

Biosynthesis of Titanium Dioxide Nanoparticles from the Mangrove (*Avicennia marina*) and Investigation of its Antibacterial Activity

Mina Shahin Lefteh¹,
Iman Sourinejad²,
Zahra Ghasemi³

¹ MSc in Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

² Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

³ Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

(Received January 22, 2020 ; Accepted May 13, 2020)

Abstract

Background and purpose: Development of biocompatible and nontoxic methods for synthesis of nanoparticles is important in bio-nanotechnology. This study aimed at biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) using leaf of the native mangrove (*Avicennia marina*) and investigating its antibacterial activity.

Materials and methods: Effect of four different solutions composed of dry extract of mangrove leaf and different amounts of chemical titanium isopropoxide in biosynthesis of TiO₂ NPs was evaluated. The biosynthesized TiO₂ NPs were characterized using X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), UV-visible spectrophotometry (UV-Vis), and fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. The antibacterial activity was assessed using well diffusion method.

Results: The solution color containing dry extract of mangrove leaf and titanium isopropoxide began to change 10 min after the reaction was started, showing the reduction of Ti ions by the extract and synthesizing TiO₂ NPs. Combination of 1 g dry extract and 3.75 mL of titanium isopropoxide was considered the optimum concentration for TiO₂ NPs biosynthesis.

Conclusion: XRD analysis approved the formation of crystalline TiO₂ NPs. SEM images identified TiO₂ NPs with mean diameter of 25 nm and spherical shape. FTIR analysis distinguished Ti in NPs structure indicating the formation of TiO₂ NPs. UV-Vis showed the reduction of bandgap energy in biosynthesized TiO₂ NPs. Gram-negative bacteria showed more resistance against the bacterial pathogens. Gram-positive *Micrococuss* Sp. was recognized the most sensitive regarding the largest diameter of inhibitory zone and Gram-negative *Vibrio harveyi* was recognized the most resistant regarding no formation of inhibitory zone.

Keywords: bio-nanotechnology, TiO₂ nanoparticles, mangrove plants, biological activity

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (186): 15-27 (Persian).

* **Corresponding Author: Iman Sourinejad** - Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran (E-mail: sourinejad@hormozgan.ac.ir)

سنتز زیستی نانوذرات تیتانیوم دی اکسید با استفاده از گیاه حرا (*Avicennia marina*) و بررسی فعالیت ضدباکتریایی آن

مینا شاهین لفته¹ایمان سوری نژاد²زهرا قاسمی³

چکیده

سابقه و هدف: توسعه روش های سازگار با محیط زیست و فاقد مواد سمی در تولید نانوذرات، از مهم ترین جنبه های علم زیست نانو فناوری می باشد. در مطالعه حاضر، سنتز زیستی نانوذرات تیتانیوم دی اکسید با استفاده از برگ گیاه بومی حرا *Avicennia marina* و فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات سنتزی بررسی شد.

مواد و روش ها: تاثیر چهار ترکیب مختلف از عصاره خشک برگ و مقادیر متفاوت تیتانیوم ایزوپروپوکساید در سنتز زیستی نانوذرات تیتانیوم دی اکسید ارزیابی گردید. نانوذرات سنتزی با پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، طیف سنجی UV-Vis و تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) مطالعه و فعالیت ضدباکتریایی آن ها به روش انتشار چاهک بررسی گردید.

یافته ها: محلول حاوی عصاره خشک برگ حرا و ماده تیتانیوم ایزوپروپوکساید از 10 دقیقه بعد از شروع واکنش تغییر رنگ داد که بیانگر احیاء یون های تیتانیوم توسط عصاره و تشکیل نانوذرات تیتانیوم دی اکسید می باشد. ترکیب یک گرم عصاره خشک برگ با 3/75 میلی لیتر محلول تیتانیوم ایزوپروپوکساید به عنوان غلظت بهینه برای سنتز زیستی نانوذرات انتخاب گردید.

استنتاج: آنالیز XRD تشکیل نانوذرات تیتانیوم دی اکسید کریستالی را اثبات نمود. نتایج حاصل از تصاویر SEM نانوذراتی را با میانگین 25 نانومتر و شکل کروی نشان داد. آنالیز FTIR بیانگر حضور Ti در ساختار نانوذره و تشکیل نانوذرات TiO_2 بود. طیف سنجی UV-Vis کاهش انرژی باند گپ را در نمونه بهینه سنتزی نشان داد. در بررسی خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات، باکتری های گرم منفی مقاومت بیش تری از خود نشان دادند. باکتری گرم مثبت *Micrococuss Sp.* با داشتن بیش ترین مقدار هاله عدم رشد، حساس ترین و باکتری گرم منفی *Vibrio harveyi* با توجه به عدم تشکیل هاله رشد، مقاوم ترین باکتری شناخته شد.

واژه های کلیدی: زیست نانو فناوری، نانوذرات تیتانیوم، گیاهان مانگرو، فعالیت بیولوژیکی

مقدمه

هدف آن تولید مواد و ذرات در مقیاس نانومتر از طریق روش های زیستی سازگار با محیط زیست است (1).

زیست نانو فناوری، فناوری بالقوه ای است که از تلفیق زیست فناوری و فناوری نانو ظهور کرده است و

E-mail: sourinejad@hormozgan.ac.ir

مؤلف مسئول: ایمان سوری نژاد - بندرعباس: 9 کیلومتر جاده میناب، دانشگاه هرمزگان

1. کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

2. دانشیار، گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

3. استادیار، گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

تاریخ دریافت: 1398/11/2 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/11/28 تاریخ تصویب: 1399/2/24

این دانش که بر پایه نانوذرات استوار است به علت کاربرد وسیع و فراوان در علوم و صنایع، با سرعت بالایی در حال رشد می‌باشد. نانو فناوری به علت تولید نانوذرات در اندازه، شکل و ترکیب شیمیایی متفاوت و کاربردهای بسیار آن‌ها برای بشر، حوزه تحقیقاتی جذابی به حساب می‌آید. نانوذرات موادی با ساختار سه بعدی می‌باشند که اندازه آن‌ها از 1 تا 100 نانومتر متغیر است. ساخت، دستکاری و استفاده از نانوذرات فلزی به علت کاهش ابعاد و در نتیجه داشتن ویژگی‌های حرارتی، نوری و الکتریکی منحصر به فرد اهمیت زیادی دارد. کاربرد نانوذرات در زمینه‌های مختلف علوم از جمله کشاورزی، صنایع و پزشکی زیاد و متنوع است و توجه زیادی را به خود معطوف ساخته است (۲، ۳). روش‌های مختلفی از جمله روش‌های شیمیایی و فیزیکی برای سنتز نانوذرات فلزی در اندازه و شکل‌های مختلف وجود دارد (4، 5). با توجه به این که این روش‌ها گران و زمان‌بر بوده و برای محیط زیست خطرناک هستند نیاز به توسعه روش‌های زیستی سازگار با محیط زیست، مقرون به صرفه و فاقد مواد شیمیایی رو به افزایش است. یکی از این روش‌ها، تولید به روش زیستی یا همان استفاده از زیست نانو فناوری است. گیاهان، جلبک‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، باکتری‌ها و ویروس‌ها در تولید زیستی نانوذرات کاربرد دارند و جایگزین مناسبی برای روش‌های شیمیایی و فیزیکی محسوب می‌شوند. استفاده از گیاهان به علت سازگاری با محیط و عدم بروز آسیب‌های زیست محیطی معمولاً فاقد مشکلات معمول سایر روش‌هاست. همچنین گیاهان به علت فراوانی و عدم نیاز به شرایط و مواد غذایی خاص برای رشد گزینه‌ای مناسب برای تولید نانوذرات به روش زیستی محسوب می‌شوند (۶، ۷).

مطالعات حاکی از آن است که گیاهان به عنوان منابعی غنی از ترکیبات ضد میکروبی، حاوی مقادیر قابل توجهی از انواع ترکیبات فنولی از قبیل اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، تانن‌ها و دی‌ترین‌های فنولی می‌باشند. به همین دلیل، امروزه استفاده از عصاره‌های گیاهی به ویژه

گیاهان دارویی در تولید نانوذرات مورد توجه محققین قرار گرفته است زیرا نقش بسیار مهمی را در اصلاح مواد شیمیایی سمی از طریق احیای یون‌های فلزی ایفا می‌کنند (8). عصاره گیاهان در فرایند سنتز هم به عنوان عوامل احیا کننده و هم به عوامل پوشش دهنده نانوذرات عمل می‌کنند به طوری که احیای یون‌های فلزی از طریق مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، آمینواسیدها، آنزیم‌ها، آلکالوئیدها، کربوهیدرات‌ها و ویتامین‌ها که در عصاره‌های گیاهی وجود دارند به صورت سازگار با محیط زیست انجام می‌گیرد (9).

در سال‌های اخیر مواد آلی حاوی یون‌های فلزاتی مثل مس، نقره و تیتانیوم به عنوان مواد دارای خاصیت ضد میکروبی بسیار مورد توجه بوده‌اند. تیتانیوم یک ماده معدنی ارزان قیمت و بی‌ضرر بوده و به عنوان دومین نانوذره پرتولید بعد از نقره، مصارف تجاری و صنعتی گسترده‌ای از جمله در پاک‌سازی محیط زیست، مواد ضد آفتاب و مواد آرایشی دارد (5). در میان گیاهان، مانگروها مجموعه‌ای از گیاهان شورپسند و مقاوم به نمک دریا بوده و به طور عمده در نواحی جزر و مدی گرمسیری و نیمه گرمسیری به صورت پراکنده در بعضی نقاط دنیا شکل گرفته‌اند. ترپنوئیدها، استروئیدها، تانن‌ها، نفتالین‌ها، فلاونوئیدها، گلوکوزیدها و آلکالوئیدها ترکیبات شیمیایی هستند که از گیاهان مانگرو گزارش شده‌اند و دارای خواص زیستی متنوعی از جمله خواص ضدباکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی، ضد سرطان و ضد دیابت هستند (10، 11).

گیاه حرا *Avicennia marina* از خانواده Avicenniaceae، گونه غالب و در اصل منحصر به فرد جنگل‌های مانگرو ایران است که عمدتاً در حاشیه خلیج فارس پیرامون جزیره قشم، بندر خمیر، بندر دیر و خلیج نابیند در منطقه عسلویه پراکنش دارد. با توجه به کاربرد گسترده نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید در علوم و صنایع مختلف و اهمیت سنتز زیستی نانوذرات و همچنین رویش گیاه حرا در سواحل جنوب کشور به عنوان گونه غالب مانگرو، در این مطالعه سنتز زیستی نانوذرات تیتانیوم

دی اکسید با استفاده از عصاره برگ این گیاه بومی مهم و فعالیت ضدباکتریایی آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه حرا و آماده سازی آن

به منظور سنتز زیستی نانوذرات تیتانیوم دی اکسید، از عصاره برگ گیاه حرا استفاده گردید. بدین منظور برگ گونه حرا از سواحل خور آذینی در بندر سیریک استان هرمزگان جمع‌آوری شد (تصویر شماره 1). نمونه‌های برگ جمع‌آوری شده، ابتدا با آب دریا و سپس با آب مقطر شسته شده و در دمای اتاق و در سایه به مدت دو هفته خشک گردیدند. سپس برگ‌های خشک شده با استفاده از دستگاه آسیاب پودر شدند.



تصویر شماره 1: برگ گیاه حرا (*Avicennia marina*)

روش عصاره گیری از برگ حرا

مقدار 100 گرم پودر تهیه شده از برگ حرا با 700 میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط و به مدت 10 دقیقه در دمای 50 درجه سانتیگراد روی هیتر قرار داده شد تا به جوش بیاید و بعد از سرد شدن، از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد. سپس عصاره آبی تهیه شده در آون با دمای 60 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شود (عصاره خشک). پودر حاصل برای آزمایشات بعدی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری گردید.

سنتز زیستی نانوذرات تیتانیوم دی اکسید

برای سنتز نانوذرات تیتانیوم دی اکسید، یک گرم پودر

عصاره در 50 میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط گردید و روی هیتر با دمای 80 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مقدار متناسب منبع تیتانیوم طبق جدول شماره 1 به صورت قطره قطره اضافه شد و 30 دقیقه نگهداری گردید. در ادامه محلول در دمای 50 درجه سانتی‌گراد به مدت 150 دقیقه نگه داشته شد. محلول تغییر رنگ داده شده با دور 6000 به مدت 30 دقیقه سانتریفیوژ شد. نانوذرات سنتز شده، جدا گردیده و در آون با دمای 70 درجه سانتی‌گراد خشک شدند. نمونه‌های خشک شده درون کوره با دمای 400 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 ساعت قرار داده شد (12). سنتز نمونه‌ها در چهار ترکیب مختلف (S1 تا S4) از عصاره خشک برگ گیاه و مقادیر متفاوت تیتانیوم ایزوپروپوکساید به عنوان منبع تیتانیوم (5) صورت گرفت (جدول شماره 1).

جدول شماره 1: سنتز نمونه‌ها در چهار ترکیب مختلف عصاره خشک برگ گیاه حرا و مقادیر مختلف منبع تیتانیوم

S4	S3	S2	S1	نمونه
1	1	1	1	مقدار عصاره خشک (گرم)
30	15	3/75	7/5	مقدار منبع تیتانیوم (میلی لیتر)

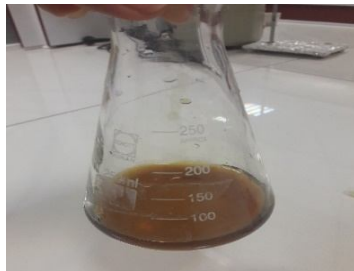
تعیین ویژگی‌های نانوذرات تیتانیوم دی اکسید سنتز شده کریستالی بودن نانوذرات تیتانیوم دی اکسید سنتز شده با دستگاه XRD (X-ray Diffraction)؛ مدل Pert pro شرکت Panalytical) مورد بررسی قرار گرفت. شکل و اندازه نانو ذرات با استفاده از دستگاه SEM (scanning electron microscopy)؛ مدل TESCAN MIRA3, USA) مجهز به EDS (energy-dispersive X-ray spectroscopy) مطالعه شد. همچنین شناسایی نوع پیوندها و ترکیب شیمیایی موجود در نانوذرات تیتانیوم دی اکسید سنتز شده با دستگاه FTIR (fourier transform infrared)؛ مدل Spectrum Two از شرکت PerkinElmer انجام شد. از طیف سنجی UV-Vis DRS (UV-Visible Diffuse Reflectance Spectrometer؛ مدل Shimadzu, UV-2250, Japan) برای تعیین لبه جذب و محاسبه انرژی

انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی گراد به وسیله خط کش معمولی اندازه گیری گردید و نتایج به صورت میانگین سه بار تکرار محاسبه شدند. هاله های عدم رشد نسبت به نانوذرات تیتانیوم دی اکسید مقاومت کم تری نشان داده و آن نانوذرات، درصدی از باکتری را از بین برده است. باکتری هایی که هاله تشکیل ندادند نسبت به نانوذرات مقاوم بودند.

یافته ها

سنتر نانوذرات تیتانیوم دی اکسید

در تحقیق حاضر، سنتر نانوذرات تیتانیوم دی اکسید با استفاده از برگ گونه حرا به عنوان گیاه مانگروی غالب ایران مورد بررسی قرار گرفت. محلول حاوی عصاره خشک برگ گونه حرا و محلول تیتانیوم ایزوپروپوکساید در لحظه شروع واکنش به رنگ قهوه ای تیره بود (تصویر شماره 2-الف) و بعد از 150 دقیقه نگهداری، محلول به رنگ قهوه ای روشن تغییر رنگ داد و رنگ ثابت شد (تصویر شماره 2-ب).



الف



ب

تصویر شماره 2: سنتر نانوذرات تیتانیوم دی اکسید با استفاده از عصاره برگ گیاه حرا: (الف) رنگ محلول حاوی عصاره و تیتانیوم ایزوپروپوکساید در لحظه شروع واکنش، (ب) بعد از 150 دقیقه نگهداری

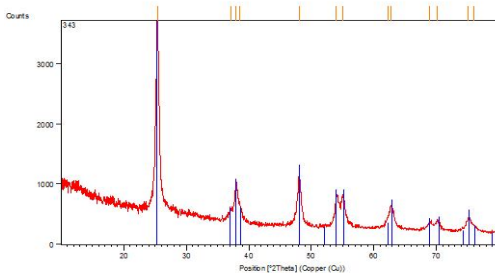
باند گپ نانوذرات تیتانیوم دی اکسید سنتز شده در دامنه طول موج جذب نوری 200 تا 800 نانومتر استفاده گردید. برای بررسی توزیع اندازه ذرات نیز از تکنیک DLS (dynamic light scattering) استفاده شد.

بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات تیتانیوم دی اکسید سنتز شده

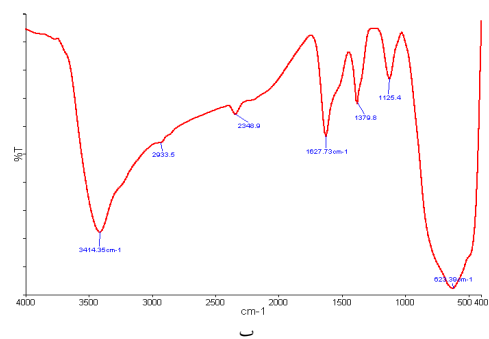
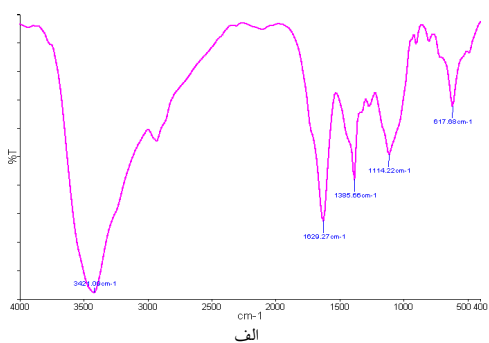
فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم سنتز شده با استفاده از روش انتشار در چاهک در برابر باکتری های گرم منفی (*Vibrio harveyi*; *Escherichia coli*) و باکتری های گرم مثبت (*Staphylococcus aureus*; *Micrococcus Sp.*) بررسی گردید (2،12). به منظور تهیه محیط کشت، پودر مولر هینتون آگار¹ برای محیط کشت جامد و پودر مولر هینتون براث² برای محیط کشت مایع بر اساس دستور العمل تولیدکننده در آب مقطر حل شد و روی هیتز قرار داده شد تا ماده شفاف حاصل گردید و اتوکلاو شد. سپس محیط مولر هینتون آگار در پلیت های استریل و محیط مولر هینتون براث در لوله های آزمایش به حجم 5 میلی لیتر توزیع گردید. تمام سویه های باکتری به روش خطی کشت داده شدند و سپس به مدت 24 ساعت در انکوباتور در دمای 37 درجه سانتی گراد قرار گرفتند. با آغشته کردن یک سوپ استریل به سوسپانسیون باکتری ها، سوآپ آلوده به باکتری ها به طور یکنواخت و در سه جهت روی محیط کشت مولر هینتون آگار (کشت چمنی سوسپانسیون های باکتریایی) حرکت داده شد تا باکتری روی پلیت ها کشت شود. در هر پلیت سه چاهک در فواصل منظم ایجاد شده و 10 میلی گرم پودر نانوذرات تیتانیوم دی اکسید ساخته شده از برگ گیاه حرا استریل شده (اتوکلاو) به طور جداگانه در یک میلی لیتر آب دیونیزه حل شد و پس از انجام سونیکت³ و نیز ورتکس⁴، با استفاده از سمپلر، حدود 20 میکرولیتر به هر چاهک تزریق شد. قطر هاله های عدم رشد بعد از 24 ساعت

1. Muller-Hinton agar
2. Muller- Hinton broth
3. Sonicate
4. Vortex

ارتعاش خمشی OH نسبت داده می‌شود. شانه‌هایی که در 500 و 650 cm^{-1} دیده می‌شود و به‌طور کلی پیک‌های پایین‌تر از 810 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی باندهایی مانند O-Ti و Ti-Ti می‌باشد (14). حضور باندهای مذکور در طیف FTIR بیانگر حضور Ti در ساختار نانوذره و تشکیل نانوذرات TiO_2 می‌باشد. مقایسه طیف FTIR نمونه نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید نمونه S2 با طیف عصاره برگ حرا (تصویر شماره 4-الف) بیانگر جابه‌جایی پیک‌ها به‌خصوص در محدوده زیر 1500 cm^{-1} است.



تصویر شماره 3: الگوی XRD نانوذرات تیتانیوم دی اکسید سنتز شده با استفاده از یک گرم عصاره خشک و 3/75 میلی لیتر محلول تیتانیوم



تصویر شماره 4: طیف سنجی FTIR (الف) عصاره برگ حرا و (ب) نانوذرات تیتانیوم دی اکسید نمونه S2 سنتز شده با استفاده از عصاره برگ حرا

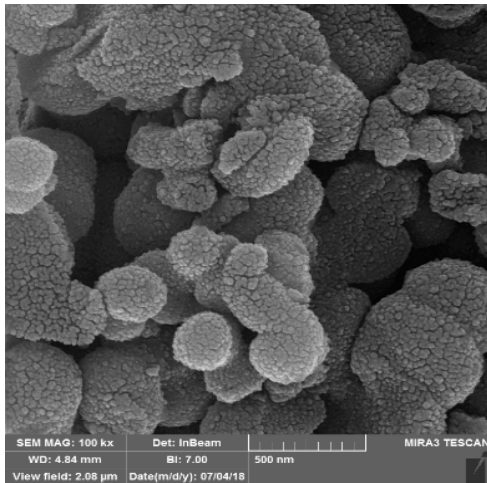
در واقع ترکیب عصاره برگ گونه حرا و محلول تیتانیوم ایزوپروپوکساید بعد از 10 دقیقه از شروع واکنش تغییر رنگ داده و در طی دوره نگهداری، رنگ محلول به سمت روشن شدن پیش رفت، به طوری که رنگ محلول از قهوه‌ای تیره به قهوه‌ای روشن در مدت 150 دقیقه تغییر پیدا کرد. لازم به ذکر است که با گذشت زمان، به دلیل احیاء یون‌های تیتانیوم میزان تغییر رنگ افزایش پیدا کرد و در محلول حاوی تیتانیوم ایزوپروپوکساید بدون عصاره گیاهی هیچ تغییر رنگی مشاهده نشد.

نتایج آنالیز XRD و تطابق آن با نمودارهای استاندارد تیتانیوم دی‌اکسید نیز تشکیل نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید کریستالی توسط گیاه حرا را اثبات نمود. نمونه S1، S2، S3 و S4 دارای فاز آناتاز با زاویه پراش 25/367، 75/277 و 62/867، 55/204، 54/051، 48/158، 38/667 درجه بودند. پیک مشخصه فاز آناتاز $2\theta = 25/3$ است (5).

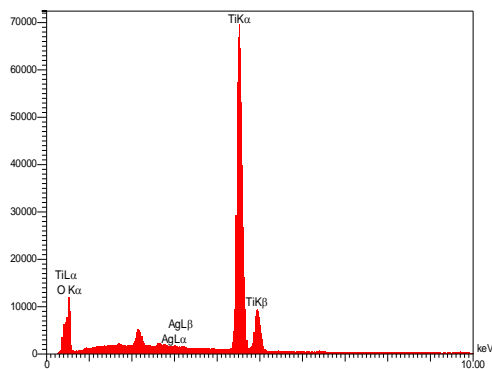
بر اساس آنالیزهای XRD مشخص شد که بهترین و مناسب‌ترین آنالیز، مربوط به نمونه S2 می‌باشد (تصویر شماره 3) و پیک‌های مشخصه فاز آناتاز با کاهش نسبت عصاره به منبع تیتانیوم به‌طور مشخص و واضح‌تر مشاهده شدند. تمامی پیک‌های مشخصه فاز آناتاز در تصویر شماره 3 مربوط به نمونه S2 به‌طور کامل مشخص بوده و این موضوع در محدوده $2\theta = 36-40$ و $2\theta = 53-57$ به‌طور واضح قابل مشاهده است. بنابراین، نمونه S2 سنتز شده با کم‌ترین نسبت عصاره به منبع تیتانیوم و با استفاده از یک گرم عصاره خشک و 3/75 میلی لیتر محلول تیتانیوم به عنوان بهترین و مناسب‌ترین نمونه برای آنالیزهای بعدی انتخاب شد.

نتایج طیف سنجی FTIR تیتانیوم دی‌اکسید نمونه S2 سنتز شده در تصویر شماره 4-ب نشان داده شده است. دستگاه طیف‌سنجی مورد استفاده، ارتعاشات در محدوده طول موج $4000-450\text{ cm}^{-1}$ را اندازه‌گیری کرده است. پیک بزرگی که در ناحیه 3400 تا 3600 cm^{-1} مشاهده می‌شود، مربوط به ارتعاش کششی گروه هیدروکسیل (OH-) متصل به Ti است (13). پیک 1627 cm^{-1} به

دارد (13،14). با توجه به نتایج آنالیز EDS (شکل شماره 6ب)، درصد محتوای O و Ti نمونه نانوذرات TiO_2 سنتزی به ترتیب 64/26 و 34/09 بود.



الف

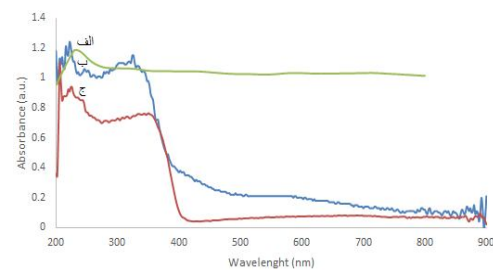


ب

تصویر شماره 6: (الف) تصویر SEM و (ب) EDS نانوذرات تیتانیوم دی اکسید نمونه S2 سنتز شده با استفاده از عصاره برگ حرا

بررسی نتایج آنالیز DLS و پروفایل توزیع اندازه ذرات که در تصویر شماره 7 نشان داده شده است، نشان دهنده دامنه اندازه ذرات 100-1000 نانومتر و میانگین اندازه ذرات 265 نانومتر می باشد. نتایج آنالیز DLS تایید کننده نتایج حاصل از تصویر SEM است که نشان دهنده ذرات کروی شکل در ابعاد حدود 250 نانومتر حاصل از تجمع نانوذرات TiO_2 با اندازه های نسبتاً یکسان و در حدود 25 نانومتر بود.

طیف جذب UV-Vis DRS عصاره برگ گیاه حرا، تیتانیوم دی اکسید نمونه S2 و تیتانیوم دی اکسید سنتز شده به روش شیمیایی و بدون استفاده از عصاره گیاهی در تصویر شماره 5 در دامنه طول موج جذب نوری 200 تا 900 نانومتر نشان داده شده است. لبه جذب نانوذرات تیتانیوم دی اکسید نمونه S2 در طول موج 520 نانومتر مشاهده گردید و انرژی باند گپ، $2/38 \text{ eV}$ به دست آمد (15). لبه جذب نمونه تیتانیوم دی اکسید سنتز شده به روش شیمیایی در مطالعات قبلی در طول موج 400 نانومتر مشاهده شده و انرژی باند گپ TiO_2 در نمونه سنتز شده به روش شیمیایی، $3/1 \text{ eV}$ به دست آمده بود (5). مقایسه لبه جذب نمونه S2 با لبه جذب در نمونه تیتانیوم دی اکسید سنتز شده با استفاده از عصاره بیانگر کاهش محسوس انرژی باند گپ نمونه S2 و افزایش شدت جذب آن در ناحیه مرئی در طول موج بالاتر از 400 نانومتر می باشد.



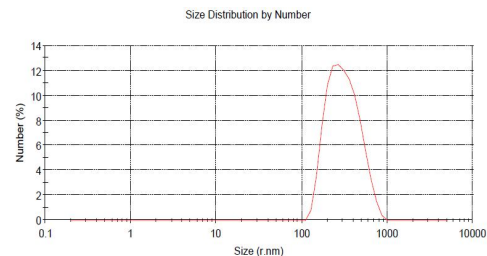
تصویر شماره 5: طیف UV-Vis DRS (الف) عصاره برگ حرا، (ب) نانوذرات تیتانیوم دی اکسید سنتز شده با استفاده از عصاره برگ حرا و (ج) نانوذرات تیتانیوم دی اکسید سنتز شده به روش شیمیایی

نتایج میکروسکوپی الکترونی روبشی نشان دهنده شکل کروی نانوذرات تیتانیوم دی اکسید سنتز شده بود. همانطور که در تصویر شماره 6-الف مشخص شده است، نانوذرات سنتزی دارای ذرات کروی شکل با ابعاد حدود 250 نانومتر می باشند که از تجمع نانوذرات TiO_2 با اندازه های نسبتاً یکسان و در حدود 25 نانومتر به وجود آمده اند. لازم به ذکر است که اندازه نانوذرات تیتانیوم دی اکسید به دمای واکنش، غلظت عصاره، غلظت محلول تیتانیوم و مدت زمان واکنش بستگی

گیاه حرا بعد از واکنش با یون‌های تیتانیوم یکک نشانه واضح از تبدیل شدن یون‌های فلزی به تیتانیوم دی اکسید و تشکیل نانوذرات تیتانیوم دی اکسید می‌باشد (16,15) این تغییر رنگ ناشی از ارتعاشات پلاسمون سطحی در نانوذرات است (17). در واقع، عصاره آبی گیاه حرا با احیای یون‌های تیتانیوم، رنگ محلول تیتانیوم را تغییر می‌دهد (18).

در تحقیقی مشابه که بر روی عصاره برگ محض قرار گرفتن در معرض محلول تیتانیوم شروع به سنتز نانوذرات تیتانیوم دی اکسید نمود و پس از دو ساعت به قهوه‌ای تغییر رنگ داد (16). در تحقیقی دیگر، عصاره آبی گیاه *Euphorbia heterarena* بعد از اضافه شدن محلول تیتانیوم دی اکسید پس از سه دقیقه به رنگ خاکستری روشن در آمد و بعد از 24 ساعت بعد از شروع واکنش تغییر رنگی مشاهده نشد و رنگ محلول ثابت ماند که این موضوع بیانگر تحریک رزونانس پلاسمونی سطحی و تشکیل نانوذرات تیتانیوم دی اکسید می‌باشد (19). در بیوسنتز نانوذرات تیتانیوم دی اکسید توسط لاکتوباسیلوس پلانتراروم‌های بومی ایران نیز تغییر رنگ محلول واکنش از قهوه‌ای روشن به قهوه‌ای تیره بیان گر احیاء تیتانیوم دی اکسید و سنتز نانوذرات تیتانیوم دی اکسید بود (20).

یکی از ابزارهای مهم و بسیار پر کاربرد برای مشخصه‌یابی ساختار نانوذرات، پراش پرتو ایکس می‌باشد. این الگوی پراش برای مشخص کردن فازهای کریستالی نانوذرات و اندازه‌گیری خصوصیات ساختاری آن‌ها استفاده می‌شود. تکنیک XRD روشی غیر مخرب و یکی از بهترین شیوه‌ها برای بررسی ویژگی‌های ساختاری نانوذرات می‌باشد. در مطالعه پیش‌رو با توجه به پیک‌های شاخص به دست آمده از XRD در 2θ استاندارد برای نمونه‌های سنتزی، کریستالی بودن نانوذرات تیتانیوم دی اکسید تایید گردید (19,21). نتایج حاصل از مطالعه پراش پرتو ایکس توسط در مورد سنتز نانوذرات تیتانیوم دی اکسید توسط عصاره گیاه *Jatropha curcas* با نتایج پیش‌رو همخوانی دارد و حضور کریستال‌های تیتانیوم



تصویر شماره 7: پروفایل توزیع اندازه ذرات نانوذرات تیتانیوم دی اکسید نمونه S2 سنتز شده با استفاده از عصاره برگ حرا

نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات تیتانیوم دی اکسید سنتز شده در جدول شماره 2 ارائه شده است. نتایج گویای آن است که از بین سویه‌های انتخابی، باکتری‌های گرم منفی مقاومت بیش تری از خود نشان دادند. باکتری گرم مثبت *Micrococcus Sp.* با داشتن بیش ترین مقدار هاله عدم رشد حساس ترین و باکتری گرم منفی *V. harveyi* بدون داشتن هاله عدم رشد به عنوان مقاوم ترین باکتری شناخته شد.

جدول شماره 2: نتایج خصوصیات ضدباکتریایی نانوذرات تیتانیوم دی اکسید و عصاره برگ گیاه حرا به روش انتشار چاهک

میکروارگانیزم	منطقه مهار رشد نانوذرات تیتانیوم دی اکسید ستر شده (mm) انحراف معیار ± میانگین	منطقه مهار رشد عصاره (mm) انحراف معیار ± میانگین
<i>Micrococcus Sp.</i>	13/66 ± 1/55	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	12 ± 2/66	13/86 ± 1/57
<i>Escherichia coli</i>	12 ± 0/66	13/95 ± 1/36
<i>Vibrio harveyi</i>	0/00	0/00

بحث

در مطالعه حاضر تاثیر چهار ترکیب مختلف از عصاره خشک برگ گیاه بومی حرا و مقادیر متفاوت تیتانیوم ایزوپروپوکساید به عنوان منبع تیتانیوم در سنتز زیستی نانوذرات تیتانیوم دی اکسید ارزیابی گردید. محلول حاوی عصاره برگ گیاه و تیتانیوم ایزوپروپوکساید در ابتدای واکنش به رنگ قهوه‌ای تیره بود ولی 10 دقیقه بعد از شروع واکنش، شروع به تغییر رنگ داد و بعد از 150 دقیقه به رنگ ثابت قهوه‌ای روشن در آمد. آشکار شدن رنگ قهوه‌ای روشن در عصاره آبی برگ

مربوط به ارتعاشات کششی باندهای Ti-O و Ti-Ti- تائید کننده نتایج XRD در سنتز زیستی تیتانیوم دی اکسید با استفاده از عصاره برگ گیاه حرا است. در یک مطالعه پیشین بر روی عصاره برگ گیاه *Euphorbia heteradena* پیک‌های ایجاد شده در نمودار طیف FTIR با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. این پیک‌ها معرف ترکیبات حلقه‌های آروماتیک، گروه هیدروکسیل، گروه آلکن و باند H مربوط به کشش OH می‌باشند که نشان دهنده تشکیل نانوذرات فلزی آزاد هستند. در تحقیق دیگری نیز که بر روی عصاره آبی *Eclipta prostrata* انجام شد، پیک‌های ایجاد شده در نمودار طیف FTIR با مطالعه حاضر مطابقت دارد. این پیک‌ها معرف کشش هیدروکسیل، آلکان‌ها، آمین‌های اولیه و آمین‌های آلیفاتیک می‌باشند که نشان دهنده تشکیل نانوذرات تیتانیوم دی اکسید هستند (23).

در مطالعه دیگری، Goutama و همکاران پیک جذبی مربوط به باند Ti-O و Ti-Ti-O را در محدوده $500-700 \text{ cm}^{-1}$ مشاهده کردند. همچنین پیک جذبی در 652 cm^{-1} را نشان‌دهنده فاز آاناتاز نانوذرات تیتانیوم دی اکسید سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه *Jatropha curcas L.* گزارش دادند که نتایج آن‌ها با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (26).

در مواد نیمه رسانا، تراز ظرفیت پر ولی تراز رسانش خالی است و باند گپ که دو تراز را از یکدیگر جدا می‌کند نسبت به مواد عایق کوچکتر است. حال اگر انرژی باند گپ تامین شود و الکترونی از تراز ظرفیت به باند هدایت برانگیخته شود، باند هدایت خالی نخواهد بود. برخورد فوتون‌هایی با انرژی بیش تر از انرژی باند گپ فوتو کاتالیست‌های نیمه رسانا می‌تواند موجب تهییج الکترون‌های تراز ظرفیت به تراز رسانش شود. جذب فوتون‌هایی با انرژی کم تر از انرژی باند گپ یا با طول موج بلندتر موجب اتلاف انرژی به صورت گرما می‌گردد. تابش نور با سطح انرژی مناسب به سطح فوتو کاتالیست منجر به تشکیل حفره مثبت ($h\nu^+$) در تراز ظرفیت و

دی اکسید با پیک‌هایی با زاویه پراش $25/01$ ، $37/03$ ، $48/05$ ، $53/87$ ، 55 ، $62/39$ و $71/16$ درجه در راستای صفحات 101 ، 111 ، 200 ، 105 ، 211 ، 204 و 220 تائید گردید (22).

در مطالعه دیگری که بر روی عصاره آبی گیاه *Eclipta prostrata* انجام شد، آنالیز حاصل از پراش پرتو ایکس وجود کریستال‌های تیتانیوم دی اکسید را با پیک‌هایی با زاویه پراش $27/811$ ، $35/55$ ، $45/10$ ، $55/75$ ، $64/80$ و $70/05$ درجه به ترتیب در راستای صفحات 110 ، 101 ، 210 ، 211 ، 310 و 301 نشان داد (23).

مطالعه Abu-Dalo و همکاران نیز نشان داد که پیک‌هایی با زاویه پراش $25/20$ ، $37/80$ ، $48/04$ ، $53/89$ و $62/68$ درجه نشان‌دهنده راستای صفحات کریستالی 101 ، 004 ، 200 ، 105 ، 211 و 204 در تیتانیوم دی اکسید تولید شده با استفاده از عصاره پوست انار است. آن‌ها همچنین بیان کردند که پیک‌ها با زاویه پراش $25/27$ و $48/01$ درجه تائید کننده تشکیل فاز آاناتاز نانوذرات تیتانیوم دی اکسید می‌باشد (24).

به منظور شناسایی مولکول‌های زیستی که مسئول احیای نانوذرات تیتانیوم دی اکسید سنتز شده با استفاده از عصاره گیاهی هستند، می‌توان از تبدیل فوریه مادون قرمز استفاده کرد. نتایج حاصل از آنالیز طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز عصاره برگ گیاه حرا *Avicennia marina* در نمونه S2 نشان داد که این نمونه دارای پیک‌های $33/2323 \text{ cm}^{-1}$ ، $36/2161 \text{ cm}^{-1}$ ، $52/2048 \text{ cm}^{-1}$ و $72/1108 \text{ cm}^{-1}$ بود. پیک $33/2323 \text{ cm}^{-1}$ فرکانس جذب مربوط به ارتعاشات کششی باندهایی مانند Ti-O و Ti-Ti می‌باشد، پیک $36/2161 \text{ cm}^{-1}$ فرکانس جذب گروه تیول، تیوسیانات ($-\text{SCN}$)، پیک $52/2048 \text{ cm}^{-1}$ فرکانس جذب گروه تیول، ایزوسیانات ($-\text{NCS}$)، پیک $72/1108 \text{ cm}^{-1}$ فرکانس جذب ترکیبات فلوروآلیفاتیک مربوط به کشش C-F و پیک $03/819 \text{ cm}^{-1}$ فرکانس جذب حلقه‌های آروماتیک را نشان می‌دهد (25). در مطالعه حاضر، حضور پیک‌های

یک الکترون (e^-) در تراز رسانش می‌گردد. حفره مثبت به وجود آمده به عنوان یک اکسنده قوی و الکترون انتقال یافته به لایه رسانش به عنوان یک عامل کاهنده قوی در فرایندهای فتوکاتالیستی عمل می‌کند (27، 28).

آنالیز طیف سنج فرابنفش مرئی جامد (UV-Vis DRS) ابزاری برای بررسی و تعیین طول موجی است که موجب تهییج الکترون‌های تراز ظرفیت به تراز رسانش در ساختار مواد نیمه رسانا شود و با استفاده از این تکنیک می‌توان انرژی باند گپ مواد نیمه رسانا (تیتانیوم دی اکسید در این مطالعه) را محاسبه نمود. لبه جذب تغییر ناگهانی میزان جذب شوندگی پرتو تابیده شده در محیطی معین است که در طول موج خاصی روی می‌دهد. لبه جذب نقطه‌ای است که از محل تلاقی خط مماس بر بخش افت جذب در طیف UV-Vis DRS و خط مماس بر بخش پایه طیف (موازی با محور X) به دست می‌آید (28، 29). در مطالعه حاضر محل تلاقی دو خط ذکر شده در طول موج 520 نانومتر به دست آمد.

در مطالعه حاضر، لبه جذب نمونه تیتانیوم دی اکسید سنتز شده با استفاده از عصاره (S2) نسبت به لبه جذب نمونه تیتانیوم دی اکسید سنتز شده به روش شیمیایی جابه جایی قرمز را نشان داد و انرژی باند گپ نمونه S2 نسبت به تیتانیوم دی اکسید سنتز شده به روش شیمیایی کاهش یافت. همچنین شدت جذب آن در ناحیه مرئی در طول موج بالاتر از 400 نانومتر افزایش یافت.

از تکنیک‌های میکروسکوپی همانند میکروسکوپ الکترونی روبشی و میکروسکوپ الکترونی عبوری برای مطالعه ریخت سنجی نانوذرات مانند تعیین اندازه و شکل استفاده می‌شود. مواد در مقیاس نانومتر، به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی اهمیت زیادی دارند و دارای کاربردهای فراوان در زمینه‌های مختلف می‌باشند. این خصوصیت منحصر به فرد نانوذرات به مقدار زیادی وابسته به اندازه و شکل آن‌ها می‌باشد. در مطالعه پیش رو، نانوذرات تیتانیوم دی اکسید سنتز شده از گیاه حرا بر اساس نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی به شکل کروی

بودند و تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان‌دهنده توده‌های کروی شکلی با ابعاد حدود 250 نانومتر حاصل از تجمع نانوذرات تیتانیوم دی اکسید در ابعاد 25 نانومتر بود. نتایج آنالیز EDS و پروفایل توزیع اندازه ذرات نیز تأیید کننده نتایج تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی بود. در مطالعه مشابه در گیاه *Psidium guajava* میانگین اندازه نانوذرات تیتانیوم دی اکسید تولید شده 32/58 نانومتر توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی به دست آمد. در مطالعه دیگری بر روی نانوذرات تیتانیوم دی اکسید به روش زیستی با استفاده از لاکتوباسیلوس پلانتراروم‌های بومی ایران، اندازه نانوذرات سنتز شده بین 2 میکرومتر تا 50 نانومتر گزارش شد و شکل نانوذرات کروی بود (20). در مطالعه‌ای، Goutama و همکاران نیز سنتز توده‌های کروی شکلی از نانوذرات تیتانیوم دی اکسید در ابعاد 10-20 نانومتر با استفاده از عصاره گیاه *Jatropha curcas L.* را گزارش دادند (26).

نانوذرات تیتانیوم دی اکسید دارای کاربردهای فراوانی در زمینه‌های مختلف می‌باشند که یکی از مهم‌ترین این کاربردها داشتن اثر کشندگی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا است. توان فعل و انفعالات نانوذرات به دلیل نسبت بالای سطح به حجم آن‌ها بیش تر می‌شود که این امر خود موجب افزایش فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات تیتانیوم دی اکسید می‌گردد (12، 21).

در مطالعه حاضر، فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات تیتانیوم دی اکسید سنتز شده در برابر باکتری‌های گرم مثبت و باکتری‌های گرم منفی به خوبی نشان داده شد. نتایج گویای آن بود که از بین سویه‌های انتخابی، باکتری‌های گرم منفی مقاومت بیش تری از خود نشان دادند. این موضوع به دلیل وجود غشاء‌های خارجی احاطه کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی منطقی به نظر می‌رسد که این باکتری‌ها در برابر اثرات ضد باکتریایی نانوذرات تیتانیوم دی اکسید حساسیت کمتری از خود نشان دهند. در تحقیقی دیگر گزارش شد که اثر ضد باکتری نانوذرات تیتانیوم دی اکسید سنتز

باکتری‌های گرم منفی *pseudomonas aeruginosa* و *E. coli* است (24).

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر بیانگر سنتز زیستی موفقیت آمیز و بهینه نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید توسط ترکیب یک گرم عصاره خشک برگ حرا با مقدار 3/75 میلی‌لیتر محلول تیتانیوم ایزوپروپوکساید به‌عنوان غلظت بهینه بود. آنالیز XRD تشکیل نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید کریستالی، تصاویر SEM میانگین اندازه 25 نانومتر و شکل کروی نانو ذرات، آنالیز FTIR حضور Ti در ساختار نانوذره و تشکیل نانوذرات TiO_2 و طیف سنجی UV-Vis کاهش انرژی باند گپ را در نمونه بهینه سنتزی نشان داد. هم‌چنین نانو ذرات تیتانیوم دی‌اکسید سنتز شده دارای خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مورد آزمایش بودند که این خاصیت ضد باکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت قوی‌تر بود.

شده توسط عصاره گیاه *Trigonella foenum-graecum* بر علیه باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی برجسته تر است به طوری که مقدار هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus faecalis* بیش‌تر از باکتری گرم منفی *Escherichia coli* به‌دست آمد (21). هم‌چنین در بررسی خواص ضد باکتریایی نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر علیه باکتری گرم مثبت *S. aureus* و باکتری گرم منفی *E. coli* نشان داده شد که باکتری گرم مثبت با داشتن بیش‌ترین مقدار هاله عدم رشد حساس‌ترین و باکتری‌های گرم منفی با داشتن کم‌ترین مقدار هاله عدم رشد، مقاوم‌ترین باکتری‌ها بودند (30).

در مطالعه‌ای دیگر، Abu-Dalo و همکاران گزارش دادند که نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید سنتز شده با استفاده از عصاره پوست انار نیز دارای خصوصیت ضدباکتریایی بر ضد باکتری گرم مثبت *S. aureus* و

References

- Abdi V, Sourinejad I, Yousefzadi M, Ghasemi Z. Biosynthesis of silver nanoparticles from the mangrove *Rhizophora mucronata*: its characterization and antibacterial potential. *Iran J Sci Technol Trans Sci* 2019; 43: 2163-2171.
- Sarkheil M, Sourinejad I, Mirbakhsh M, Kordestani D, Johari SA. Antibacterial activity of immobilized silver nanoparticles on TEPA-Den-SiO₂ against shrimp pathogen, *Vibrio* sp. *Persian J Aquac Res* 2017; 48(5): 2120-2132.
- Dabirvaziri B, Givianrad MH, Sourinejad I, Mashinchian Moradi A, Ghavam Mostafavi P. A simple and effective synthesis of magnetic $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@SiO_2@TiO_2\text{-Ag}$ microspheres as a recyclable photocatalyst: dye degradation and antibacterial potential. *J Environ Health Sci Engineer* 2019; 17(2): 949-960.
- Abdi V, Sourinejad I, Yousefzadi M, Ghasemi Z. Mangrove mediated synthesis of silver nanoparticles using native *Avicennia marina* plant extract from southern Iran. *Chem Eng Commun* 2018; 205(8): 1069-1076.
- Ghasemi Z, Younesi H, Zinatizadeh AA. Preparation, characterization and photocatalytic application of $TiO_2/Fe\text{-ZSM-5}$ nanocomposite for the treatment of petroleum refinery wastewater: optimization of process parameters by response surface methodology. *Chemosphere* 2016; 159: 552-564.
- Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *J Adv Res* 2016; 7(1): 17-28.
- Makarov VV, Love AJ, Sinitsyna OV, Makarova SS, Yaminsky IV, Taliansky ME,

- et al. "Green" nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae* 2014; 6(1): 35-44.
8. Ibrahim HMM. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *J Radiat Res Appl Sci* 2015; 8(3): 265-275.
 9. Vanaja M, Annadurai G. *Coleus aromaticus* leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. *Appl Nanosci* 2013; 3: 217-223.
 10. Bakshi M, Ghosh S, Chaudhuri P. Green synthesis, characterization and antimicrobial potential of silver nanoparticles using three mangrove plants from Indian Sundarban. *BioNanoScience* 2015; 5: 162-170.
 11. Balakrishnan S, Srinivasan M, Mohanraj J. Biosynthesis of silver nanoparticles from mangrove plant (*Avicennia marina*) extract and their potential mosquito larvicidal property. *J Parasit Dis* 2016; 40(3): 991-996.
 12. Santhoshkumar T, Rahuman AA, Jayaseelan C, Rajakumar G, Marimuthu S, Vishnu Kirthi A, et al. Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Psidium guajava* extract and its antibacterial and antioxidant properties. *Asian Pac J Trop Med* 2014; 7(12): 968-976.
 13. Maira AJ, Coronado JM, Augugliaro V, Yeung KL, Conesa JC, Soria J. Fourier transform infrared study of the performance of nanostructured TiO₂ particles for the photocatalytic oxidation of gaseous toluene. *J. Catal* 2001; 202(2): 413-420.
 14. Demirci S, Dikici T, Yurddaskal M, Gultekin S, Toparli M, Celik E. Synthesis and characterization of Ag doped TiO₂ heterojunction films and their photocatalytic performances. *Appl Surf Sci* 2016; 390: 591-601.
 15. Dobrucka R. Synthesis of titanium dioxide nanoparticles using Echinacea. *Iran J Pharm Res* 2017; 16(2): 753-759.
 16. Zahir AA, Chauhan IS, Bagavan A, Kamaraj C, Elango G, Shankar J, et al. Green synthesis of silver and titanium dioxide nanoparticles using *Uphorbia prostrata* extract shows shift from apoptosis to G₀/G₁ arrest followed by necrotic cell death in *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(8): 4782-4799.
 17. Singhal G, Bhavesh R, Kasariya K, Sharma AR, Singh RP. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum sanctum* (Tulsi) leaf extract and screening its antimicrobial activity. *J Nanopart Res* 2011; 13(7): 2981-2988.
 18. Krishnaraj C, Jagan EG, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan PT, Mohan N. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010; 76(1):50-56.
 19. Nasrollahzadeh M, Sajadim M. Synthesis and characterization of titanium dioxide nanoparticles using *Euphorbia heteradena* joub root extract and evaluation of their stability. *Ceram Int* 2015; 41: 14435-14439.
 20. Ladan SAB, Mohammadi azhar A, Tajabadi Ebrahimi M, Heydari Nasrabadi M. Titanium nanoparticles biosynthesis by *Lactobacillus* isolated from Iran's traditional dairy products. *NCMBJ* 2012; 2(6): 83-90.
 21. Subhapriya S, Gomathipriya P. Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles by *Trigonella foenum-graecum* extract and its antimicrobial properties. *Microb Pathog* 2018; 116: 215-220.
 22. Hudlikar M, Joglekar S, Dhaygude M, Kodam K. Green synthesis of TiO₂ nanoparticles by

- using aqueous extract of *Jatropha curcas* L. latex. *Mater Lett* 2012; 75: 196-199.
23. Rajakumar G, Abdul Rahuman A, Priyamvada B, Gopieshkanna V, Kishorekumar D, Sujin P. *Epilicta prastrata* leaf aqueous extract mediated synthesis of titanium dioxide nanoparticles. *J Mater Sci* 2012; 68: 115-117.
24. Abu-Daloo M, Jaradata A, Albissb BA, Al-Rawashdeh NAF. Green synthesis of TiO₂ NPs/pristine pomegranate peel extract nanocomposite and its antimicrobial activity for water disinfection. *J Environ Chem Eng* 2019; 7(5): 103370.
25. Coates J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Meyers RA (Ed.) Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 2000; p: 10815-10837.
26. Goutama SP, Saxenab G, Singhc V, Yadava AK, Bharagavab RN, Thapaa KB. Green synthesis of TiO₂ nanoparticles using leaf extract of *Jatropha curcas* L. for photocatalytic degradation of tannery wastewater. *Chem Eng J* 2018; 336: 386-396.
27. Ao Y, Xu L, Wang P, Wang C, Hou J. Preparation of heterostructured Ag@AgCl/La₂Ti₂O₇ plasmonic photocatalysts with high visible light photocatalytic performance for the degradation of organic pollutants. *RSC Adv* 2016; 6(23): 19223-19232.
28. Zhang J, Liu X, Suo X, Li P, Liu B, Shi H. Facile synthesis of Ag/AgCl/TiO₂ plasmonic photocatalyst with efficiently antibacterial activity. *Mater Lett* 2017; 198: 164-167.
29. Zhang C, Hua H, Liu J, Han X, Liu Q, Wei Z, Shao C, Hu C. Enhanced Photocatalytic Activity of Nanoparticle-Aggregated Ag–AgX(X = Cl, Br)@TiO₂ Microspheres Under Visible Light. *Nano-Micro Lett* 2017; 9(4): 49.
30. Castro-Alarcón N, Herrera-Arizmendi JL, Marroquín-Carteño LA, Guzmán-Guzmán IP, Pérez-Centeno A, Santana-Aranda MA. Antibacterial activity of nanoparticles of titanium dioxide intrinsic and doped with Indium and Iron. *Microbiol. Res Int* 2016; 4(4): 55-62.