناوری نانو توانسته‌اند نقره فلزی را به شکل ذراتی با سایز کمتر از ۱۰۰ نانومتر به وجود آورند که حاوی ۱۰۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰ اتم‌های نقره است؛ که آن‌ها را نانو ذرات نقره یا نانو نقره می‌نامند. فناوری تولید نانو نقره باعث بوجود آمدن انقلابی شگرف در مواد ضد باکتریایی است که جهت‌گیری اصلی برای گسترش محصولات نانو نقره می‌باشد و دارای مزایای بسیار زیادی نسبت به مواد شیمیایی است. این ذرات، خواص فیزیکو شیمیایی و فعالیت‌های بیولوژیکی ویژه‌ای از خود نشان می‌دهند. آن‌ها عوامل ضد باکتریایی مهمی بر علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. نانو مواد و به خصوص نانو مواد فلزی به علّت داشتن بار سطحی و نسبت سطح به حجم بالای خود، آنزیم‌ها و DNA میکروارگانیسم‌ها را با تعادل الکترون بین گروه‌های دهنده الکترون مثل تیول، کربوکسیلات، آمید، ایمیدازول، اندول و هیدروکسیل غیر فعال می‌نمایند. به طور کلی، ویژگی‌های عمده نانوذرات نقره شامل غیر سمی‌بودن، پایداری زیاد، آب‌دوست بودن، مقاومت حرارتی، عدم ایجاد و افزایش مقاومت در میکروارگانیسم‌ها است [۲]. طی دهه‌های اخیر توجه به شیوع بیماری‌های عفونی و مسری در سراسر دنیا بیشتر شده است. به منظور کنترل و پیشگیری از انتقال آن‌ها دستورالعمل‌هایی در زمینه مدیریت و کنترل عفونت‌ها در محیط‌های بهداشتی و درمانی ارائه شده است [۳] پوسیدگی دندان نیز یک بیماری عفونی-میکروبی است که موجب حل شدن و تخریب بافت‌های آهکی دندان می‌شود. درمان علامتی و ترمیمی بدون توجه به علّت زمینه‌ساز بیماری با شکست مواجه خواهد شد. از عوارض تداوم این بیماری از دست رفتن دندان‌ها، درد و عیوب زیبایی است. عامل اتیولوژیک اصلی شناخته شده برای پوسیدگی دندان استرپتوکوک‌های موتان و لاکتوباسیل‌ها هستند [۴]. درمان و پیشگیری از پوسیدگی با آنتی‌بیوتیک‌ها و استروئیدها پتانسیل اکسیداسیون-احیای بزاق را تغییر داده، فعالیّت لیزوزیوم را ضعیف کرده، شرایط ایجاد واکنش‌های آلرژیک را تسهیل می‌کند و باعث کاهش

مقاومت بدن نسبت به فاکتورهای پاتوژنیک می‌شود [۴]. از طرفی، استقبال گسترده‌ای از طب سنتی و داروهای گیاهی و نانوذرات بیوسنتز شده با گیاهان در زمینه‌های مختلف علوم پزشکی صورت گرفته است [۵]. تاکنون سنتز نانوذرات نقره با استفاده از گیاهان مختلف به اثبات رسیده است. Gardea torresdey و همکاران در سال ۲۰۰۳ برای اولین بار تولید نانوذرات نقره توسط گیاهان را گزارش کرده‌اند [۶]. همچنین گیاهان Chenopodium album، Sinensis camellia و Rhus coriaria توانستند یون‌های نقره را در اندازه‌های زیر ۵۰ نانومتر احیا کنند [۹-۷]. نانوذرات نقره سنتز شده از Garlic و Pinus eldarica با اندازه‌های به ترتیب ۴۰-۱۰ و ۳۰-۲۰ نانومتر خاصیت ضد میکروبی خوبی نسبت به برخی از باکتری‌ها از خود نشان دادند [۱۱-۱۰]. اخیراً سنتز نانوذرات نقره از میوه بلوط و فعالیت ضد میکروبی نسبتاً خوب آن علیه عفونت‌های بیمارستانی گزارش شده است [۱۲].

خواص ضد میکروبی ترکیبات نقره، سال‌های مدیدی است که شناخته شده است [۱۴-۱۳]. اما اخیراً به دلیل ساخته شدن آن به صورت نانوذرات، سطح تماس نقره افزایش یافته و خاصیّت ضد میکروبی آن تا بیش از ۹۹٪ افزایش پیدا کرده است [۱۵]. در مطالعات متعددی نیز مشخص شده که اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره به اندازه و شکل آن‌ها بستگی دارد [۱۷-۱۶]. در پژوهشی که توسط Espinosa و همکارانش انجام شد، نانوذرات نقره خاصیّت ضد باکتریایی قوی در مقابل باکتری استرپتوکوکوس موتانس از خود نشان دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که با کاهش اندازه نانوذرات نقره از ۱۰۰ نانومتر به ۱۶ نانومتر، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) نصف می‌گردد و این به معنای افزایش خاصیّت ضد باکتریایی نانوذرات نقره با اندازه کوچکتر می‌باشد [۱۸].

عصاره گیاهان که غنی از پلی‌فنیل‌هایی مانند فلاونوئیدها هستند، عوامل قدرتمندی برای کاهش بار در سنتز نانو ذرات نقره خواهند بود. این در حالی است که در تولید نانوذرات، روش‌های میکروبیولوژی با نرخی بسیار کندتر نسبت به عصاره گیاهان یا عوامل کاهنده دیگر عمل می‌کنند. لذا امروزه، استفاده از عصاره گیاهان در سنتز نانوذرات فلزی خصوصاً نقره، مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. نانوذرات سنتز شده به کمک عصاره گیاهان، به دلیل عدم استفاده از عوامل شیمیایی خارجی، می‌تواند دارای عوارض کمتری در مصارف پزشکی باشد [۱۹].

با توجه به مقاوم شدن سویه‌های بیماری‌زای مورد مطالعه نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های رایج، یافتن مواد جایگزین قادر به مهار رشد آن‌ها ضروری است. محیط دهان حاوی گونه‌های باکتریال متعددی است که استفاده از داروهای شیمیایی در حفره دهان با عوارضی از جمله تغییر در فلور میکروبی همراه است. با توجه به اینکه در کتب متعدد طب سنتی به اثرات ضد میکروبی این عصاره‌ها اشاره شده بود بر آن شدیم تا در یک مطالعه آزمایشگاهی، نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره آبی گیاهان شیرین بیان و نعناع سنتز کنیم و اثر ضد باکتریایی این نانوذرات سنتز شده به روش زیستی را بر سه سویه استاندارد عامل پوسیدگی دندانی به روش میکرو براث دایلوشن مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی شیمی و میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی نیشابور در سال ۱۳۹۵ انجام شد.

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده، با خلوص بالا تهیّه شدند. نمک نیترات نقره ($AgNO_3$)، هیدروکلریک اسید (HCl) و سدیم هیدروکسید (NaOH) از شرکت (MERCK، آلمان) و میکروارگانیسم‌های استفاده شده شامل *Lactobacillus rhamnosus* (PTCC 1202), *Streptococcus mutans* (PTCC 1683) *Actinomyces viscosus* , PTCC 1637) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. برای محلول‌سازی و شستشو نیز از آب دو بار تقطیر استفاده شد.

در این بررسی، گیاهان شیرین بیان و نعناع از شهرستان کاشمر واقع در استان خراسان رضوی جمع‌آوری شدند و توسط هرباریوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد، با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* و *Mentha piperata* و کد هرباریوم به ترتیب A124 و CD203 مورد تأیید قرار گرفتند.

جهت تهیه عصاره آبی، ابتدا ۱۰۰ گرم از گیاهان مورد مطالعه با سدیم هیپوکلریت ۵ درصد (MERCK، آلمان) به مدت ۵ دقیقه ضد عفونی و بعد از آن ۳ بار و هر بار یک دقیقه با آب مقطر (کیمیا تهران اسید، ایران) شسته شدند. در ادامه، گیاهان با الکل ۷۰٪ (MERCK، آلمان) به مدت ۲ دقیقه ضد عفونی و در نهایت ۳ بار و هر بار ۲ دقیقه با آب مقطر شسته شدند. برای تهیّه عصاره آبی، ابتدا ۳۰ گرم از گیاه مورد مطالعه شسته شده و در دمای اتاق گذاشته شد تا کاملاً خشک شود. سپس این مقدار از گیاه در یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتر (زرین پیرکس، ایران) ریخته شد و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر (زلالان شریف پارس، ایران) به آن اضافه گردید. این مخلوط برای مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. عصاره آبی با استفاده از کاغذ صافی (Whatman، انگلستان) (با منافذ ۲۵ میکرونی) صاف شد و برای حذف ذرات معلق موجود در عصاره، نمونه توسط سانتریفیوژ (Sorvall Superspeed RC2-B، انگلستان) با سرعت ۹۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس عصاره در فالکن (کاریزمهر، ایران) ریخته شد و برای استفاده‌های بعدی در یخچال (امرسان، ایران) در دمای ۴ - درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. جهت استاندارد کردن روش و تکرارپذیری آن وزن خشک عصاره‌ها تعیین گردید. بدین صورت که از هر یک از عصاره‌های آبی، ۱ میلی‌لیتر به لوله‌های آزمایش جداگانه اضافه شد. سپس عصاره‌های داخل لوله‌ها، در آون (Memmert، آلمان) در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. در نهایت، با کم کردن وزن لوله‌های خالی، میانگین وزن خشک عصاره‌ها در میلی‌لیتر بدست آمدکه با توجه به این اوزان، رقت‌های مختلف عصاره‌ها آماده شد [۲۰].

جهت بیوسنتز نانوذرات نقره ابتدا از هر یک از عصاره‌های گیاهی غلظت‌های ۰/۰۳، ۰/۰۶، ۰/۱۲ گرم بر لیتر تهیه شد و برای تیمار عصاره‌ها نیز، از نمک نیترات نقره (MERCK، آلمان) با غلظت ۱ میلی‌مولار استفاده شد. سپس به ۳ میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌ها با غلظت مشخص در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH= ۵/۶، ۱۰۰ میلی‌لیتر نبترات نقره ۱ میلی‌مولار، اضافه گردید در حالی که به شاهد نیترات نقره اضافه نشد. عصاره‌های تیمار شده در گرمخانه شیکر (Stuart، انگلیس) در دمای

۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه و در شرایط تاریکی قرار گرفتند. محلول‌های مورد نظر هر ۱۵ دقیقه برای مشاهده تغییر رنگ به صورت چشمی مورد بازدید قرار گرفتند و با مشاهده اولین تغییر رنگ نمونه‌ها نسبت به شاهد با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-vis (Cecil 9200، انگلیس) خوانده شدند. برای به دست آوردن غلظت نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط عصاره گیاه، محلول کلوئیدی با سرعت ۹۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته شد و به منظور شستشو و پراکنده نمودن نانوذرات ته نشین شده، با اضافه کردن آب دیونیزه، عمل سانتریفیوژ ۳ بار تکرار گردید. پس از هر بار سانتریفیوژ، فاز رویی جدا و به ماده ته نشین شده آب دیونیزه اضافه شد. پس از عمل سانتریفیوژ، سوسپانسیون باقیمانده بر روی ویفر سیلیکونی (غرب آپادانا، ایران) نشانده شد تا خشک گردد. سپس نانوذرات نقره خشک شده توزین و غلظت آن به صورت تقریبی بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد [۲۰].

رنگ محلول مورد نظر پس از تولید شدن نانوذرات به قهوه‌ای تیره تغییر می‌کند. این تغییر نشانه تولید نانوذرات نقره می‌باشد. پس از مشاهده تغییر رنگ، نانوذرات تولید زیستی شده به منظور تشخیص بهتر و مشخص شدن خصوصیات با سایر روش‌ها مورد بررسی قرار گرفتند [۱۹].

به منظور میزان احیای یون‌های نقره (Ag^+) و تأئید ساخت نانوذرات نقره، بعد از اضافه کردن محلول یک میلی‌مولار نیترات نقره به عصاره و مشاهده تغییر رنگ، ۰/۲ میلی‌لیتر از نمونه برداشته شد و با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد و جذب آن توسط دستگاه طیف‌سنج فرابنفش- مرئی در طول موج‌های ۷۰۰-۳۰۰ نانومتر خوانده شد [۲۰].

مورفولوژی و اندازه نانوذرات نقره در این تحقیق با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (Philips XL 30، هلند) تعیین شد. برای این منظور، رسوب حاصله از برهم‌کنش سه مرتبه و با سرعت ۱۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ، و از رسوب حاصل توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی عکسبرداری شد [۲۱].

حداقل غلظت مهارکنندگی یا MIC نانوذرات بیوسنتز شده با استفاده از روش Micro-broth dilution (رقت-سازی در چاهک) تعیین گردید. برای این منظور، از میکرو پلیت‌های استریل ۹۶ خانه‌ای (SPL Lifesciences، کره) استفاده شد. ابتدا غلظت‌های سریالی از نانوذرات تهیّه گردید. سپس از هر یک از غلظت‌های تهیّه شده، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و داخل خانه‌های میکروپلیت ریخته شد. چون ۷ رقت از هر عصاره تهیه شده بود (۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ۷ خانه از میکروپلیت نیز با ۱۰۰ میکرولیتر نانوذره پر شد. سپس ۹۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث (MERCK, Germany) و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند به ۷ چاهک میکروپلیت حاوی عصاره، افزوده شد. یعنی حجم نهایی در هر خانهٔ پلیت ۲۰۰ میکرولیتر بود. در یک ردیف، از تمام رقّت‌های نانوذره، همراه محیط کشت بدون تلقیح باکتری جهت در نظر گرفتن کدورت ناشی از نانوذره استفاده شد. در یک چاهک نیز باکتری به همراه محیط کشت بدون تلقیح نانوذره ریخته شد (به عنوان شاهد مثبت) و تأثیر نانوذرات بر روی رشد باکتری‌های مورد آزمون با کدورت

این چاهک مقایسه گردید. پس از کشت، میکروپلیت‌ها روی شیکر (IKA، آلمان) به مدّت سه ثانیه قرار داده شدند تا مخلوط کاملاً یکنواخت گردد. سپس در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدّت ۲۴ ساعت در انکوباتور (Shinsaeng، کره)، انکوبه شدند. آزمایش برای هر کدام از غلظت‌های مختلف اسانس ۳ بار تکرار گردید و پس از مدّت زمان انکوباسیون، کدورت چاهک‌ها توسط دستگاه Reader ELISA (مدل ELX 800 ساخت شرکت BioTek آمریکا) در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. وجود کدورت (در مقایسه با ردیف کنترل منفی) حاکی از رشد باکتری و شفافیّت نشان‌دهنده عدم رشد باکتری می‌باشد. با مقایسه کدورت چاهک‌های تحت تیمار با نانوذره و باکتری و چاهک‌های شاهد، رشد باکتری در مقابل نانوذرات مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت میزان MIC مشخص شد. پایین‌ترین غلظتی از نانوذره که در آن هیچ‌گونه رشدی از باکتری مشاهده نشد (فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری) به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی یا MIC در نظر گرفته شد و به صورت میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید [۲۲].

حداقل غلظت کشندگی باکتری یا MBC (Minimum bactericiadal concentration)، با توجّه به مقادیر MIC تعیین شد. به طوری که مقدار ۱۰ میکرولیتر از رقّت MIC و چند رقّت بالاتر از آن بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (MERCK، آلمان) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در انکوباتور قرار گرفت. سپس پلیت‌ها از نظر رشد باکتری بررسی شدند و پایین‌ترین غلظتی از نانوذره که ۹۹/۹٪ باکتری در آن رشد نکرده بود، به عنوان حداقل غلظت کشندگی یا MBC در نظر گرفته شد[۲۳].

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۱ و تست آماری Oneway ANOVA انجام شد. تمام نتایج به صورت میانگین‌های حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی دو نوع نانوذره، با سه بار تکرار آزمون، گزارش شدند. در تمام موارد P value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید [۲۴].

نتایج

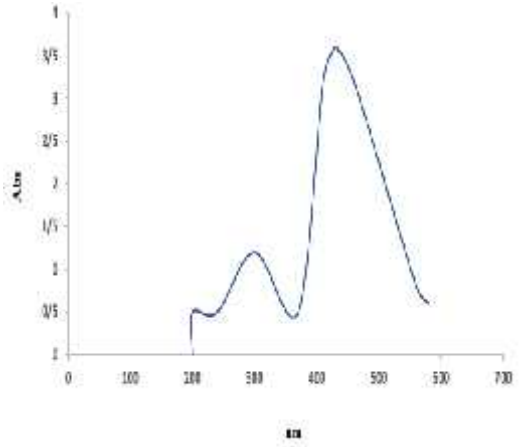
میانگین وزن خشک عصاره‌های آبی شیرین بیان و نعناع به ترتیب ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد. عصاره آبی گیاهان زرد کم‌رنگ بود که پس از افزودن محلول نیترات نقره و قرار گرفتن در دمای محیط به مدت ۴ ساعت به قهوه‌ای تیره تغییر رنگ داد (شکل‌های ۱ و ۲) که با منابع هم خوانی داشت. ظاهر شدن رنگ قهوه‌ای تیره پس از واکنش با یون نقره، شاخص واضح و روشن از احیای یون‌های فلزی و تشکیل نانوذرات نقره در محیط است [۲۵].

شکل ۱- تغییر رنگ عصاره شیرین بیان/محلول نیترات نقره با گذشت زمان

شکل ۲-تغییر رنگ عصاره نعناع/محلول نیترات نقره با گذشت زمان

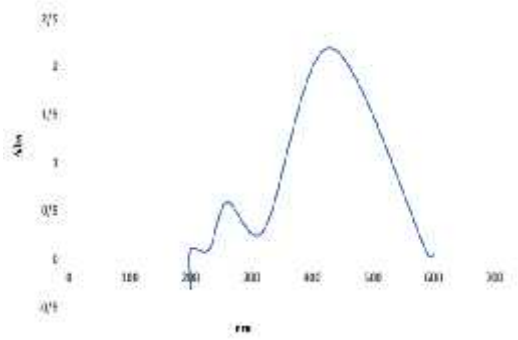
هنگامی که تغییر رنگ با تشکیل رسوب همراه باشد یعنی نانوذره‌ی تشکیل شده دارای اندازه ذرات بزرگ بوده و زمانی که تغییر رنگ داده و رسوب تشکیل نشده باشد یعنی نانوذره‌ی سنتز شده دارای اندازه ذرات بسیار

کوچکی می‌باشد و بهترین حالت است. در هیچ یک از محلول‌های نانوذرات تولید شده با عصاره گیاهان رسوب تشکیل نشده بود.



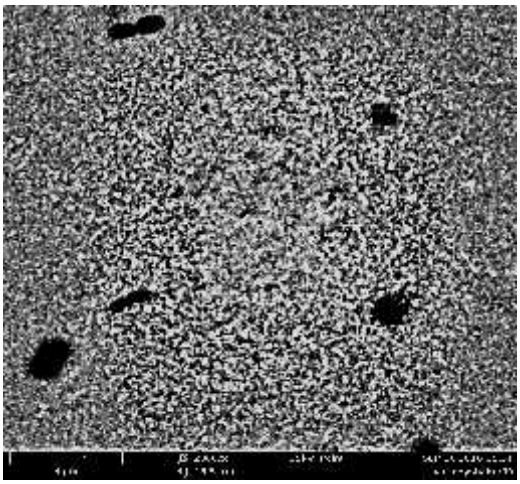
نمودار ۱- طیف جذبی از نانوذرات نقره در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با غلظت ۱ میلی‌مولار نیترات نقره و ۵ میلی‌لیتر عصاره شیرین‌بیان

جهت اثبات وجود نانوذرات در نمونه‌ها و پایداری آن‌ها، طیف جذبی آنها پس از تغییر رنگ به قهوه‌ای تیره در محدوده ۳۰۰-۷۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. با توجه به اینکه نانوذرات نقره بین ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر جذب نور دارند، نمودارهای ۱ و ۲ نشان می‌دهند که مشخصه باند جذب تشدید پلاسمون سطحی در ۴۳۰ نانومتر برای نانوذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره شیرین بیان و نعناع رخ داده است.

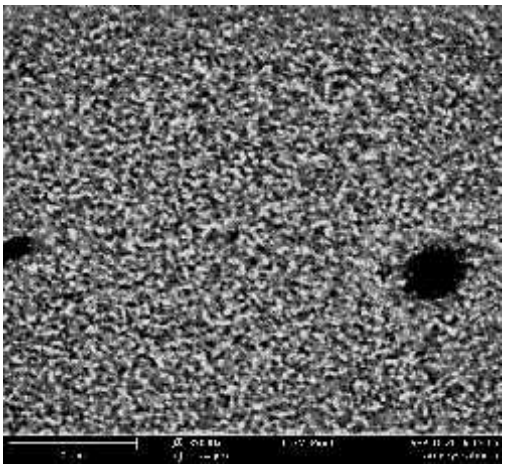


نمودار۲- طیف جذبی از نانوذرات نقره در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با غلظت ۱ میلی مولار نیترات نقره و ۵ میلی‌لیتر عصاره نعناع

اندازه و شکل نانوذرات تولیدی نیز توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره تعیین شد. شکل‌های ۵ و ۶ تصاویر SEM از پودر نانوذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره‌های آبی شیرین بیان و نعناع را نشان می‌دهد. با توجه به شکل، نانوذرات نقره کروی با میانگین اندازه ۶۸ و ۷۵ نانومتر به ترتیب با عصاره‌های آبی نعناع و شیرین بیان سنتز شدند.



شکل ۵-عکس تهیه شده از نانوذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره آبی شیرین بیان توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی



شکل ۶-عکس تهیه شده از نانوذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره آبی نعناع توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی

در نتایج میکروبراث دایلوشن، میزان MIC و MBC (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)، و سطح معنی‌داری آن برای هر کدام از نانوذرات بر روی هر سه گونه باکتری در جدول ۱ نشان داده شده است. کوچکتر بودن میزان MIC و MBC به معنی بالاتر بودن اثر آنتی‌باکتریال است. در مورد لاکتوباسیل میزان MIC و MBC برای نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره شیرین بیان به طور معنی‌داری از میزان MIC و MBC نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره نعناع کمتر است. در مورد *Streptococcus mutans*، MIC برای نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره شیرین بیان به طرز معنی‌داری از میزان MIC نانو ذرات بیوسنتز شده با عصاره نعناع کمتر است ولی MBC تفاوت معنی‌داری ندارد. در مورد اکتینومیسس ویسکوز میزان MIC و MBC برای نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره شیرین بیان به طور معنی‌داری از میزان MIC و MBC نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره نعناع کمتر است.

جدول ۱-میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانوذرات بیوسنتز شده در برابر باکتری‌ها

گونه باکتری	MIC و MBC بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر	نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره شیرین بیان	نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره نعناع	نتیجه تست آماری
Streptococcus mutans	MIC	۱/۵۶	۱۲/۵	p=۰/۰۱
	MBC	۱۲/۵	۱۲/۵	p=۰/۰۸
Actinomyces viscosus	MIC	۶/۲۵	۱۲/۵	p=۰/۰۱
	MBC	۶/۲۵	۱۲/۵	p=۰/۰۱
Lactobacillus rhamnosus	MIC	۵۰	۲۰۰	p=۰/۰۱
	MBC	۱۲/۵	۱۰۰	p=۰/۰۱

مقایسه میانگین‌های حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی دو نوع نانوذره با استفاده از آزمون Oneway ANOVA. P value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

بحث

در این مطالعه با استفاده از عصاره‌های آبی گیاهان شیرین بیان و نعناع به روش احیای زیستی، نانوذرات نقره تولید گردید. اساس سنتز نانوذرات، احیای یون‌های نمک آن‌ها و در واقع خنثی شدن بار الکتریکی است. در این مطالعه این فرآیند طی مدّت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تکمیل گردید که نشان‌دهنده سرعت بالای این روش و بی‌نیازی آن به دماهای بالا جهت تشکیل نانوذرات نقره است که با نتایج حاصل از پژوهش Sivaraman و همکاران و Sathyavath و همکاران مشابهت دارد [۲۷-۲۶]. عصاره نعناع و شیرین بیان با دارا بودن فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، تری‌ترپنوئیدها و ساپونین‌ها

پتانسیل بالایی برای کاهش نانوذرات نقره را دارد. همچنین این گیاهان حاوی موادی مانند سیکلوپپتیدها، ایزوکوئینولین و گلیکوزیدها می‌باشند که می‌تواند در تولید نانوذرات نقره نقش مؤثری داشته باشد. اکسایش گروه‌های عاملی مانند هیدروکسیل، کربونیل، آلدئید می‌تواند باعث کاهش یون‌های نقره شود که نتیجه این امر تولید نانوذرات نقره می‌باشد [۲۹-۲۸]. تغییر رنگ محلول حاوی نانوذرات کلوئیدی نقره از زرد به قهوه‌ای ناشی از پدیده‌ای است که به آن پلاسمون رزونانس سطحی (Surface Plasmon Resonance) می‌گویند. تغییر رنگ مشاهده شده در این پژوهش، در اثر برهم کنش عصاره گیاه و محلول نمک نقره، با نتایج حاصل از پژوهش Reddy و Gandhi کاملاً مشابه بود و اولین نشانه از تولید نانوذرات نقره محسوب می‌شود [۳۰].

پیک جذبی نانوذرات نقره حدوداً در طول موج ۴۳۰ نانومتر می‌باشد که بسته به شرایط و اندازه ذرات، محل پیک جذبی تغییر می‌کند. در واقع، دانستن محدوده پیک جذبی به ما اطلاعاتی در مورد اندازه ذرات هم می‌دهد. طیف‌های UV-Vis ثبت شده به طور کامل نشان‌دهنده افزایش ارتعاشات پلاسمون سطحی در طول موج ۴۳۰ نانومتر است که با نتایج حاصل از پژوهش Thangaraju و همکاران مشابه بود [۳۱].

در مطالعه Zeng Q و همکارانش آمده است که پیک مربوط به نانوذرات نقره معمولاً در محدوده ۴۲۰-۴۰۰ نانومتر ظاهر می‌شود. نقره در حالت توده‌ای دارای پیک جذبی در طول موج ۳۱۶ نانومتر است. در حالی که پیک تشکیل شده در طول موج ۴۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر، نشان دهنده تشکیل نانوذرات نقره و مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات نقره می‌باشد که به القای الکترون‌های آزاد در نانوذرات نسبت داده می‌شود [۳۲]؛ بنابراین، پیکی که در حدود ۳۱۶ نانومتر در مطالعه حاضر دیده شده مربوط به نقره توده‌ای می‌باشد و تنها پیک در طول موج ۴۳۰ نانومتر به نانوذرات نقره مربوط می‌شود.

نتایج حاصل از SEM نشان می‌دهد دامنه نانوذرات تولید شده به روش زیستی در محدوده ۴۰ تا۷۰ نانومتر و به شکل دایره‌ای است که با نتایج سایر محققین نیز همخوانی دارد؛ لازم به ذکر است ویژگی‌ها و فعالیت زیستی این نانوذرات با استفاده از اندازه آن‌ها کنترل می‌شود [۳۳]. نانوذرات بیوسنتز شده از عصاره شیرین بیان و نعناع هر دو کروی بودند اما اندازه نانوذرات بیوسنتز شده از عصاره شیرین بیان کمتر از نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره نعناع بود. مطالعات نشان داده‌اند که تفاوت ساختاری و ژنتیکی گونه‌ها و تنوع و نوع عوامل کاهنده در عصاره‌ها بر اندازه نانوذرات مؤثر است [۳۴]. احتمالاً تنوع ترکیبات موجود در عصاره شیرین بیان و قدرت کاهندگی بهتر آن‌ها سبب اندازه کوچک‌تر نانوذرات حاصل از آن‌ها شده است. اندازه ذرات و شکل نانوذرات نقره عاملی مهم برای خاصیّت ضد باکتریایی آنها به شمار می‌رود به گونه‌ای که کاهش اندازه ذرات باعث درگیری مناسب با باکتری شده و این خاصیّت را افزایش می‌دهد. کاهش اندازه ذرات باعث افزایش رها شدن یون نقره از سطح شده و خاصیّت ضد باکتریایی بیشتری را فراهم می‌کند [۳۵]. شاید به این دلایل خاصیت ضد میکروبی نانوذرات بیوسنتز شده از عصاره شیرین بیان در مقایل باکتری‌های مورد بررسی بیشتر از نوع دیگر نانو ذره بود.

نتایج مطالعه حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) این دو نوع نانو ذره بر روی سه باکتری عامل پوسیدگی دندان، حاکی از این موضوع است که هر دو نوع نانو ذره دارای اثر بازدارندگی رشد و اثر کشندگی بر باکتری‌های این تحقیق بوده‌اند. در غلظت‌های پایین نانوذرات، رشد باکتری‌ها وجود داشت امّا افزایش غلظت نانوذرات، کاهش رشد باکتری‌ها را به دنبال داشت. لذا اثرات ضد باکتریایی ارتباط مستقیم با میزان غلظت نانوذرات نقره بیوسنتز شده داشت. با بررسی رشد یا عدم رشد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف از نانوذرات، حداقل غلظت بازدارنده آن مشخص شد. مقایسه اثر ضد باکتریایی نانوذرات بیوسنتز شده با دو نوع عصاره نشان می‌دهد که اثر ضد باکتریایی نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره شیرین بیان بر روی این باکتری‌ها به ویژه بر روی باکتری *Streptococcus mutans* بیشتر از نانو ذره دیگر است. در بین باکتری‌های مورد مطالعه مقاومت باکتری *Lactobacillus rhamnosus* در مقابل نانو ذرات بیوسنتز شده بیشتر از باکتری‌های *Streptococcus mutans* و *Actinomyces viscosus* گزارش شد. Krishnaraj C و همکاران کمترین غلظت مهارکنندگی نانوذرات نقره را بر روی دو سویه استاندارد *Escherichia coli* و *Vibro cholera* معادل ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش نمودند [۳۶]. تأثیر نانوذرات نقره با میانگین اندازه ۷ و ۷۰ بر روی *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus cereus* توسط Khaydarov و همکاران، مورد بررسی قرار گرفت. کمترین غلظت مهارکنندگی نانوذرات نقره بر روی هرسه سویه برای نانوذرات نقره با میانگین قطر ۷ نانومتری برابر با ۳، ۲ و ۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود [۳۷].

در مطالعات قبلی گزارش شده است که اندازه و شکل ذرات نقره عاملی مهم برای خاصیّت ضد باکتریایی نانوذرات نقره به شمار می‌رود؛ به گونه‌ای که کاهش اندازه ذرات باعث درگیری مناسب با باکتری شده و این خاصیت را افزایش می‌دهد.کاهش اندازه ذرات باعث افزایش یون نقره آزاد شده از سطح شده و خاصیّت ضد باکتریایی بیشتری را فراهم می‌نماید. افزون بر اندازه نانوذرات، شکل ذرات نیز مؤثر بوده و ریخت‌شناسی کروی شکل، توانایی درگیری با باکتری و در نهایت انهدام باکتری را دارد [۳۸]. همانطور که در شکل‌های۴ و ۵ دیده می‌شود، نانوذرات نقره در این مطالعه تقریباً کروی می‌باشند و پژوهش‌ها نشان داد که بهترین شکل نانوذرات نقره برای جلوگیری از رشد باکتری به ترتیب نانوذرات گوشه‌دار بی‌شکل، نانوذرات کروی و نانوذرات میله‌ای شکل می‌باشند زیرا به ترتیب توانایی درگیری بیشتری با باکتری‌ها دارند [۴۰-۳۹]. بنابراین، انتظار می‌رود که خاصیّت ضد باکتریایی خوب نانوذرات بیوسنتز شده در این مطالعه به دلیل اندازه نسبتاً کوچک و شکل مناسب آن‌ها باشد. Durner و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که نانوذرات در غلظت‌های بالاتر از ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بر فرآیند پلی‌مریزاسیون مواد دندانی حاوی نقره تأثیر گذاشته و باعث کاهش سازگاری نسجی آن‌ها می‌شود. به این دلیل در مطالعه حاضر، از نانوذرات نقره در غلظت‌های پایین‌تر از ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد [۴۱].

سازوکار اصلی خاصیّت ضد باکتریایی نانوذرات نقره، رهایش یون‌های نقره است. در هر حال سازوکار فعالیّت

یون‌های نقره از دیدگاه میکروبیولوژی مولکولی هنوز به طور کامل شناخته نشده است. برخی از سازوکارهای اصلی عبارت است از: آسیب به غشاء سلولی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و حمله سلولی یون‌های نقره (یا حتی نانوذرات نقره به دلیل وجود حفرات غشایی) و در ادامه آسیب به محصولات ATP و بازدارندگی تکثیر DNA. در پژوهش‌های بسیاری، آسیب به غشاء سلولی به وسیله یون‌های نقره گزارش شده است. این گزارش‌ها عمدتاً بر پایه مشاهده حفره‌ها یا سوراخ‌های بزرگ در غشا باکتریایی با آنالیز TEM است. ممکن است یون‌های نقره با پروتئین‌های غشایی حاوی سولفور (به عنوان مثال با گروه تیول پروتئین زنجیره تنفسی) برهم کنش داده و باعث آسیب فیزیکی به غشا شوند [۴۲].

Nam در مطالعه خود، با اضافه کردن نانوذرات نقره با درصدهای وزنی مختلف ۰/۱ درصد تا ۳ درصد به موادی در تماس با بافت دهانی در دوره محدود با هدف کمک به بازگشت به شرایط سالم (Tissue conditioner)، اثر ضد باکتریایی آن را بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوک موتانس نشان داد. به طوری که با افزایش غلظت نانوذرات، این اثر تشدید می‌شد [۴۳].

Sondi و Salopek-Sondi اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره را علیه اشرشیاکلی نشان دادند. آن‌ها بر این نظریه تأکید کردند که در مواجهه با نانوذرات نقره، میکروارگانیسم‌ها توانایی همانندسازی خود را از دست داده و پروتئین‌های سلولی غیر فعال می‌شوند [۴۴]. با توجه به در دسترس بودن گیاهان مورد مطالعه در کشور ما و امکان تهیّه آن با هزینه‌های کمتر نسبت به داروهای دیگر و همچنین با توجه به خواص ضد باکتریایی نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره این گیاهان، ممکن است نتایج این گونه تحقیقات مورد توجه محققین، متخصصین و تولید کنندگان داروها قرار گیرد تا در صورت تهیّه آن به شکل دارو و یا خمیر دندان، بتواند در زمینه مقابله با عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها مورد استفاده واقع شود.

یکی از محدودیت‌های این پژوهش، عدم بررسی نقش فاکتورهای مؤثر و تداخل آن‌ها در اندازه نانوذرات بود و صرفاً قابلیت تولید نانو نقره از عصاره گیاهان شیرین بیان و نعناع و اثر ضد میکروبی آن بر روی باکترهای عامل پوسیدگی دندان ارزیابی شد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود با استفاده از مدل‌سازی ریاضی و کمو متریکس، نقش فاکتورهای مختلف دخیل در اندازه ذره‌ای بررسی گردد تا با تغییر فاکتورهای مؤثر، شرایط بهینه تولید این نانوذرات در اندازه ذره‌ای دلخواه مشخص گردد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر نانوذرات نقره با استفاده از عصاره‌های آبی گیاهان نعناع و شیرین بیان بدون نیاز به صرف انرژی و مواد اولیه گران قیمت، تولید شدند. نانوذرات کلوئیدی، به صورت ذرات ریز میکروسکوپی منتشر شده؛ بنابراین به راحتی می‌توانند به داخل سلول‌های باکتری نفوذ کنند و در این مطالعه، نانوذرات تولید شده اثر ضد میکروبی خوبی بر روی باکتری‌های دهانی مورد بررسی نشان دادند؛ لذا استفاده از این نانوذرات بر اساس تأثیرات بیولوژیکی‌شان، می‌تواند جهت مقابله با عفونت‌های ناشی از باکتری‌های دهانی مورد مطالعه، مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه همکاران در آزمایشگاه‌های شیمی و میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی نیشابور، به خاطر راهنمایی‌ها و همکاری‌های بی‌دریغ‌شان در تمام مراحل پژوهش، تقدیر و تشکر می‌شود.

References

[1] Roy N, and Barik A. Green Synthesis Of Silver Nanoparticles From The Unexploited Weed Resources. *IJNT* 2010; 4: 95–101.

[2] Percival SL, Bowler PG and Dolman J. Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an in vitro biofilm model. *IWJ* 2007; 4: 186–91.

[3] Saburi A, Fallah F, Dastgiri M .Evaluation of Antimicrobial Effect of Micro 10 and Deconex 53plus on Dental Instruments . *J.I.D.A* 2008; 18(4): 49-55.

[4] Androw JM. BSAC Standardized disc susceptibility testing method. *JACH* 2001; 7(5): 48 - 57.

[5] Fabrican DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *EHP* 2001; 109 (1): 69 – 75.

[6] Gardea torresdey JL, Parsons JG, Dokken K, Peraltavidea J, Troiani HE, Santiago P et al. Alfalfa sproutsa natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *LANGD* 2003; 19: 1357-61.

[7] Dwivedi AG, Gopol K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using Chenopodium album leaf extracts. *Colloids Surf. A* 2010; 360: 27-33.

[8] Kamal SSK, Prasanta HRS, Johnson V, Manda P, Shankar R, Loganathan D. A novel green chemical route for synthesis of Silver Nanoparticles using Camellia sinensis. *Acta Chim Slov* 2010; 57: 808-12.

[9] Ghorbani P, Hamidialamdari D, Namvar F, Yaghmaei P. Investigating the antioxidant properties of Silver Nanoparticle synthesized by green method. *JBRMS* 2016; 7: 81-9. [Persian]

[10] Iravani S, Zolfaghari B. Green synthesis of Silver Nanoparticles using Pinus eldarica barks extract. *BioMed Res. Int.* 2013; 78: 1-5.

[11] Vonwhite G, Kerscher P, Brown RD, Morella J, Mcallister W, Dean D, et al. Green synthesis of robust biocompatible Silver Nanoparticles using Garlic extract. *JNM* 2012; 26:1-12.

[12] Chahardooli M, Khodadadi E. The biosynthesis of Silver Nanoparticles using Oak fruit extract and investigating their anti-microbial activities against

nosocomial infection agents. *Med Sci* 2014; 22: 27-33. [Farsi]

[13] Hannan A, Saleem S, Chaudhary S, Barkaat M ,Arshad MU.Anti-bacterial activity of nigella sativa against clinical isolates of methicillin resistant Staphylococcus aureus . *JAMC* 2008; 20(3): 72-4.

[14] Ahmed Chaudhry NM, Tariq P.In vitro antibacterial activities of Kalonji Cumin and poppy seed. *Pak. J Bot* 2008; 40(1): 461-7.

[15] Ling Z, Kong J, Jia P, Wei CA ,Wang Y,Pan Z et al. Anlysis of oral microbiota in children with dental caries by PCR-DGGE and barcoded pyro sequencing. *Microb Ecol* 2010; 60(3): 677-90.

[16] Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Nanomedicine: NBM* 2012; 8: 37–45.

[17] Pal S, Tak YK and Song JM. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle?. *AEM* 2007; 73: 1712-20.

[18] Espinosa-Cristóbal LF, Martínez-Castañón GA, Martínez-Martínez RE, Loyola-Rodríguez JP, Patiño-Marín N, Reyes-Macías,Facundo Ruiz JF. Antibacterial Effect of Silver nanoparticles Against Streptococcus mutans. *MATER LETT* 2009; 63: 2603-6.

[19] Gnanadesigan M, Anand M, Ravikumar S, Maruthupandy M, Syed-Ali M, Vijayakumar M and Kumaraguru AK. Antibacterial Potential of Biosynthesised Silver Nanoparticles using Avicennia Marina MangrovePlant. *Appl Nanosci* 2012; 2: 143-7.

[20] Kannan RR, Arumugam R, Ramya D, Manivannan K and Anantharaman P. Green synthesis of silver nanoparticles using marine macroalga Chaetomorpha linum. *Appl Nanosci* 2013; 3: 229-33.

[21] Nagati V, Koyyati R. Green synthesis and cracterization of silver nanoparticles from Cajanus Cajan leaf extract and its antibacterial activity. *Dig J Nanomater Biostruct* 2012; 2: 39-43.

[22] 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* 2011; 79: 594-98.

[23] Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nano-particles against gram-positive and gram-negative bacteria. *NMJ* 2012; 8: 37-45.

[]Zomorodian K, Pourshahid SM, Sadatsharifi A, Mehryar P, Pakshir K, Rahimi MJ and Arabi Monfared A. Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles by Aspergillus Species. *BioMed Res. Int.* 2016; 6: 1355-400.

[25] Roy N, BarikA. Green Synthesis of Silver Nanoparticles from the Unexploited Weed Resources. *IJNA* 2010; 4: 95-101.

[26] Sivaraman SK, Elango SK, Santhanam V. A green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds. *IJCR* 2009; 97: 1055-9.

[27] Sathyavath R, Balamurali KM, Venugopal RS, Saritha R, Narayana RD. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Coriandrum Sativum Leaf Extract and Their Application in Nonlinear Optics. *Adv Sci Let* 2010; 3: 138-43.

[28] Talpur AD. Mentha piperita(Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, Lates calcarifer(Bloch) against Vibrio harveyiinfection. *Aqua* 2014; (420-421): 71-8.

[29] Douglas JA, Douglas MH, Lauren DR, Martin RJ, Deo B, Follett JM and Jensen DJ. Effect of plant density and depth of harvest on the prodaction and quality of licorice (Glycyrrhiza glabra) root harvested over 3 years. *NEW ZEAL J CROP HORT* 2004; 32: 363-73.

[30] Reddy GR, Gandhi NN. Environmental friendly biosynthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles by using Senna Saimea plant leaf aqueous extract. *Int J Iins Pharm Life Sci* 2012; 2(1): 186-93.

[31] Thangaraju N, Venkatalakshmi RP, Chinnasamy A. Synthesis of silver nanoparticles and the antibacterial anticancer activities of the crude extract of Sargassum polycystumC. Agardh. *Nano Biomed. Eng* 2012; 4(2): 89-94.

[32] Zeng Q, Jiang X, Yu A. And Lu G. (Max). Growth Mechanisms Of Silver Nanoparticles: A Molecular Dynamics Study. *IJNT* 2007 ; 18(2) :1-7.

[33] Devina Merin D, Prakash S, Valentine Bhimba B. Antibacterial screening of silver nanoparticles synthesized by marine micro algae. *Asian Pac J Trop Med* 2010; 3: 797-9.

[34] Kumar P, Senthamil Selvi S, LakshmiPrabha A, Prem Kumar K, Ganeshkumar RS.and Govindaraju M. Synthesis of silver nanoparticles from Sargassum tenerrimum and screening hytochemicals for its antibacterial activity. *Nano Biomed Eng* 2012; 4: 2-16.

[35] Kumar P, Senthamil Selvi S, Lakshmi Prabha A, Selvaraj M, Macklin Rani L, Suganthi P and Govindaraju M. Antibacterial activity and in-vitro cytotoxicity assay against brine shrimp using silver nanoparticles synthesized from Sargassum ilicifolium. *Dig J Nanomater Bios*; 7: 1447-55.

[36] Krishnaraj C, Jagan EG, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan PT, Mohan N. Synthesis of silver nanoparticles using Acalypha indica leaf extract and its antibacterial activity against water born pathogens. *Colloids Surf. B* 2010; 76: 50-6.

[37] Khaydarov R, Khaydarov R, Estrin Y, Evgrafova S, Scheper T, Endres C, Cho S. Silver Nanoparticles,Environmental and Human Health Impacts.Nanomaterials:Risks and Benefits. NATO Science for Peace And Security Series C. *Environ. Sci. Technol* 009; 3: 287-97.

[38] Suwanchawalit C, Chanhom1 P, Sriprang P and Wongnawa S. A Ag-Doped TiO2 Photocatalyst for Dye Decolorization under UV and Visible Irradiation. *PACCON* 2011; 6: 263-70.

[39] Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles

using four species plant and investigation of their antimicrobial activity. *Iranian J Chem Eng*2014; 4: 1-9. [Farsi]

[43] Nam KY. In vitro antimicrobial effect of the tissue conditioner containing silver nanoparticles. *JAP* 2011;3(1):20-4.

[44] Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles asantimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*2004; 275(1): 177-82.

Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Nanomedicine: NBM* 2012; 8: 37–45.

[40] Ashkarran AA. Antibacterial Properties of Silver-Doped TiO2 Nanoparticles Under Solar Simulated light. *IJTAP* 2011; 4: 1-8.

[41] Durner J, Stojanovic M, Urcan E, Hickel R, Reichl FX .Influence of silver nano-particles on monomer elution fromlight-cured composites. *Dent Mater* 2011; 27(7): 631-6.

[42] Moadi T, Ghahramanzadeh R, Yosofi M, Mohammadi, F. Synthesis of silver nanoparticles

The Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Plants of *Glycyrrhiza glabra* and *Mentha Piperata* and Its Antimicrobial Effect on Some Bacterias That Cause Tooth Decay

Sh. Emrani[1], R. Zhiani[2], M. Dafe Jafari[3]

Received: 03/05/2017 Sent for Revision: 09/07/2017 Received Revised Manuscript: 30/12/2017 Accepted: 31/12/2017

Background and Objectives: Considering the alarming spread of resistance to classic antimicrobial agents, innovative therapeutic approaches to combat antibiotic-resistant pathogens, like the compounds derived from plants and nanoparticles, seems necessary. This study was conducted to investigate the antibacterial effect of biosynthetic silver nanoparticles using *Glycyrrhiza glabra* and *Mentha piperata* plants on some tooth decay bacteria.

Materials and Methods: This descriptive study was carried out in the Chemistry and Microbiology Laboratories of the Basic Sciences Faculty of Neishabour Islamic Azad University, in 2016. Silver nanoparticles were produced in biological method using aqueous extracts of *Glycyrrhiza glabra* and *Mentha piperata*. Nanoparticles were studied by using spectrometry techniques and Scanning Electron Microscopy (SEM). To predict the antibacterial effect of nanoparticles, from each of the extracts at 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, and 200 µg/ml concentrations, 100 µL was used for broth micro dilution test . Comparison of the mean results of two types of nanoparticles was done using One-way ANOVA statistical test.

Results: UV-Vis spectroscopy analysis and the peak at 430 nm indicated the biosynthesis of the nanoparticles in the extract, and the photo of SEM determined the shape of the nanoparticles spherical and the average size was set at about 55 nm. In reviewing the antimicrobial effect of biosynthesis of silver nanoparticles, the nanoparticles had a good antibacterial activity against the bacteria under study. MIC (Minimum Inhibitory Concentration) values for biosynthetic nanoparticles with *Glycyrrhiza glabra* extract against *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* ,and *Lactobacillus rhamnosus* were 1.6, 6.25 ,and 50 µg / ml ($p \leq 0.05$), and MIC for biosynthetic nanoparticles with *Mentha piperata* extract against these bacteria were determined to be 12.5, 12.5 ,and 200 µg / ml, respectively ($p \leq 0.05$)

Conclusion: Due to their antioxidant properties and many secondary compounds, the plants extracts play the role of regeneration and stabilization of nanoparticles. In this study, silver nanoparticles were synthesized well with the aqueous extracts of *Glycyrrhiza glabra* and *Mentha piperata* plants, and the synthesized nanoparticles showed a good antibacterial activity against the bacteria that contributed to the decay of the tooth.

Key words: Biosynthesis, Silver nanoparticles, Minimum inhibitory concentration, Minimum bactericidal concentration

Funding: This study was funded by Neyshabur Azad University.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethical Committee of Neyshabur Azad Universityapproved the study.

How to cite this article: Emrani Sh , Zhiani R, Dafe Jafari M. The Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Plants of *Glycyrrhiza glabra* and *Mentha piperata* and Its Antimicrobial Effect on Some Bacteria That Cause Tooth Decay. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2018; 16(10): 953-68. [Farsi]

1- PhD Student of Analytical Chemistry, Young Researchers and Elites Club, Faculty of Chemistry , Neyshabur Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

2- Associate Prof., Department of Chemistry, Young Researchers and Elites Club ,Faculty of Chemistry, Neyshabur Islamic Azad University ,Neyshabur, Iran

(Corresponding Author)Tel:(051)42233472,09155020845, Fax: (051) 42615472, E-mail: r_zhiani2006@ yahoo.com.

3- MSc, Chemical Engineering, Faculty of Chemistry, Neyshabur Islamic Azad University, Neyshabur, Iran