

Overcoming Drug Resistance and Removing Water Pollutant Dyes Using Cobalt Nanoparticles Synthesized via the Green Synthesis Method with *Mentha pulegium* Plant Extract

Amin Barani^{1,2},
Alireza Asadollahzadeh Asl³,
Cyrus Eslami^{1,2},
Parastoo Hashemi⁴,
Hamid Reza Goli^{5,6}
Mohammad Ali Ebrahimzadeh^{7,8}

¹ PhD student of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Pharmacy Student, Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran

⁴ Pharm. D., Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Medical Microbiology and Virology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ Molecular and Cell Biology Research Centre, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ Professor of Medicinal Chemistry, Faculty of pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁸ Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 31, 2024; Accepted December 22, 2024)

Abstract

Background and purpose: Due to the increasing importance of protecting human health and preserving the environment, drug resistance and water pollution have drawn significant attention. Nanoparticles have emerged as one of the most promising solutions, with cobalt nanoparticles being particularly interesting due to their unique properties. This study focuses on the green synthesis of cobalt nanoparticles using *Mentha pulegium* and investigates their potential antimicrobial and photocatalytic activities.

Materials and methods: In this experimental study, cobalt nanoparticles were synthesized through green methods using *M. pulegium* aqueous extract. The synthesized nanoparticles were characterized using various analytical techniques, including UV-visible spectroscopy, SEM, EDX, FTIR, and XRD. Furthermore, the antibacterial effects of these nanoparticles were investigated against ATCC strains and ciprofloxacin-resistant strains. Their photocatalytic activity was evaluated for the degradation of methylene blue (MB) in the presence of NaBH₄.

Results: XRD analysis revealed that the synthesized nanoparticles were amorphous, while SEM images showed irregularly shaped particles with an average diameter of 53.91 nm. The cobalt nanoparticles demonstrated excellent antibacterial activity. The maximum antibacterial effects were observed against ATCC strains, specifically *K. pneumoniae* (MIC and MBC values of 0.859 and 13.75 µg/mL, respectively) and *S. aureus* (MIC and MBC values of 1.72 and 27.5 µg/mL, respectively). For ciprofloxacin-resistant strains, the maximum effects were observed against *E. coli* (MIC and MBC values of 0.859 and 6.87 µg/mL, respectively) and *P. mirabilis* (MIC and MBC values of 0.859 and 1.72 µg/mL, respectively). These nanoparticles efficiently degraded methylene blue in the presence of NaBH₄ within 30 minutes, following first-order kinetics with a rate constant of 0.0567 min⁻¹.

Conclusion: The results showed that *M. pulegium* effectively contributed to the formation of nanoparticles, acting as a reducing, stabilizing, and capping agent. In this study, the synthesized cobalt nanoparticles exhibited significant antibacterial activity and effective dye degradation properties. These findings suggest the potential application of cobalt nanoparticles in various biological fields.

Keywords: drug resistance, cobalt nanoparticles, green synthesis, photocatalytic activity, antibacterial activity, *Mentha pulegium*

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 34 (241): 12-28 (Persian).

Corresponding Author: Mohammad Ali Ebrahimzadeh - Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: zadeh20@yahoo.com)

غلبه بر مقاومت دارویی و کمک به حذف آلاینده های آبی با استفاده از نانوذرات کبالت سنتز شده به روش سنتز سبز به وسیله عصاره گیاه کوتکوتو *Mentha pulegium*

امین بارانی^۲
علیرضا اسدالله زاده اصل^۳
سیروس اسلامی^۲
پرستو هاشمی^۴
حمیدرضا گلی^۶
محمد علی ابراهیم زاده^۸

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به اهمیت روزافزون حفاظت از سلامت انسان و حفظ محیط زیست، مسائل مربوط به مقاومت دارویی و آلودگی آب توجه زیادی را به خود جلب کرده است. نانوذرات به عنوان یکی از امیدوارکننده ترین راه حل ها ظاهر شده اند. نانوذرات کبالت به دلیل خواص منحصربه فردشان جالب توجه هستند. این مطالعه با هدف تمرکز سنتز سبز نانوذرات کبالت با استفاده از کوتکوتو و بررسی فعالیت های ضد میکروبی و فوتوکاتالیستی آن ها، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، نانوذرات کبالت با استفاده از روش سبز و با عصاره آبی کوتکوتو سنتز شدند. نانوذرات با استفاده از تکنیک های مختلف آنالیز دستگاهی شامل UV، SEM، EDX، FTIR و XRD شناسایی شدند. اثرات ضد باکتریایی این نانوذرات بر روی سویه های ATCC و سویه های مقاوم به سیپروفلوکساسین بررسی شد. فعالیت فوتوکاتالیستی آن ها برای تخریب متیلن بلو در حضور سدیم بورو هیدرید مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: تجزیه و تحلیل XRD نشان داد که نانوذرات سنتز شده آمورف هستند. تصاویر SEM ذرات نامنظم را با قطر متوسط ۵۳/۹۱ نانومتر نشان داد. نتایج FTIR نقش عصاره را به عنوان یک عامل کاهش دهنده، تثبیت کننده و پوشش دهنده در طول فرآیند سنتز سبز تایید کرد. نانوذرات کبالت، فعالیت ضد باکتریایی بسیار خوبی از خود نشان دادند. حداکثر اثر ضد باکتریایی نانوذرات روی سویه های ATCC، *K. pneumoniae* (مقادیر MIC و MBC به ترتیب ۰/۸۵۹ و ۱۳/۷۵ μg/ml) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (مقادیر MIC و MBC به ترتیب ۱/۷۲ و ۲۷/۵ μg/ml) مشاهده شد. در بررسی اثرات بر سویه های مقاوم، بیشترین اثرات مربوط به *E. coli* (به ترتیب MIC و MBC ۰/۵۸۹ و ۶/۸۷ μg/ml) و *P. mirabilis* (MIC و MBC ۰/۸۵۹ و ۱/۷۲ μg/ml) بود. این نانوذرات به طور موثر متیلن بلو را در حضور سدیم بورو هیدرید در عرض ۳۰ دقیقه، با کینتیک درجه اول با ثابت سرعت ۰/۰۵۶۷ بر دقیقه تجزیه کردند.

استنتاج: نتایج نشان داد که گیاه کوتکوتو نقش خود را به درستی در تشکیل نانوذرات به عنوان عامل کاهنده، تثبیت کننده و پوشاننده ایفا کرده است. می توان از این گیاه در تولید نانوذرات دیگر استفاده کرد. نانوذرات اثرات ضد باکتریایی و تخریب رنگ قابل توجهی از خود نشان دادند. پیشنهاد می شود از این نانوذرات در سایر زمینه های بیولوژیکی استفاده شود.

واژه های کلیدی: مقاومت دارویی، نانوذرات کبالت، سنتز سبز، فعالیت فتوکاتالیستی، فعالیت آنتی باکتریال، کوتکوتو

E-mail: zadeh20@yahoo.com

مؤلف مسئول: محمد علی ابراهیم زاده - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

۱. دستیار شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۲. مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۳. دانشجوی داروسازی، پردیس رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران.
 ۴. دکتر داروساز، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۵. دانشیار، گروه میکروبی شناسی و ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۶. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۷. استاد، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۸. مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۶/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۷/۸ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۱۰/۲

مقدمه

حفظ سلامت انسان و محیط زیست یکی از برجسته‌ترین چالش‌های پیش رو برای بشریت بوده است. در سال‌های اخیر، افزایش جمعیت و به دنبال آن ظهور مقاومت دارویی و دستیابی به منابع سالم و تمیز آب به یکی از دلایل اصلی نگرانی جهانی تبدیل شده است (۲،۱). سالانه میلیون‌ها نفر به دلیل مصرف آب آلوده جان خود را از دست می‌دهند (۳). آلاینده‌های صنعتی شامل رنگ‌های مختلف می‌باشند که پایدار بوده به سختی تجزیه می‌شوند و دارای اثرات جهش‌زایی و سرطان‌زایی می‌باشند. این ترکیبات توسط صنایع وارد آب می‌شوند (۴). از سویی مقاومت دارویی نسبت به باکتری‌ها رتبه دوم را بعد از مقاومت دارویی سرطان دارد (۵،۶). مقاومت دارویی به دلیل استفاده خودسرانه داروها و تغییرات ژنتیکی در میکروارگانیسم‌ها ایجاد می‌شود. پاتوژن‌ها که در معرض داروهای ضد عفونی قرار می‌گیرند می‌توانند مقاومت دارویی ایجاد کنند که این مورد می‌تواند در طول تقسیم سلولی به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جدید منتقل شود. مقاومت میکروارگانیسم به یک آنتی‌بیوتیک می‌تواند منجر به مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های دیگر با ساختار مشابه شود که در نهایت می‌تواند باعث ایجاد سویه‌های مقاوم به دارو (MDR) گردد (۷). پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۵۰، اگر داروهای جدیدی سنتز نشود، هیچ آنتی‌بیوتیک موثری برای درمان عفونت‌ها در دسترس نخواهد بود (۸،۹). از این رو برای غلبه بر این مشکلات، به دلیل زمان بر بودن، هزینه بالای کشف، توسعه و تولید داروهای جدید شیمیایی روش‌های جایگزین مختلفی در حال مطالعه و بررسی هستند که یکی از روش‌های مقرون به صرفه، استفاده از نانوتکنولوژی می‌باشد (۱۰-۱۶).

با گذشت زمان، نانوتکنولوژی و علوم نانو در زمینه‌های مختلفی مانند پزشکی، کشاورزی، زیست پزشکی، داروسازی، فناوری غذایی، آرایشی و بهداشتی و غیره مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۷). نانوذرات (NPs)

را می‌توان با استفاده از روش‌های بیولوژیکی، فیزیکی و شیمیایی تولید کرد. با این وجود، استفاده از رویکردهای شیمیایی و فیزیکی مشکلات زیادی از جمله هزینه‌های زیاد و وجود پسماندهای خطرناک و آلودگی زیست محیطی را به دنبال دارند. رویکرد بیولوژیکی از نظر اقتصادی کارآمد، از نظر اکولوژیکی پایدار، سریع، ایمن و عاری از مواد مضر است (۱۱،۱۸).

می‌توان از گیاهان، مخمرها، قارچ‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها برای تولید نانوذرات مختلف استفاده نمود؛ اما بهترین راه برای سنتز NPs از طریق سنتز سبز با استفاده از گیاهان می‌باشد چون بر خلاف روش‌های سنتی سنتز سبز (استفاده از باکتری و قارچ) نیاز به آماده‌سازی محیط خاص برای پرورش و نگهداری گیاه نمی‌باشد (۱۹).

در سال‌های اخیر نانوذرات فلزی مختلفی مانند CuO، TiO₂، ZnO، MgO، Pt، Se، Ag، Au و Fe با استفاده از روش سنتز سبز، سنتز شده‌اند (۱۸، ۲۷-۲۰). نانوذرات کبالت به دلیل خواص و کاربردهای منحصر به فردشان مورد توجه ویژه محققان قرار گرفته‌اند. این نانوذرات را می‌توان با استفاده از روش‌های سبز یا بیولوژیکی مانند استفاده از عصاره گیاهی یا میکروارگانیسم سنتز کرد (۲۸). نانوذرات کبالت دارای فعالیت کاتالیزوری خوب، خواص مغناطیسی پایدار با عملکرد بالا، خواص زیست پزشکی و فعالیت سیتوتوکسیک هستند (۳۳-۲۹).

کوتکوتو (*Mentha pulegium*) گیاهی از خانواده *Lamiaceae* است. این گیاه در مناطق مرطوب مانند اروپا، آفریقا، چین و ایران قابل مشاهده است. جنس *Mentha* شامل حدود ۲۵ گونه می‌باشد که حاوی مقادیر عمده اسانس‌اند که اغلب در بخش عطر و غذایی استفاده می‌شود (۳۴). در سال‌های اخیر، فعالیت برخی از گونه‌های این گیاه در رابطه با توانایی به دام اندازی رادیکال‌های آزاد، نیتریک اکساید، توانایی احیاکنندگی، شلاته کنندگی فلزات، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد همولیتیک بررسی شده است (۳۸-۳۵).

سایه به دور از نور خورشید و در مجاورت هوای آزاد خشک گردید. مواد خشک شده جهت انجام عصاره‌گیری به قطعات کوچک تر (۲-۳ میلی‌متر) تبدیل شدند (۴۲). برای تهیه محلول شماره ۱، ۱۰ گرم از گیاه خرد شده توزین و به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد. محتویات ظرف در دمای ۵۰ درجه به مدت ۱ ساعت بهم زده شد. در ادامه مجموعه به مدت ۳۰ دقیقه سونیکیت شد. در نهایت محتویات ظرف با استفاده از استفاده از کاغذ صافی واتمن صاف شد و عصاره آبی صاف شده برای سنتز نانوذرات مورد استفاده قرار گرفت.

سنتز سبز نانوذرات کبالت

مقدار ۹۷۰ میلی‌گرم از نیترات کبالت به ۳۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه و سپس در دمای اتاق به هم زده شد (محلول شماره ۲). سپس ۲۰ میلی‌لیتر عصاره آبی گیاه که تازه تهیه شده بود (محلول شماره ۱) به صورت قطره قطره به محلول شماره ۲ اضافه شد و در ادامه محتویات ظرف به مدت ۲۴ ساعت استیر شدند. تغییر رنگ محلول به رنگ قهوه‌ای تیره و پیک جذب UV نشان دهنده تشکیل نانوذرات کبالت بود (تصویر شماره ۱). محتویات ظرف با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و نانوذرات با استفاده از آب دیونیزه و متانول خالص شسته شد. در نهایت نانوذرات در آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند و برای آنالیز مورد استفاده قرار گرفتند.

مشخصه یابی نانوذرات

جهت آنالیز و شناسایی نانوذرات Co با استفاده از اسپکتروفتومتر UV/Vis (طیف‌فتومتر T80 UV-Vis، PGI، پکن، چین)، FE-SEM و (TESCAN BRNO-) و EDX (Mira3) و XRD (پراش سنج PANalytical X-PERT PRO آنالیز شدند ((۱۰ تا ۸۰ درجه=θ)) (با منبع $\lambda=1.54 \text{ \AA}$ CuK α). طیف FT-IR توسط یک طیف‌سنج ATR FT-IR (Santa Clara, Agilent, Cary 630), CA, USA) ثبت شد.

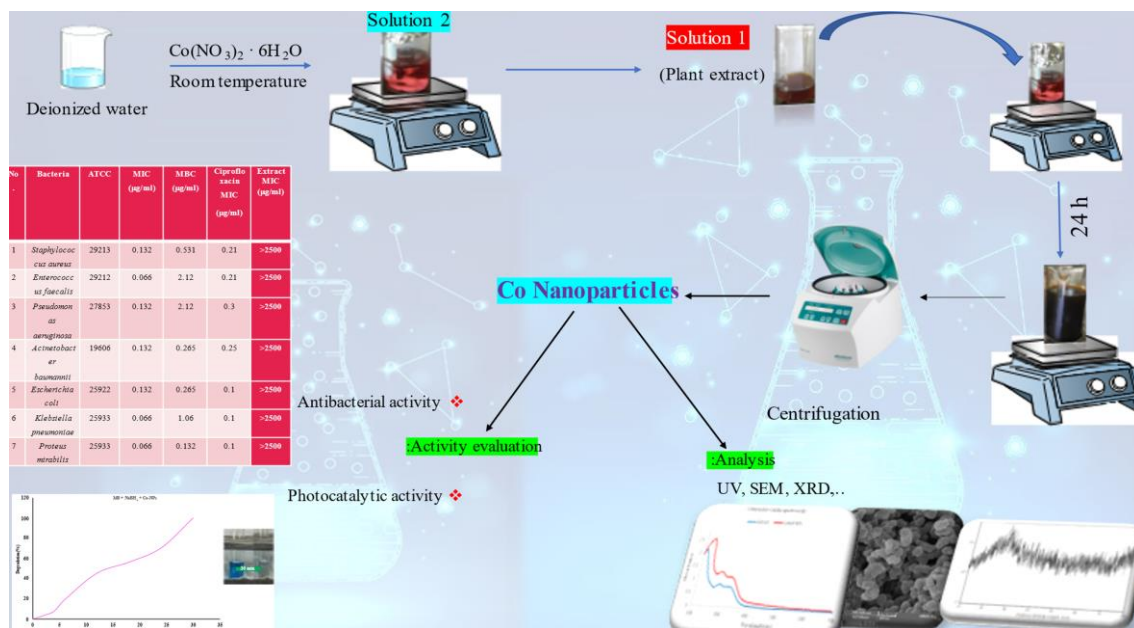
اندام‌های هوایی کونکوتو دارای خواص ضد سرفه، ضد عفونی‌کنندگی است و در طب سنتی برای درمان سرما خوردگی، سینوزیت، وبا، مسمومیت‌های غذایی، برونشیت، رایحه درمانی و بیماری‌های ریوی کاربرد دارد (۴۰، ۳۹). این گیاه شامل بسیاری از ترکیبات فعال زیستی مانند اسانس، ایزومنتون، منتواستات، ایزوفلاوورین و اسید رزمارینیک است که دارای فعالیت‌های کنه کشی، ضد سمیت کبدی، ضد باکتری، آنتی‌اکسیدانی، ضد خوردگی فولاد، آرام‌بخش، اسپاسمولیتیک و ضد ژنوتوکسیک می‌باشند (۴۱). در مطالعات قبلی، با توجه به پتانسیل خوب احیاکنندگی این گیاه، نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه *M. pulgium* سنتز شد و اثرات ضد سرطانی و آنتی‌باکتریایی قابل توجهی از آن گزارش گردید (۴۲). در این مطالعه از کونکوتو به دلیل محتوای فنولی و فلاونوئیدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، به عنوان عامل پوشش دهنده، کاهنده و تثبیت‌کننده به منظور سنتز سبز نانوذرات کبالت استفاده شده است. جهت فرایند فتوکاتالیستی از رنگ متیلن بلو (MB) استفاده شد. با توجه به اهمیت مقاومت چند دارویی به داروهای شیمیایی، مهم‌ترین سویه‌ای باکتریایی برای دستیابی به هدف مورد نظر انتخاب شدند. سپس فعالیت ضد باکتریایی آن‌ها بر روی هشت سویه میکروارگانیزم ATCC حساس و مقاوم (مقاوم به داروی سیپروفلوکساسین) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

انجام این کار در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد اخلاق (IR.MAZUMS.REC.1302.092) به تایید رسیده است.

جمع‌آوری و تهیه عصاره گیاه

در این مطالعه آزمایشگاهی، اندام هوایی کونکوتو از لنگرود توسط دکتر بهمن اسلامی (سیستماتیک گیاهی) شناسایی و جمع‌آوری شد. این بخش به مدت ۱۰ روز در



تصویر شماره ۱: نمای کلی سنتز نانوذرات کبالت با استفاده از عصاره آبی گیاه کونکوتو

(رقت‌سازی در چاهک) (Micro-broth dilution) تعیین شد. به منظور به دست آوردن سوسپانسیون‌های یکنواخت و همگن از معیار کدورت سنجی استاندارد نیم مک فارلند استفاده شد. غلظت‌های سریالی از نانوذرات کبالت تهیه شد. پس از آن پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به کمک توزیع ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث، ۵۰ میکرولیتر از تلقیح میکروبی و ۵۰ میکرولیتر از نانوذرات کبالت تازه سنتز شده با غلظت ۳۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مورد استفاده قرار گرفتند. یکی از چاهک‌های انتهایی به عنوان کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری و بدون نانوذرات کبالت) و یک چاهک دیگر به عنوان کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) در نظر گرفته شد. بعد از پوشاندن چاهک‌ها، میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. اولین چاهکی که هیچ رشدی از ارگانسیم مورد نظر نشان نداد، به عنوان MIC گزارش شد.

سنجش حداقل غلظت کشندگی (MIC)

حداقل غلظت کشندگی باکتری با توجه به مقادیر MIC تعیین شد به طوری که از رقت MIC و چند رقت

تعیین اثرات ضد میکروبی بر سوسپانسیون‌های ATCC حساس و مقاوم بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده با استفاده از سنجش حداقل غلظت بازدارندگی (MIC: Minimum inhibitory concentration) و حداقل غلظت کشندگی (MBC: Minimum bactericidal concentration) بر روی سوسپانسیون‌های ATCC مقاوم به سیروفلوکساسین شامل باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 29213)، *انتروکوکوس فکالیس* (ATCC 29212)، *پسودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853)، *آسینتوباکتر بائومانی* (ATCC 25922)، *اشرشیا کولای* (ATCC 25922)، *کلبسیلا پنومونیا* (ATCC 700603)، *پروتئوس میرابیلیس* (ATCC 29906) و *انتروباکتر آئروژنر* (ATCC 13048) بررسی شد. ۴ سوسپانسیون *استافیلوکوکوس اورئوس*، *پسودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا پنومونیا* و *انتروباکتر آئروژنر* جزو سوسپانسیون‌های ATCC بودند بقیه مقاوم به سیروفلوکساسین بودند.

سنجش حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

حداقل غلظت مهارکنندگی یا MIC نانوذرات بیوسنتز شده با استفاده از روش میکرو-براث دایلوژن

یافته‌ها

آنالیز طیف نور سنج فرابنفش- مرئی (UV-Vis) تعیین دانسیته نوری نانوذرات سنتز شده با دستگاه طیف نورسنج UV-Vis در محدوده طول موج ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر انجام شد. طیف نورسنج فرابنفش- مرئی نانوذرات کبالت در مقایسه با طیف عصاره گیاه کوتکتو را نشان می‌دهد که پیک قابل توجه‌ای را در ۲۳۰ نانومتر (با علامت ★ در نمودار شماره ۱ مشخص شده است) نشان می‌دهد که این پیک در مقایسه با آنالیز طیف نورسنج فرابنفش- مرئی مربوط به عصاره، نشان دهنده تشکیل شدن نانوذرات کبالت می‌باشد (نمودار شماره ۱).

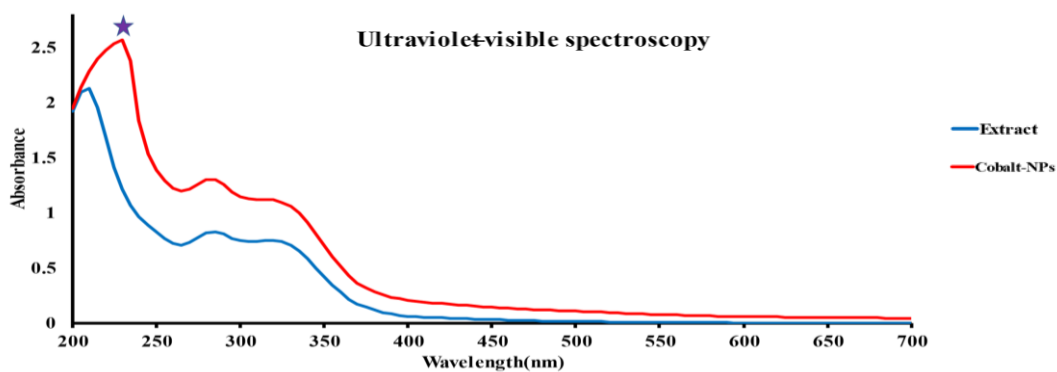
ریخت شناسی نمونه سنتز شده با SEM

برای بررسی اندازه، ریخت‌شناسی و یکنواختی توزیع نانوذرات سنتز شده تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی تهیه شد. تصویر شماره ۱، نانوذرات کبالت سنتز شده (با مقیاس ۲۰۰ نانومتر) را نشان می‌دهد براساس این تصاویر که بیانگر ریخت شناسی ذرات است، شکل ذرات نمونه سنتز شده به‌طور عمده بدون شکل خاص یا irregular بود که به نظر می‌رسد ذرات کروی با اندازه کوچک در اثر فرایند آگلومره شدن و تجمع، ذراتی بدون مورفولوژی خاص را ایجاد کرده‌اند. هم‌چنین همان‌طور که مشاهده می‌شود محدوده اندازه نانوذرات آگلومره شده کبالت، حدوداً بین ۴۸ تا ۷۷ نانومتر و میانگین اندازه ۵۳/۹۱ نانومتر می‌باشد (تصویر شماره ۱).

بالتر از آن نمونه برداری و بر روی محیط کشت بلاد آگار در پلیت‌های جداگانه 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 غلظت از نانوذرات که باکتری در آن رشد نکرده بود، به عنوان حداقل غلظت کشندگی یا MBC در نظر گرفته شد. اگر MIC و MBC یک عدد مشترک را نشان دهند یا حداکثر ۳ رقت تفاوت داشته باشند نشان دهنده باکتری کشندگی نانوذرات مربوطه است.

تست فتوکاتالیستی MB با استفاده از نانوذرات کبالت

اثر فتوکاتالیستی نانوذرات کبالت سنتز شده جهت تخریب رنگ آلی متیلن بلو (MB) در حضور سدیم بورو هیدرید (NaBH_4) ارزیابی شد. ۶ میلی‌لیتر آب دیونیزه به ۳۰ میکرولیتر MB (۵ میلی‌مولار) و ۱۰۰ میکرولیتر از NaBH_4 تازه تهیه شده (۰/۱ مولار) اضافه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از نانوذرات کبالت (۲۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مخلوط واکنش اضافه شد. فرآیند تخریب توسط طیف UV-vis در ناحیه ۲۰۰-۷۰۰ نانومتر در زمان‌های مختلف بررسی شد. حداکثر جذب مربوط به MB در ناحیه ۶۶۵ نانومتر ثبت شد. کینتیک واکنش را می‌توان بدین صورت $\ln(A_t/A_0) = -kt$ محاسبه کرد، که k ثابت سرعت مرتبه اول (min^{-1}) و t زمان واکنش است. A_0 و A_t به ترتیب به‌عنوان جذب رنگ در زمان‌های t و 0 دقیقه می‌باشند.

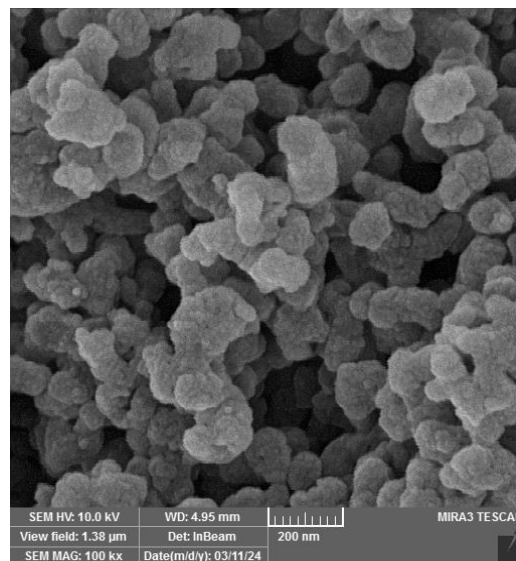


نمودار شماره ۱: طیف سنجی جذبی UV نانوذرات کبالت در مقایسه با عصاره کوتکتو (★: پیک نشان دهنده تشکیل نانوذرات)

شده قرار گرفته‌اند که تولید و پایداری نانوذرات بر عهده این مولکول هاست. هم‌چنین منشا نیتروژن موجود در آنالیز را می‌توان به پروتئین‌های گیاهی مربوط دانست که به وسیله عصاره‌گیری آبی از گیاه استخراج شده‌اند و به عنوان عامل کپ‌کننده در اطراف نانوذرات قرار گرفته‌اند (نمودار شماره ۳).

بررسی IR نانوذرات کبالت

نمودار شماره ۴، طیف IR نانوذرات کبالت همراه با عصاره را نشان می‌دهد. مقایسه طیف‌های عصاره و نانوذرات کبالت ایده مناسبی در مورد مکانیسم بیوسنتز نانوذرات و برهمکنش‌های موجود بین فیتوکیماکال‌های مختلف موجود در عصاره و سطح محصول ارائه می‌کند.



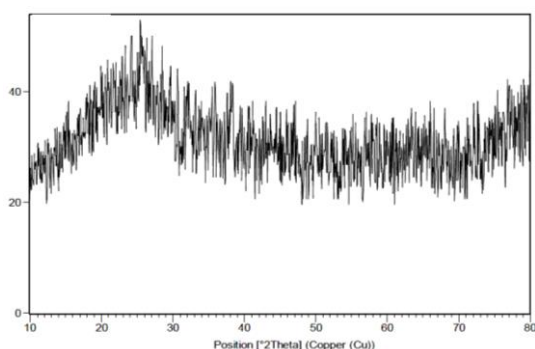
تصویر شماره ۱: میکروگراف میکروسکوپ الکترونی روبشی در مقیاس ۲۰۰ نانومتر مربوط به نانوذرات کبالت

بررسی XRD نانوذرات کبالت

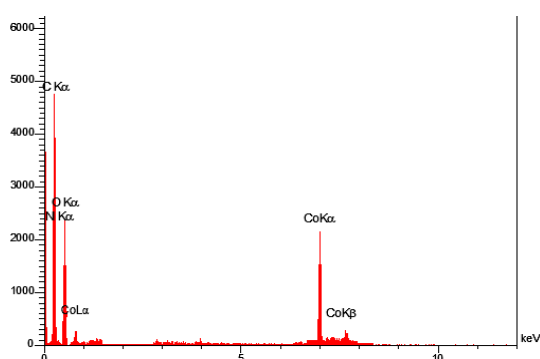
روش XRD برای تعیین خلوص فاز و ماهیت کریستالی نانوذرات کبالت سنتز شده با استفاده از عصاره کوتکوتو مورد استفاده قرار گرفت. پراش حاصل برای نانوذرات در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود هیچ قله یا پیک تیز که مربوط به صفحات کریستالی باشد وجود ندارد. این نشان می‌دهد که ساختار نانوذرات حاصل از این مطالعه، غیر کریستالی (بی‌شکل یا بدون ساختار کریستالی) بوده است. در این زمینه هم آنالیز XRD می‌تواند تاییدی بر آگلومراسیون نانوذرات و عدم وجود مورفولوژی خاص در این نانوذرات سنتز شده باشد (نمودار شماره ۲).

بررسی طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)

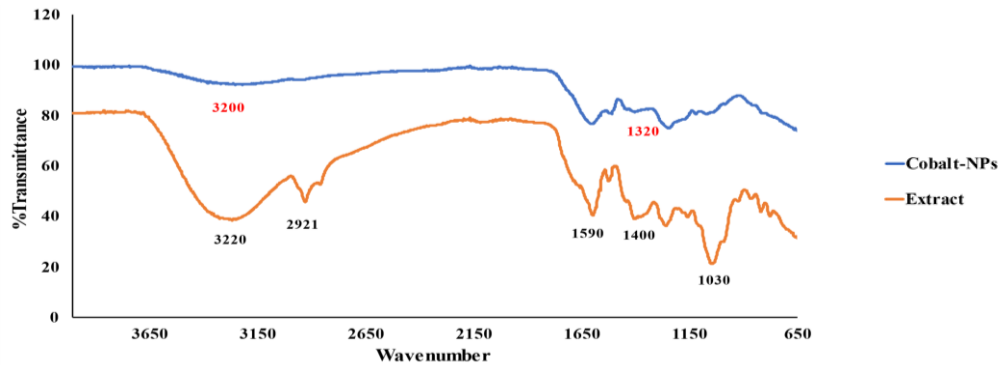
از آنالیز EDX برای تعیین عنصری پودر نانوذرات کبالت سنتز شده استفاده شد. در نانوذرات سنتز شده، طیف EDX وجود عناصر کبالت، کربن، اکسیژن و نیتروژن مرتبط را نشان داد. پیک کربن و اکسیژن مشاهده شده به خاطر حضور ترکیبات فنولی موجود در عصاره می‌باشد که در اطراف نانوذرات به صورت کپ



نمودار شماره ۲: الگوی XRD نانوذرات کبالت سنتز شده با استفاده از عصاره گیاهی کوتکوتو



نمودار شماره ۳: آنالیز EDX نانوذرات کبالت سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه کوتکوتو



نمودار شماره ۴: طیف FT-IR نانوذرات کبالت سنتز شده با استفاده از عصاره کوتکتو

به عصاره مشخص شد که در تمامی چاهک‌ها رشد باکتری اتفاق افتاد، به عبارت دیگر غلظت‌های مشخص از عصاره فاقد خاصیت ضد میکروبی بود ولی نانوذرات بیوسنتز شده تأثیر قابل توجهی در جلوگیری از رشد باکتری‌های درون چاهک‌ها نشان دادند. علاوه بر این، هیچ مهاری برای کنترل، تهیه شده توسط محیط کشت بدون ذرات نانو، دیده نشد. تمام MIC و MBC در جدول شماره ۱، گزارش شده است. فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات کبالت سنتز شده بر روی سویه های باکتریایی ATCC گرم مثبت و منفی با استفاده از روش میکرو-براث دایلوژن (Micro-broth dilution) مورد بررسی قرار گرفت.

جدول شماره ۱: نتایج MIC، MBC، نانوذرات کبالت سنتز شده بر روی سویه های ATCC

Extract MIC(μg/ml)	Ciprofloxacin MIC (μg/ml)	MBC (μg/ml)	MIC (μg/ml)	ATCC	Bacteria
>2500	1/0	27/5	1/12	29113	<i>Staphylococcus aureus</i>
>2500	0/5	55	3/44	13048	<i>Enterobacter aerogenes</i>
>2500	1/0	55	1/12	2753	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
>2500	0/5	1375	0/59	25933	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

در بررسی اثرات انتی باکتریال نانو ذرات کبالت بر روی سویه های ATCC مشخص شد که این نانوذرات بر روی تمام سویه های مورد مطالعه اثرات ضد باکتریایی قابل توجهی داشتند. ماکزیموم اثرات باکتریو استاتیک در جدول شماره ۱ آمده است. این نانو ذرات بر روی سویه *K. pneumoniae* (MIC و MBC) به ترتیب

طیف FTIR عصاره پیک‌ها و کشش‌های قابل توجهی را نشان می‌دهد که حضور گروه‌های عاملی مختلف در عصاره را نشان می‌دهد. پیک وسیع مشاهده شده در 3220 cm^{-1} به دلیل برهمکنش‌های عملکردی OH- بوده است. پیک موجود در حدود 2921 cm^{-1} را می‌توان به ارتعاشات کششی C-H سبب داد. چنین کشش‌هایی به مولکول‌های ویتامین‌ها و پلی‌ساکاریدهای موجود در عصاره نسبت داده می‌شود. قله‌های عبوری که در 1590 cm^{-1} و 1400 cm^{-1} دیده می‌شوند به گروه‌های کربونیل مرتبط هستند. قله دیگری که در ناحیه 1030 cm^{-1} مشاهده می‌شود مربوط به ارتعاشات کششی C-N ترکیبات آلیفاتیک موجود در عصاره می‌باشد. در بررسی FTIR مربوط به نانوذرات کبالت مشاهده می‌شود که پیک‌های موجود در نواحی 3200 cm^{-1} و 1320 cm^{-1} که مربوط به ترکیبات آلی گیه که دارای OH الکلی می‌باشند؛ بوده است که در طی روند احیا و تشکیل نانوذرات این گروه‌های عاملی به گروه C=O تبدیل می‌شوند و در FTIR مربوط به نانوذرات کبالت پیک مربوط به OH الکلی (مربوط به ترکیبات فنول-فلانونیدی عصاره) دیده نمی‌شود که نشان‌دهنده فعالیت عصاره به عنوان عامل کاهنده و کپ‌کننده در تشکیل نانوذرات کبالت می‌باشد.

فعالیت آنتی باکتریال نانوذرات کبالت بیوسنتز شده

نتایج ارزیابی فعالیت ضد میکروبی در جدول شماره ۱، نشان داده شده است. در بررسی MIC مربوط

فتو کاتالیستی با استفاده از NaBH_4 به تنهایی (بدون حضور نانوذرات) کامل نشد. در هنگام کامل شدن فرآیند فتو کاتالیستی، رنگ آبی MB به شفاف (بی‌رنگ) تغییر می‌یابد و این پدیده با کاهش پیک مشاهده UV شده در ناحیه ۶۶۵ نانومتر در ارتباط است. اضافه شدن نانوذرات سنتز شده به محلول MB و NaBH_4 باعث افزایش سرعت تخریب MB شد به این صورت که بعد از گذشت ۳۰ دقیقه از اضافه شدن نانوذرات، رنگ MB به صورت کامل و ۱۰۰ درصد تخریب شد و ناحیه ۶۶۵ نانومتر به صورت بدون پیک یا مسطح رویت شد. ثابت سرعت واکنش فتو کاتالیستی (تخریب متیلن بلو) برابر با 0.0567 min^{-1} محاسبه شد (نمودار شماره ۵-ب و نمودار شماره ۵-پ).

بحث

نانوتکنولوژی و علم نانو، مطالعه و کاربرد مواد در مقیاس نانومتر است که در تمامی زمینه‌ها کاربرد دارند (۴۵-۴۳). در سال‌های اخیر به دلیل سادگی، سازگاری با محیط زیست و مقرون به صرفه بودن استفاده از گیاهان و عصاره‌های گیاهی در فرآیند سنتز نانوذرات، توجه خاصی به روش سنتز سبز شده است. در سال ۲۰۱۷ نانوذرات کبالت با استفاده از عصاره آبی ریشه گیاه *Asparagus racemosus* سنتز شدند. شناسه مهم و اولیه در سنتز نانوذرات کبالت تغییر رنگ محلول حاوی نانوذرات می‌باشد که در این مطالعه در حین تشکیل نانوذرات کبالت رنگ محلول به قهوه‌ای تیره تغییر رنگ پیدا کرده بود. هم‌چنین توسط FTIR نقش کپ‌کنندگی و پایدارکنندگی عصاره گیاه در تشکیل نانوذرات مشخص شد. نانوذرات سنتز شده به صورت مکعبی بودند و متوسط اندازه ذره‌ای برابر با ۴۸/۳۶ نانومتر بود. این نانوذرات اثرات قابل توجه‌ای بر روی سویه‌های *S. dysenteriae* و *E. faecalis* (هاله عدم رشد به ترتیب ۱۴ و ۱۳ میلی‌متر) در مقایسه با سیپروفلوکساسین داشتند (۳۱).

S. aureus و ۰/۸۵۹ و ۱۳/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و MIC) و ترتیب ۱/۷۲ و ۲۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد. در این بررسی *E. aerogenes* (MIC) و ترتیب ۳/۴۴ و ۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به سایر سویه‌های ATCC مورد مطالعه، مقاومت بیش تری نسبت به نانوذرات از خود نشان داد.

به دلیل اثرات قابل توجه نانوذرات بر روی سویه‌های ATCC در مقایسه با آنتی‌بیوتیک مرجع (سیپروفلوکساسین)، اثرات این نانوذرات بر روی سویه‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین نیز مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی اثرات ضد باکتریایی نانوذرات بر روی سویه‌های مقاوم به چند دارو مشاهده شد (جدول شماره ۲). ماکزیموم اثرات باکتریواستاتیک مربوط به سویه *E. Coli* (MIC) و ترتیب ۰/۸۵۹ و ۶/۸۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود و هم‌چنین ماکزیموم اثرات باکتریوساید ($\text{MBC} < 4\text{MIC}$) بر روی سویه *P. mirabilis* (MIC) و ترتیب ۰/۸۵۹ و ۱/۷۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد. در میان سویه‌های مقاوم، سویه *E. faecalis* (MIC) و ترتیب ۶/۸۷ و ۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) مقاومت بیش تری در برابر نانوذرات نسبت به سایر گونه‌ها داشت.

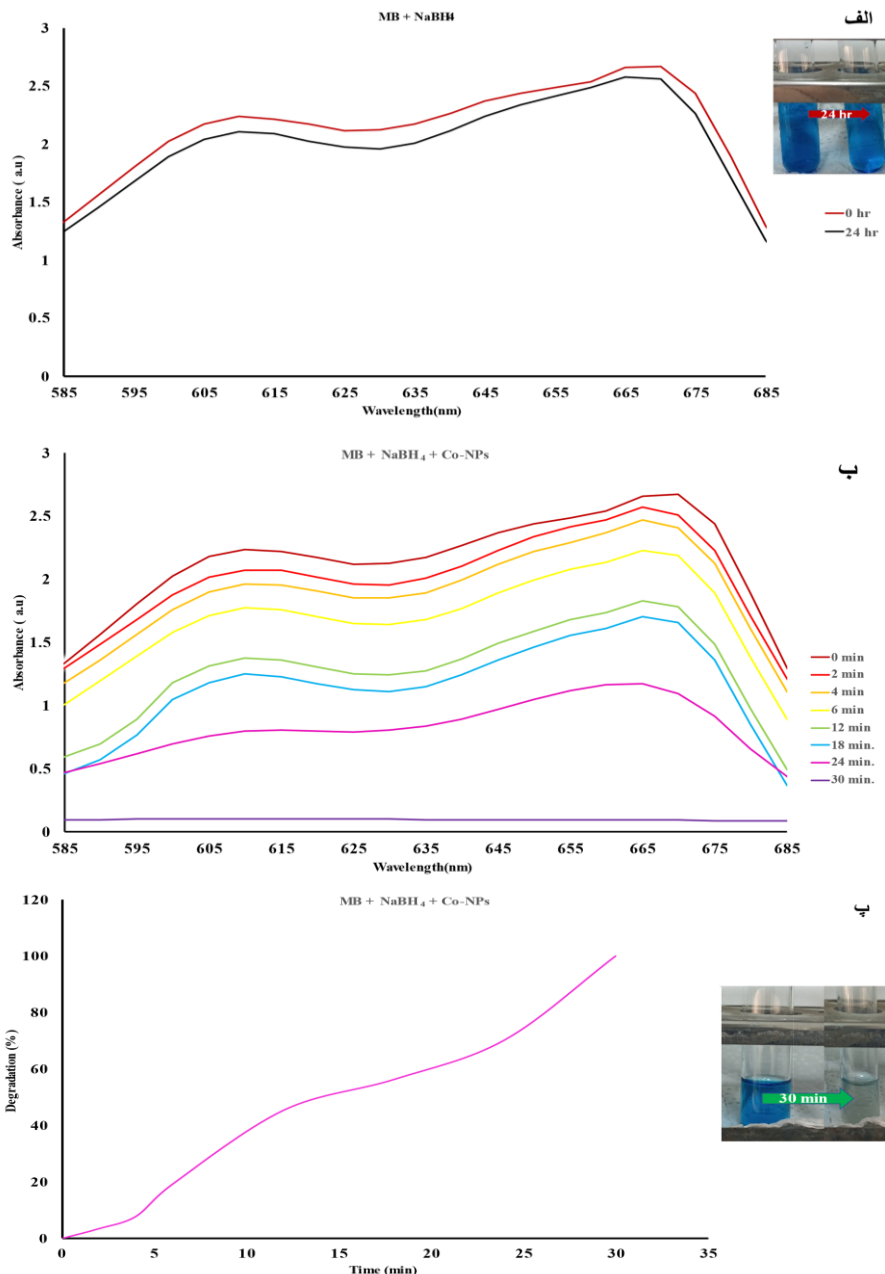
جدول شماره ۲: نتایج MIC، MBC، نانوذرات کبالت سنتز شده بر روی سویه‌های باکتریایی مقاوم به سیپروفلوکساسین

Extract MIC (μg/ml)	Ciprofloxacin MIC (μg/ml)	MBC (μg/ml)	MIC (μg/ml)	ATCC	Bacteria
>۲۵۰۰	R (۶μg/ml)	۵۵	۶/۸۷	۲۹۲۱۲	<i>Enterococcus faecalis</i>
>۲۵۰۰	R (۶μg/ml)	۵۵	۱/۷۲	۱۹۶۰۶	<i>Acinetobacter baumannii</i>
>۲۵۰۰	R (۲μg/ml)	۶/۸۷	۰/۸۵۹	۲۵۹۲۲	<i>Escherichia coli</i>
>۲۵۰۰	R (۲μg/ml)	۱/۷۲	۰/۸۵۹	۲۹۹۰۶	<i>Proteus mirabilis</i>

R: Resistant

فعالیت فتو کاتالیستی نانوذرات کبالت

مطابق نمودار شماره ۵-الف، هنگامی که محلول NaBH_4 به MB اضافه شد (بدون حضور نانوذرات)، شدت جذب MB در طول موج ۶۶۵ نانومتر بعد از ۲۴ ساعت به مقدار اندکی کاهش یافت و فرایند



نمودار شماره ۵: الف) میزان رنگبری متیلن بلو در حضور NaBH₄ بدون نانوذرات، ب) فعالیت فتوکاتالیستی نانوذرات در جهت تخریب MB در حضور NaBH₄، پ) درصد تخریب رنگ MB در گذر زمان در حضور نانوذرات کبالت

شدند (۴۶). پیک UV رویت شده در ناحیه ۲۲۲ نانومتر نشان دهنده سنتز نانوذرات کبالت با متوسط اندازه ذره‌ای ۲۹/۰۷ نانومتر بود. EDX نشان داد که عصاره گیاهی در پروسه سنتز نانوذرات نقش کپ‌کنندگی، پایدارکنندگی و احیاکنندگی خود را به درستی ایفا کرده است. نانوذرات کبالت سنتز شده در این مطالعه در غلظت ۲-۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توانسته بودند جلوی رشد باکتری‌ها

متدهای شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیک مختلفی برای سنتز نانوذرات استفاده می‌شوند. روش‌های فیزیکی نیازمند فشار، دما و هزینه‌های بالا هستند و از طرفی روش‌های شیمیایی نیز باعث تولید پسماندهای سمی و آسیب به محیط زیست می‌شوند که برای غلبه بر این مشکلات با استفاده از روش سنتز سبز و عصاره گیاه *Ziziphora clinopodioides Lam* نانوذرات کبالت سنتز

را بگیرند و در غلظت ۲-۸ mg/ml نیز خاصیت باکتری کشندگی از خود نشان داده بودند (۴۷). در سال ۲۰۲۳ نانوذرات کبالت با استفاده از عصاره متانولی گیاه *Trianthema portulacastrum* در غلظت‌های مختلف عصاره، غلظت‌های مختلف محلول فلزی و زمان‌های مختلف واکنش سنتز شدند. در بررسی حاصل مشخص شد بهترین نقاط بهینه‌سازی جهت دستیابی به کم‌ترین سایز ذرات به ترتیب شامل غلظت عصاره متانولی ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، غلظت محلول فلزی برابر با ۳ میلی‌مولار و زمان انجام واکنش برابر با ۴ ساعت بود و متناسب با این شرایط واکنش، میانگین اندازه ذره‌ای برابر با ۸۴/۹۸ نانومتر مشاهده شد. مطالعات EDX علاوه بر پیک مربوط به کبالت، حاوی پیک‌های بلند اکسیژن و کربن بود که این پیک‌ها مرتبط با مواد آلی موجود در عصاره گیاهی می‌باشد که اطراف نانوذرات را در بر گرفته‌اند. همانند مطالعات دیگر با استفاده از آنالیز FTIR نقش عصاره در سنتز و جلوگیری از آگومراسیون نانوذرات تایید شد. در بررسی اثرات آنتی‌باکتریال این نانوذرات بر روی سویه *Escherichia coli* (گرم-) نسبت به سویه *Bacillus subtilis* (گرم+) اثرات بهتری داشتند (۴۸). از طرفی در مطالعه پیشین نشان داده شد که گیاه کوتکتو به دلیل داشتن ترکیبات بیواکتیو مانند ترکیبات فنولی در روند سنتز سبز نانوذرات نقره، توانست به‌عنوان عامل کاهنده، پایدارکننده و کپ‌کننده نقش ایفا کند و نانوذرات نقره سنتز شده اثرات آنتی‌باکتریال چشم‌گیری را در برابر سویه‌های ATCC و مقاوم بالینی نشان دادند (۴۲).

نانوذرات کبالت در مقادیر کم برای بدن غیر سمی هستند؛ اما برای از بین بردن باکتری‌های و قارچ‌ها بسیار موثر هستند (۴۹). فعالیت آنتی‌باکتریال یکی از ویژگی‌های شناخته شده نانوذرات می‌باشد، در مطالعات زیادی مکانیسم آن گزارش شده است که می‌توان به تماس نانو ذرات با دیواره سلولی باکتری‌ها (برهمکنش الکترو استاتیکی) و ایجاد منافذ در آن و رخ دادن مرگ میکرو ارگانیسم به دلیل نشت سیتوزول به بیرون، نفوذ نانوذرات به

داخل میکروارگانیسم و ایجاد یک کمپلکس قوی با فسفات، اکسیژن و گوگرد موجود در ساختار DNA، RNA و پروتئین‌های آن و در نهایت ایجاد اختلال در روند طبیعی فعالیت میکروارگانیسم، تولید ذرات فعال اکسیژن (ROS) و ایجاد آسیب به DNA، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک از طریق استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی و ایجاد اختلال در روند تولید ATP و در نهایت مختل شدن سنتز DNA در میکروارگانیسم، اشاره کرد (۵۵-۵۰).

یکی از چالش‌های مهم در قرن حاضر در رابطه با اکوسیستم و محیط‌زیست، حذف مواد شیمیایی آلی غیرقابل تجزیه از پسماندهای صنعتی می‌باشد. رنگ‌های شیمیایی بخش قابل توجهی از رنگ‌های مصنوعی را تشکیل می‌دهند و دارای اثرات ژنوتوکسیک و سرطان‌زا می‌باشد. روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی مختلفی برای از بین بردن یا تخریب رنگ‌های شیمیایی وجود دارد که در بین آن‌ها متد فتوکاتالیستی با استفاده از نانوذرات توجه محققان قرار گرفته است. در مطالعه‌ای نانوذرات کبالت سنتز شده (با متد شیمیایی) با میانگین اندازه ذره‌ای ۸۰ نانومتر، توانسته بودند در محیط اسیدی (pH = ۲/۵) بعد از گذشت ۹۰ دقیقه از زمان واکنش، به صورت کامل رنگ متیل اورانژ را از بین ببرند و پیک UV مشاهده شده در ناحیه ۵۰۰ نانومتر به صورت کامل ناپدید شده بود (۵۶). نانوذرات مغناطیسی کبالت فریت سنتز شده با استفاده از روش هیدروترمال (متد شیمیایی) دارای اندازه ذره‌ای ۲۰-۳۰ نانومتر و به شکل مکعبی بودند. توانایی این نانوذرات در پرسه رنگ بری MB با استفاده از آنالیز دستگاهی UV بررسی شد. نانوذرات بعد از ۱۴۰ دقیقه، ۸۰ درصد رنگ متیلن بلو را تخریب نمود. ثابت سرعت رنگبری در این واکنش برابر با 0.2 min^{-1} بود (۵۷). رنگ MB یک رنگ کاتیونی می‌باشد که نسبت به رنگ‌های آنیونی سمی‌تر است و متدهای مختلفی برای از بین بردن این رنگ‌ها وجود دارد که یکی از بهترین متدها استفاده از پرسه یا فرایند فتوکاتالیستی می‌باشد که در این فرایند ساختار رنگ‌ها تحت تابش

سویه‌های باکتریایی مختلف نیز مشاهده شد MIC و MBC نانوذرات سنتز شده به ترتیب در رنج ۳۱/۲۵-۵۰۰ و ۵۰۰-۲۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ بود (۶۳).

اکثر مطالعات انجام شده در جهت سنتز نانوذرات کبالت با استفاده از روش سنتز سبز منتهی به دست یابی به نانوذرات کریستالی بودند (۶۶-۶۴). در مطالعه حاضر، نانوذرات کبالت بدون ساختار کریستالی و بدون مورفولوژی خاص بودند. اندازه ذره‌ای کم و آمورف بودن می‌تواند مزیتی باشد که باعث شده این نانوذرات اثرات قابل توجهی بر روی سویه‌های باکتریایی ATCC حساس و مقاوم داشته باشند. از طرفی دیگر تا به امروز مطالعات رنگبری و بررسی اثرات فتوکاتالیستی مربوط به نانوذرات کبالتی بوده است که با استفاده از متد های شیمیایی و فیزیکی سنتز شده اند یا به صورت نانو کامپوزیت‌اند ولی نانوذرات کبالت در این مطالعه با استفاده از روش سنتز سبز تهیه شدند و توانستند رنگ MB را در مدت زمان ۳۰ دقیقه به صورت کامل تخریب کنند. نانوذرات کبالت سنتز سبز شده با استفاده از عصاره آبی گیاه کوتکوتو به صورت آمورف با میانگین قطر ۵۳/۹۱ نانومتر تهیه شد. بیشینه اثرات باکتریواستاتیک این نانو ذرات بر روی سویه‌های ATCC مربوط به سویه‌های *K. pneumoniae* و *S. aureus* به دست آمد. هم‌چنین در بررسی اثرات ضد باکتریایی نانوذرات بر روی سویه‌های مقاوم، بیشینه اثرات باکتریواستاتیک مربوط به سویه *E. Coli* و *P. mirabilis* بود. هم‌چنین این نانوذرات در حضور NaBH_4 رنگ متیلن بلور را بعد از گذشت ۳۰ دقیقه به‌طور کامل تخریب کند و کینتیک واکنش فتوکاتالیستی از نوع درجه اول و ثابت سرعت واکنش فتوکاتالیستی برابر با 0.0567 min^{-1} بود.

سپاسگزاری

این مقاله، حاصل پایان نامه دوره دکتری حرفه‌ای آقای علیرضا اسدالله زاده اصل در دانشکده داروسازی پردیس رامسر می‌باشد.

نور خورشید تخریب می‌شود و در نهایت به CO_2 و H_2O تبدیل می‌شوند (۵۸، ۵۹). جهت استفاده از این متد، فعالیت نانوذرات کبالت-اکسید روی سنتز شده در جهت حذف رنگ MB در ناحیه ۶۵۴ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد این نانوذرات با غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار در حضور سدیم برو هیدرید (NaBH_4) با غلظت ۸ میلی‌مولار بعد از گذشت ۱۴ دقیقه توانستند رنگ MB (با غلظت ۰/۰۸ میلی‌مولار) را به صورت کامل تجزیه کند (۶۰).

در سال ۲۰۱۴ در طی مطالعه‌ای SA.Salman و همکاران نانوذرات کبالت را با استفاده از هیدرازین و اسید سیتریک سنتز کردند. در طی این فرآیند، pH واکنش در محدوده ۱۲-۱۴ تنظیم شد و در نهایت نانوذرات سنتز شده با استفاده از آنالیزهای دستگاهی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج SEM نشان داد که نانوذرات سنتز شده کریستالی کروی و بامیانگین اندازه ذره‌ای ۴۰۰ نانومتر بودند (۶۱). در ادامه نانوذرات کبالت با استفاده از این متد در سال ۲۰۲۱ توسط AA. Abass و همکاران سنتز شد و اثرات آن بر روی سویه‌های باکتریایی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنتی‌باکتریال نشان داد نانوذرات کبالت سنتز شده (در غلظت ۱۵۰ $\mu\text{g/ml}$) در مقایسه با سیروفلوکساسین بر روی *E. Coli* و *P. mirabilis* اثرات ضعیفی از خود نشان دادند (قطر هاله عدم رشد سیروفلوکساسین برای *E. Coli* و *P. mirabilis* به ترتیب ۲۹/۳۰ و ۳۰/۱۷ میلی‌متر و قطر هاله عدم رشد نانوذرات کبالت برای *E. Coli* و *P. mirabilis* به ترتیب ۱۵/۱۶ و ۱۲/۲۶ میلی‌متر) (۶۲). در مطالعه‌ای دیگر نانوذرات کبالت با استفاده از امواج اولتراسونیک و سورفکتانت‌ها (مانند SDBS، PEG، CTA) و عامل کاهنده (KBH_4 = پتاسیم برو هیدرید) سنتز شدند و در نهایت اثرات فتوکاتالیستی و آنتی‌باکتریال این نانوذرات بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوذرات سنتز شده با استفاده از امواج اولتراسونیک توانست بعد از گذشت ۱۲۰ دقیقه از زمان واکنش، رنگ اسید قرمز و اسید آبی را به ترتیب ۶۸ و ۲۹ درصد تخریب کند. در بررسی اثرات آنتی‌باکتریال این نانوذرات بر روی

References

1. Barani A, Alizadeh SR, Ebrahimzadeh MA. A comprehensive review on catalytic activities of green-synthesized selenium nanoparticles on dye removal for wastewater treatment. *Water* 2023; 15(18): 3295.
2. Ebrahimzadeh MA, Barani A, Habibian AH, Goli HR, Alizadeh SR. Overcoming multidrug-resistant bacteria and fungi by green synthesis of AgNPs using *Nepeta pogonosperma* extract, optimization, characterization and evaluation of antibacterial and antifungal effects. *Eur J Chem* 2023; 14(2): 254-263.
3. Isa EDM, Shameli K, Jusoh NWC, Sukri SNAM. Photocatalytic Degradation with Green Synthesized Metal Oxide Nanoparticles—A Mini Review. *J Nanosci Nanotechnol* 2021; 2(1): 70-81.
4. Marimuthu S, Antonisamy AJ, Malayandi S, Rajendran K, Tsai P-C, Pugazhendhi A, et al. silver nanoparticles in dye effluent treatment: A review on synthesis, treatment methods, mechanisms, photocatalytic degradation, toxic effects and mitigation of toxicity. *J Photochem Photobiol B* 2020; 205: 111823. PMID: 32120184.
5. Mba IE, Nweze EI. Nanoparticles as therapeutic options for treating multidrug-resistant bacteria: research progress, challenges, and prospects. *World J Microbiol Biotechnol* 2021; 37(6): 108.
6. Borgio JF, Rasdan AS, Sonbol B, Alhamid G, Almandil NB, AbdulAzeez S. Emerging status of multidrug-resistant bacteria and fungi in the arabian peninsula. *Biology* 2021; 10(11): 1144. PMID: 34827138.
7. Choi JS, Jung HC, Baek YJ, Kim BY, Lee MW, Kim HD, et al. Antibacterial activity of green-synthesized silver nanoparticles using *Areca catechu* extract against antibiotic-resistant bacteria. *Nanomaterials* 2021; 11(1): 205.
8. Wertheimer A. The urgent need for new antibiotics. *JPHSR* 2022; 13(3).
9. Vivas R, Barbosa AAT, Dolabela SS, Jain S. Multidrug-resistant bacteria and alternative methods to control them: an overview. *Microb Drug Resist* 2019; 25(6): 890-908. PMID: 30811275.
10. Ranjbar T, Sadeghian F, Goli HR, Ahanjan M, Ebrahimzadeh MA. Green synthesis of silver nanoparticles with *Allium paradoxum* extract and evaluation of their antibacterial activities. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2020; 29(182): 1-11.
11. Shirzadi-Ahodashi M, Mizwari ZM, Hashemi Z, Rajabalipour S, Ghoreishi SM, Mortazavi-Derazkola S, et al. Discovery of high antibacterial and catalytic activities of biosynthesized silver nanoparticles using *C. fruticosus* (CF-AgNPs) against multi-drug-resistant clinical strains and hazardous pollutants. *Environ Technol Innov* 2021; 23(37): 101607.
12. Ebrahimzadeh MA, Naghizadeh A, Mohammadi-Aghdam S, Khojasteh H, Ghoreishi SM, Mortazavi-Derazkola S. Enhanced catalytic and antibacterial efficiency of biosynthesized *Convolvulus fruticosus* extract capped gold nanoparticles (CFE@ AuNPs). *J Photochem Photobiol B* 2020; 209: 111949.
13. Ebrahimzadeh MA, Hashemi Z, Mohammadyan M, Fakhar M, Mortazavi-Derazkola S. In vitro cytotoxicity against human cancer cell lines (MCF-7 and AGS), antileishmanial and antibacterial activities of green synthesized silver nanoparticles using *Scrophularia striata* extract. *Surfaces and Interfaces* 2021; 23: 100963.
14. Pandey A, Shukla P, Srivastava PK. Remediation of dyes in water using green

- synthesized nanoparticles (NPs). *International Journal of Plant and Environment* 2020; 6(1): 68-84.
15. Akbari A, Sabouri Z, Hosseini HA, Hashemzadeh A, Khatami M, Darroudi M. Effect of nickel oxide nanoparticles as a photocatalyst in dyes degradation and evaluation of effective parameters in their removal from aqueous environments. *Inorg Chem Commun* 2020; 115: 107867.
 16. Kumar S, Ahlawat W, Bhanjana G, Heydarifard S, Nazhad MM, Dilbaghi N. Nanotechnology-based water treatment strategies. *J Nanosci Nanotechnol* 2014; 14(2): 1838-1858. PMID: 24749460.
 17. Ebrahimzadeh MA, Alizadeh SR, Hashemi Z. Green synthesis of gold nanoparticles using *Sambucus ebulus* fruit extract, characterization, and antileishmanial, antibacterial, antioxidant, and photocatalytic activities. *Eur J Chem* 2023; 14(2): 223-230.
 18. Hashemi Z, Ebrahimzadeh MA, Biparva P, Mortazavi-Derazkola S, Goli HR, Sadeghian F, et al. Biogenic silver and zero-Valent iron nanoparticles by *Feijoa*: Biosynthesis, characterization, cytotoxic, antibacterial and antioxidant activities. *AntiCancer Agents Med Chem* 2020; 20(14): 1673-1687. PMID: 32560617.
 19. Hamelian M, Zangeneh MM, Amisama A, Varmira K, Veisi H. Green synthesis of silver nanoparticles using *Thymus kotschyanus* extract and evaluation of their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects. *Applied Organometallic Chemistry* 2018; 32(9): e4458.
 20. Alizadeh SR, Ebrahimzadeh MA. Characterization and anticancer activities of green synthesized CuO nanoparticles, A review. *Anticancer Agents Med Chem* 2021; 21(12): 1529-1543. PMID: 33121417.
 21. Ouerghi O, Geesi MH, Riadi Y, Ibnouf EO. Limon-citrus extract as a capping/reducing agent for the synthesis of titanium dioxide nanoparticles: Characterization and antibacterial activity. *Green Chem Lett Rev* 2022; 15(3): 483-490.
 22. Agarwal H, Kumar SV, Rajeshkumar S. A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles—An eco-friendly approach. *Resource-Efficient Technologies* 2017; 3(4): 406-413.
 23. Silva AA, Sousa AMF, Furtado CR, Carvalho NM. Green magnesium oxide prepared by plant extracts: synthesis, properties and applications. *Mater Today Sustain* 2022; 20: 100203.
 24. Eltaweil AS, Fawzy M, Hosny M, Abd El-Monaem EM, Tamer TM, Omer AM. Green synthesis of platinum nanoparticles using *Atriplex halimus* leaves for potential antimicrobial, antioxidant, and catalytic applications. *Arab J Chem* 2022; 15(1): 103517.
 25. Alizadeh SR, Abbastabar M, Nosratabadi M, Ebrahimzadeh MA. High antimicrobial, cytotoxicity, and catalytic activities of biosynthesized selenium nanoparticles using *Crocus caspius* extract. *Arab J Chem* 2023; 16(6): 104705.
 26. Aboutorabi SN, Nasiriboroumand M, Mohammadi P, Sheibani H, Barani H. Biosynthesis of silver nanoparticles using safflower flower: structural characterization, and its antibacterial activity on applied wool fabric. *J Inorg Organomet Polym* 2018; 28: 2525-2532.
 27. Shirzadi-Ahodashi M, Mortazavi-Derazkola S, Ebrahimzadeh MA. Biosynthesis of noble metal nanoparticles using *Crataegus monogyna* leaf extract (CML@ X-NPs, X=Ag, Au): Antibacterial and cytotoxic activities against breast and gastric cancer cell lines. 2020; 21:

- 100697.
28. Balela MDL. Synthesis and characterization of cobalt nanoparticles prepared by liquid-phase reduction. Dissertation Master of Science, Universiti Sains Malaysia; 2008.
 29. Shobha N, Nanda N, Kumar P, Nagabhushana B, Praveen M. Synthesis, Characterization, And Anti-Bacterial Activity of Colloidal Supported Cobalt Nanoparticles. *Int J Sci Eng Res* 2018; 6(1): 289-298.
 30. NW Ali Z, BA Alabdulaziz M, Abood Mahdi M, Bassam Ashoor A A. Green Synthesis of Cobalt Nanoparticles and their Application in Removal of Lead from Polluted Water. *Bas J Sci* 2021; 39(2): 292-305.
 31. Varaprasad T, Govindh B, Rao B. Green synthesized cobalt nanoparticles using *Asparagus racemosus* root extract & evaluation of antibacterial activity. *International Journal of ChemTech Research*. 2017; 10(9): 339-345.
 32. Yang H, Su Y, Shen C, Yang T, Gao H. Synthesis and magnetic properties of ϵ -cobalt nanoparticles. *Surf Interface Anal* 2004; 36(2): 155-160.
 33. Osorio-Cantillo C, Santiago-Miranda A, Perales-Perez O, Xin Y. Size-and phase-controlled synthesis of cobalt nanoparticles for potential biomedical applications. *J Appl Phys* 2012; 111(7): 07B324.
 34. Aires A, Marrinhas E, Carvalho R, Dias C, Saavedra MJ. Phytochemical composition and antibacterial activity of hydroalcoholic extracts of *Pterospartum tridentatum* and *Mentha pulegium* against *Staphylococcus aureus* isolates. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 5201879. PMID: 27190990.
 35. Ebrahimzadeh MA, Eslami S, Nabavi SM, Nabavi SF, Moghaddam AH, Bekhradnia AR. Estimation of essential and toxic mineral elements in *Mentha* species. *Asian J Chem* 2011; 23(4): 1648-1650.
 36. Ebrahimzadeh M, Nabavi S, Nabavi S. Antioxidant and antihemolytic activities of *Mentha longifolia*. *Pharmacologyonline* 2010; 2: 464-471.
 37. Ebrahimzadeh M, Nabavi S, Nabavi S. Biological activities of *Mentha spicata* L. *Pharmacology online* 2010; 1: 841-848.
 38. Ebrahimzadeh M, Nabavi S, Nabavi S, Eslami B. Antioxidant and antihemolytic activities of *Mentha piperita*. *Pharmacologyonline* 2010; 1: 744-752.
 39. Şesan TE, Enache E, Iacomi BM, Oprea M, Oancea F, Iacomi C. Antifungal activity of some plant extracts against *Botrytis cinerea* Pers. in the blackcurrant crop (*Ribes nigrum* L). *Acta Sci Pol-Hortoru* 2015; 14(1): 29-43.
 40. Ghazghazi H, Chedia A, Weslati M, Trakhna F, Houssine S, Abderrazak M, et al. Chemical Composition and in vitro Antimicrobial Activities of *Mentha pulegium* Leaves Extracts against Foodborne Pathogens. *J Food Safety* 2013; 33(3): 239-246.
 41. Miraj S, Kiani S. Study of pharmacological effect of *Mentha pulegium*: A review. *Der Pharmacia Lettre* 2016; 8(9): 242-245.
 42. Hashemi Z, Mizwari ZM, Alizadeh SR, Habibi M, Mohammadrezaee S, Ghoreishi SM, et al. Anticancer and antibacterial activity against clinical pathogenic multi-drug-resistant bacteria using biosynthesized silver nanoparticles with *Mentha pulegium* and *Crocus caspius* extracts. *Inorg Chem Commun* 2023; 154: 110982.
 43. Yoon K-Y, Byeon JH, Park J-H, Hwang J. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Sci Total Environ* 2007; 373(2-3): 572-575. PMID: 17173953.

44. Su J, Zhang J, Liu L, Huang Y, Mason RP. Exploring feasibility of multicolored CdTe quantum dots for in vitro and in vivo fluorescent imaging. *J Nanosci Nanotechnol* 2008; 8(3): 1174-1177. PMID: 18468119.
45. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(6): 1712-1720. PMID: 17261510.
46. Sintubin L, De Windt W, Dick J, Mast J, Van Der Ha D, Verstraete W, et al. Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009; 84(4): 741-749.
47. Hou H, Mahdavi B, Paydarfard S, Zangeneh MM, Zangeneh A, Sadeghian N, et al. Novel green synthesis and antioxidant, cytotoxicity, antimicrobial, antidiabetic, anticholinergics, and wound healing properties of cobalt nanoparticles containing *Ziziphora clinopodioides* Lam leaves extract. *Sci Rep* 2020; 10(1): 12195. PMID: 32699314
48. Prakash A, Sur S, Dave V, Sharma P, Das S, Roy P, et al. Green synthesized cobalt nanoparticles from *Trianthema portulacastrum* L. as a novel antimicrobials and antioxidants. *Prep Biochem Biotechnol* 2024; 54(3): 328-342. PMID: 37493403
49. Eleraky NE, Allam A, Hassan SB, Omar MM. Nanomedicine fight against antibacterial resistance: an overview of the recent pharmaceutical innovations. *Pharmaceutics* 2020; 12(2): 142. PMID: 32046289.
50. Franco D, Calabrese G, Guglielmino SPP, Conoci S. Metal-based nanoparticles: Antibacterial mechanisms and biomedical application. *Microorganisms* 2022; 10(9): 1778.
51. Summer M, Ali S, Tahir HM, Abaidullah R, Fiaz U, Mumtaz S, et al. Mode of Action of Biogenic Silver, Zinc, Copper, Titanium and Cobalt Nanoparticles Against Antibiotics Resistant Pathogens. *J Inorg Organomet Polym Mater* 2024; 34(4): 1-35.
52. Naik MM, Naik HB, Nagaraju G, Vinuth M, Vinu K, Viswanath R. Green synthesis of zinc doped cobalt ferrite nanoparticles: Structural, optical, photocatalytic and antibacterial studies. *Nano-Structures & Nano-Objects* 2019; 19: 100322.
53. Kharade Suvarta D, Nikam Gurunath H, Mane Gavade Shubhangi J, Patil Sachinkumar R, Gaikwad Kishor V. Biogenic synthesis of cobalt nanoparticles using *Hibiscus cannabinus* leaf extract and their antibacterial activity. *Res J Chem Environ* 2020; 24(5): 9-13.
54. Iravani S, Varma RS. Sustainable synthesis of cobalt and cobalt oxide nanoparticles and their catalytic and biomedical applications. *Green Chem* 2020; 22(9): 2643-2661.
55. Satpathy G, Manikandan E. Cobalt Nanoparticle As The Antibacterial Tool: In Vitro. *International Journal of Engineering and Advanced Technology (IJEAT)* 2019; 8: 3684-3687.
56. Sha Y, Mathew I, Cui Q, Clay M, Gao F, Zhang XJ, et al. Rapid degradation of azo dye methyl orange using hollow cobalt nanoparticles. *Chemosphere* 2016; 144: 1530-1535. PMID: 26498101
57. Kalam A, Al-Sehemi AG, Assiri M, Du G, Ahmad T, Ahmad I, et al. Modified solvothermal synthesis of cobalt ferrite (CoFe₂O₄)magnetic nanoparticles photocatalysts for degradation of methylene blue with

- H₂O₂/visible light. *Results in Physics* 2018; 8: 1046-1053.
58. Modi S, Yadav VK, Gacem A, Ali IH, Dave D, Khan SH, et al. Recent and emerging trends in remediation of methylene blue dye from wastewater by using zinc oxide nanoparticles. *Water* 2022; 14(11): 1749.
59. Dabhane H, Chatur S, Jadhav G, Tambade P, Medhane V. Phytogenic synthesis of gold nanoparticles and applications for removal of methylene blue dye: A review. *J Environ Chem Ecotoxicol* 2021; 3: 160-171.
60. Din MI, Khalid R, Hussain Z, Gul S, Mujahid A. Synthesis and characterization of cobalt doped zinc oxide nanoparticles and their application for catalytic reduction of methylene blue dye. *Desalination and Water Treatment* 2024; 317: 100002.
61. Salman S, Usami T, Kuroda K, Okido M. Synthesis and characterization of cobalt nanoparticles using hydrazine and citric acid. *J Nanotechnol* 2014; 2014(1): 525193.
62. Abass AA, Abdulridha WaM, Alaarage WK, Abdulrudha NH, Haider J. Evaluating the antibacterial effect of cobalt nanoparticles against multi-drug-resistant pathogens. *J Med Life* 2021; 14(6): 823-833. PMID: 35126754
63. Yousefi SR, Alshamsi HA, Amiri O, Salavati-Niasari M. Synthesis, characterization and application of Co/Co₃O₄ nanocomposites as an effective photocatalyst for discoloration of organic dye contaminants in wastewater and antibacterial properties. *J Mol Liq* 2021; 337(699): 116405.
64. Igwe O, Ekebo E. Biofabrication of cobalt Nanoparticles using leaf extract of odorata and their potential antibacterial application. *Res J Chem Sci* 2018; 8(1): 11-17.
65. Ali H, Dixit S, Alarifi S. Biosynthesis and screening of cobalt nanoparticles using citrus species for antimicrobial activity. *Open Chemistry* 2024; 22(1): 20240021.
66. Ahmed K, Tariq I, Mudassir SUSM. 11. Green synthesis of cobalt nanoparticles by using methanol extract of plant leaf as reducing agent. *Pure Appl Biol* 2021; 5(3): 453-457.