

بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره بیوستتر شده با استفاده از عصاره آبی گیاه آقطی



امید عزیزیان شرمه^{۱*}، جعفر ولی زاده^۲، میثم نوروزی فر^۱، علی قاسمی^۲

(۱) گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

(۲) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۵

تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۲۰

چکیده

مقدمه: مطالعات گسترده ای در مورد پتانسیل استفاده از ترکیبات ضد میکروبی موجود در گیاهان و نیز استفاده از نانوذرات برای کنترل و درمان عوامل بیماری زا صورت گرفته است. هدف از مطالعه حاضر سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه آقطی و بررسی فعالیت ضد میکروبی آن ها می باشد.

مواد و روش ها: برای سنتز نانوذرات نقره، عصاره تازه تهیه و به محلول نیترات نقره با غلظت ۱ میلی مولار اضافه شد. برای به دست آوردن نانوذراتی با شکل و اندازه مطلوب، پارامترهای موثر بر سنتز نانوذرات نقره مانند: pH، حجم عصاره، غلظت یون نقره، دما و زمان واکنش بهینه شدند و مورد مطالعه قرار گرفتند. فعالیت ضد میکروبی عصاره و نانوذرات نقره، به دو روش انتشار چاهکی و تعیین MIC، علیه چهار باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (PTTC 1112)، باسیلوس سرئوس (PTTC 1154)، اشرشیاکلی (PTTC 1399)، سودوموناس آئروژینوزا (PTTC 1707) و دو قارچ آسپرژیلوس نایجر (PTTC 5012) و کاندیدا آلبیکنس (PTTC 5027) مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته های پژوهشی: پس از افزودن عصاره به محلول نیترات نقره، رنگ محلول به رنگ قهوه ای تغییر رنگ داد. نانوذرات نقره بیشترین جذب را در ۴۰۵ نانومتر نشان دادند و دارای شکل کروی و میانگین اندازه آن ها بین ۱۲-۸ نانومتر بوده است. این نانوذرات فعالیت ضد میکروبی چشمگیری بر روی نمونه های مورد آزمایش نشان دادند، به طوری که در غلظت های بسیار پایین از رشد باکتری ها و قارچ ها جلوگیری کردند.

بحث و نتیجه گیری: گیاهان به دلیل داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات ثانویه فراوان، نقش احیاء کنندگی و پایداری سازی نانوذرات را ایفا می کنند. در این پژوهش، نانوذرات نقره توسط عصاره آبی برگ گیاه آقطی سنتز شد. نانوذرات نقره سنتز شده فعالیت ضد میکروبی بالایی، از خود نشان دادند.

واژه های کلیدی: فعالیت ضد میکروبی، نانوذرات نقره، گیاه آقطی، بیوستتر

*نویسنده مسئول: گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

Email: omid_aziziyan@yahoo.com

مقدمه

با توجه به استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک ها و افزایش مقاومت در باکتری ها، یافتن جایگزین های مناسب برای آنتی بیوتیک ها امری ضروری می باشد. به همین دلیل مطالعات گسترده ای در مورد پتانسیل استفاده از ترکیبات ضد میکروبی موجود در گیاهان و نیز استفاده از نانوذرات برای کنترل و درمان عوامل بیماری زا صورت گرفته است (۱). فناوری نانو اصطلاحاً به طراحی، بررسی خصوصیات، تولید و استفاده از ساختارها و ابزارها با کنترل شکل و اندازه در مقیاس نانومتریک (۱۰۰-۱ نانومتر) اطلاق می شود (۲). به طور کلی روش های شیمیایی، فیزیکی و زیستی را می توان روش های متداول تولید نانوذرات نام برد (۳). در سال های اخیر استفاده از روش های زیستی مانند استفاده از قارچ ها (۴)، باکتری ها (۵) و عصاره گیاهان (۶) به دلیل ساده بودن، کم هزینه بودن، داشتن راندمان بالا، غیر سمی و سازگار با محیط زیست بودن توجه ویژه ای را نسبت به سایر روش ها به خود جلب کرده است (۷). در این بین، گیاهان به علت فراوانی و عدم نیاز به شرایط و مواد غذایی خاص برای رشد، گزینه ای مناسب برای سنتز سبز نانوذرات محسوب می شوند (۸). کامل بودن واکنش، کم بودن زمان واکنش، تولید نانوذرات با اشکال مختلف و یکنواخت بودن اندازه آن ها از دیگر مزایای استفاده از گیاهان برای سنتز نانوذرات محسوب می شود (۹،۱۰). در میان نانو مواد و نانوذرات، نانوذرات نقره به دلیل ویژگی وابسته به اندازه شان توجه ویژه ای را به خود جلب کرده اند که از جمله آن ها می توان به خواص نوری، شیمیایی، الکتریکی، کاتالستی و ضد میکروبی اشاره نمود (۱۱،۱۲). نانوذرات نقره تولید شده با روش زیستی دارای ویژگی های مفیدی مانند میزان سطح بالا، اندازه کوچک و پراکندگی بالا می باشند که مجموعه این عوامل سبب شده تا اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره در مقایسه با نقره افزایش چشمگیری داشته باشد (۱۳).

با توجه به افزایش اثرات ضد میکروبی نقره در مقیاس نانو، می توان از نانوذرات نقره برای مبارزه با عوامل بیماریزای مختلف استفاده نمود به طوری که امروزه با توسعه علم نانوتکنولوژی و تولید نانوذرات

نقره، این نانوذرات کاربردهای فراوانی در علوم مختلف مانند پزشکی، داروسازی، آرایشی و بهداشتی پیدا کرده اند (۱۴) و استفاده از نقره و نانوذرات آن به عنوان ماده باکتری کش قدرتمند، رونق یافته است. البته اخیراً از نانوذرات نقره علاوه بر یک عامل ضد میکروبی، در ردیابی DNA نیز استفاده شده است (۱۵،۱۶).

خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره و استفاده مفید از آن در بیوتکنولوژی و مهار اختصاصی میکروب ها در مطالعات مختلفی بررسی و به اثبات رسیده است، به طوری که نانوذرات نقره می توانند با مهار سیستم تنفسی باکتری ها بر متابولیسم و نیز فرآیندهای تولید مثل میکروارگانیسم ها اثرگذار باشند (۱۷) و باعث ایجاد آسیب هایی در غشای سلولی باکتری ها گردند (۱۸).

مطالعات متعددی، سنتز نانوذرات نقره با استفاده از گیاهان را به اثبات رسانیده اند. Gardea-Torresdey و همکاران در سال ۲۰۰۳ برای اولین بار تولید نانوذرات نقره توسط گیاهان را گزارش کرده اند (۱۹). هم چنین گیاهان *Camellia*، *Chenopodium album*، *Rhus coriaria* و *sinensis* توانستند یون های نقره را در اندازه های زیر ۵۰ نانومتر احیاء کنند (۲۰-۲۲). نانوذرات نقره سنتز شده از *Garlic* و *Pinus eldarica* با اندازه های به ترتیب ۴۰-۱۰ و ۳۰-۲۰ نانومتر خاصیت ضد میکروبی خوبی نسبت به برخی از باکتری ها از خود نشان دادند (۲۳،۲۴). اخیراً سنتز نانوذرات نقره از میوه بلوط و فعالیت ضد میکروبی نسبتاً خوب آن علیه عفونت های های بیمارستانی گزارش شده است (۲۵).

پژوهش حاضر به مطالعه پتانسیل بالای برگ گیاه آقطی در بیوسنتز نانوذرات نقره و تاثیر آن بر روی چند گونه باکتری و قارچ های بیماری زای انسانی می پردازد.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی و میکروارگانیسم های مورد استفاده: تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده، با خلوص بالا تهیه شدند. نمک نترات نقره ($AgNO_3$)، هیدروکلریک اسید (HCl) و سدیم هیدروکسید ($NaOH$) از شرکت مرک (MERCK, Germany) و میکروارگانیسم های استفاده شده شامل باکتری های استافیلوکوکوس

اورئوس (PTTC 1112)، باسیلوس سرئوس (PTTC 1154)، اشرشیاکلی (PTTC 1399)، سودوموناس آئروژینوزا (PTTC 1707) و قارچ های اسپریلوس نایجر (PTTC 5012) و کاندیدا آلبیکنس (PTTC 5027) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران (IROST) تهیه شدند. برای محلول سازی و شستشو از آب دوبار تقطیر استفاده شد.

آماده سازی عصاره: گیاه آقطی با نام علمی *Sambucus ebulus* L. و نام محلی پَلَم، متعلق به خانواده کاپریفولیاسه و تیره پیچ امین الدوله از شهرستان بابلسر در استان مازندران جمع آوری شد (شکل شماره ۱). مقداری از برگ تازه آن پس از شستشو با آب دوبار تقطیر، به دور از نور خورشید و در درجه حرارت اتاق خشک شد. سپس بخش های خشک شده توسط آسیاب برقی پودر گردید. جهت عصاره گیری برای سنتز نانوذرات نقره، ۱ گرم از پودر

حاصل با ۱۰۰ میلی لیتر از آب دوبار تقطیر به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد در حمام آب گرم قرار گرفت. پس از خنک شدن، توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف شد. برای حذف کامل ذرات معلق موجود در عصاره، نمونه توسط سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی گیاه، ۱۰ گرم از پودر گیاه با ۱۰۰ میلی لیتر از آب دوبار تقطیر مخلوط و پس از ۲۴ ساعت، عمل فیلتراسیون مطابق مرحله قبل انجام گرفت. پس از تخلیص و حلال زدایی، از عصاره آبی حاصل غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر با حلال ۵ درصد DMSO برای استفاده در آزمایش انتشار چاهکی و تعیین MIC تهیه گردید. محلول های حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.



شکل شماره ۱. برگ گیاه آقطی (*Sambucus ebulus* L.)

سنتز اولیه نانوذرات نقره: جهت سنتز نانوذرات نقره، ۲ میلی لیتر از عصاره به ۴ میلی لیتر از محلول ۱ میلی مولار نیترات نقره در دمای آزمایشگاه اضافه شد. مشاهده شد که رنگ محلول به سمت قهوه ای تغییر رنگ داده است که این خود نشان دهنده تشکیل نانوذرات نقره می باشد. از محلول مورد نظر، توسط

دستگاه اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی (UV-Vis spectroscopy, Jenway 6715) طیف گیری شد. بررسی پارامترهای موثر بر سنتز نانوذرات نقره تاثیر pH جهت بررسی تاثیر pH و بهینه سازی آن، ۸ سری محلول حاوی ۲ میلی لیتر عصاره و ۴ میلی لیتر محلول نمک نیترات نقره با غلظت ۱ میلی

بررسی فعالیت ضد میکروبی: نمونه های میکروبی با استفاده از محیط کشت لوریا برتانی و سابورد دکستروز و بر اساس روش های استاندارد احیاء گردیدند و به منظور سوسپانسیون میکروبی از کشت ۲۴ ساعته هر میکروارگانیسم به صورت مجزا به لوله های آزمایش حاوی ۳ میلی لیتر مولر هینتون برات تلقیح شد و سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک فارلند آماده گردید.

بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره آبی گیاه آقطی ابتدا با روش انتشار از چاهک در آگار (NCCLS 2006) انجام شد (۲۶). بدین منظور از سوسپانسیون هر میکروب به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار برای باکتری ها و سابورد دکستروز آگار برای قارچ ها ریخته و با سوآپ استریل در سه جهت به صورت انبوه کشت داده شد. سپس در سطح هر یک از پلیت های کشت داده شده چاهک هایی به قطر تقریباً ۶ میلی متر و به فاصله ۲ سانتی متری از هم ایجاد گردید و درون هر چاهک مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر یک از رقت های آماده شده عصاره آبی با سمپلر ریخته شد. از آنتی بیوتیک های ضد باکتریایی آمپی سیلین و جنتامیسین و ضد قارچی کلوتریمازول به عنوان شاهد مثبت و از محلول DMSO به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. پس از اتمام کار محیط های کشت باکتریایی در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت و کشت های قارچی در انکوباتور ۲۸ درجه به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گشت و در نهایت پس از گذشت ۲۴-۴۸ ساعت، کشت های میکروبی از نظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفته و قطر هاله های تشکیل شده بر حسب میلی متر اندازه گیری و گزارش شد.

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره مورد نظر، از روش رقت لوله ای استفاده گردید. بدین منظور از عصاره آبی آماده شده در لوله های آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون برات سری رقت های ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. سپس به هر یک از لوله ها ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده تلقیح گردید. یک لوله آزمایش

مولار ساخته و pH آن ها به ترتیب در (۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹) تنظیم شد. از تمامی نمونه ها طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته و در نهایت pH بهینه انتخاب شد. برای تنظیم pH از یکی از دو محلول سدیم هیدروکسید یا هیدروکلریک اسید با غلظت ۰/۱ مولار استفاده شد.

تاثیر مقدار حجم عصاره: جهت بررسی تاثیر مقدار حجم عصاره مصرفی و بهینه سازی آن، مقادیر ۱ تا ۵ میلی لیتر از عصاره به ۴ میلی لیتر از نمک نیترات نقره با غلظت ۱ میلی مولار افزوده و pH آن برابر pH بهینه تنظیم و از تمامی محلول های حاصل طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته شد و در نهایت حجم بهینه انتخاب گردید.

تاثیر غلظت نمک نقره نیترات: برای بررسی تاثیر غلظت یون نقره بر سنتز نانوذرات نقره و بهینه نمودن آن، مقدار بهینه شده از حجم عصاره به ۴ میلی لیتر از محلول نمک نیترات نقره با غلظت های (۱، ۲، ۳، ۴ و ۵) میلی مولار افزوده و pH واکنش برابر pH بهینه تنظیم شد. از تمامی محلول ها طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته و غلظت بهینه انتخاب شد.

تاثیر دما: جهت بررسی تاثیر افزایش دما بر سنتز نانوذرات نقره و بهینه نمودن آن، محلول هایی با اعمال تمامی شرایط پیشین ساخته و به صورت جداگانه در دمای ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی گراد (در حمام آب گرم) قرار داده و طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی تمامی آن ها گرفته شد و دمای بهینه انتخاب گردید.

تاثیر زمان: جهت بررسی اثر زمان بر سنتز نانوذرات نقره و بهینه نمودن آن، محلول حاصل از اعمال تمامی شرایط بهینه شده در زمان های مختلف (از لحظه مخلوط واکنشگرها تا ۳ ساعت پس از آن) ساخته و از هر کدام به صورت مجزا طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته و زمان بهینه انتخاب شد.

مشخصه یابی نانوذرات نقره سنتز شده: برای تایید نتایج به دست آمده از طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی، اندازه و شکل نانوذرات سنتز شده توسط تکنیک های پراش پرتو ایکس (Bruker-D8 advance) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (Zeiss EM10C) مورد بررسی قرار گرفت.

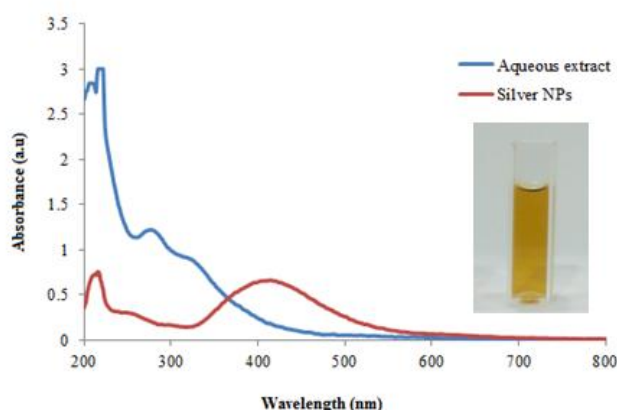
حاوی محیط کشت و میکروب تلقیح شده ولی فاقد عصاره به عنوان شاهد مثبت و لوله آزمایش حاوی محیط کشت با رقت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره ولی فاقد باکتری به عنوان شاهد منفی نیز آماده گردید و در نهایت تمامی لوله های آزمایش به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه برای باکتری ها و دمای ۲۸ درجه برای قارچ ها و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انتقال داده شدند. بعد از انکوباسیون، هر لوله از نظر کدورت حاصل از رشد میکروارگانیسم بررسی و کمترین رقتی که در آن به علت اثر مهارکنندگی عصاره کدورتی ایجاد نشده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد (۲۷).

برای بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی نانوذرات نقره سنتز شده نیز از روش های انتشار چاهکی و تعیین MIC استفاده شد. سری رقت های استفاده شده برای تعیین هاله عدم رشد در روش انتشار از چاهک ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود و محلول ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر نیترات نقره و آنتی بیوتیک ضد باکتریایی جنتامیسین و آنتی بیوتیک ضد قارچی کلوتریمازول به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. برای تعیین MIC نیز برای هر باکتری و قارچ یک سری ۱۰ لوله ای با رقت های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶، ۰/۷۸ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذرات نقره استفاده گردید و به عنوان کنترل مثبت از لوله حاوی فقط

محیط کشت همراه با میکروب تلقیح شده به کار گرفته شد و برای کنترل منفی و به منظور اطمینان از استریل بودن مراحل انجام کار و نیز سوسپانسیون نانوذرات نقره سنتز شده، درون یک لوله تنها محیط کشت و در لوله دیگری محیط کشت حاوی محلول با غلظت نیم میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات نقره اضافه گردید. سایر مراحل انجام کار همانند نحوه آماده سازی محیط های کشت، سویه های میکروبی استفاده شده و روش انجام، مشابه روش های استفاده شده در آزمایش مربوط به عصاره آبی گیاه بوده است.

یافته های پژوهشی

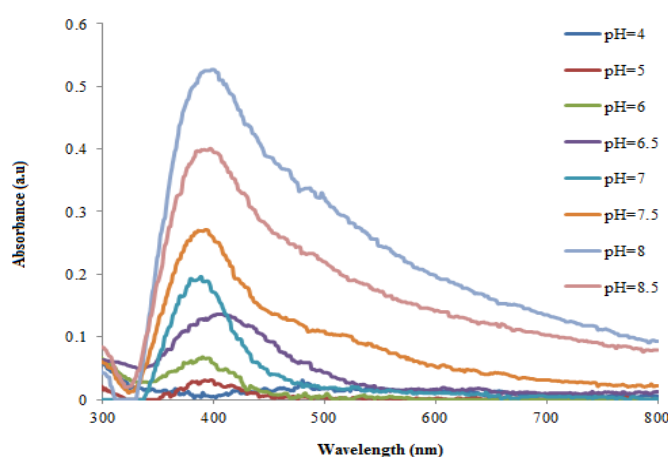
بهینه سازی پارامترهای مؤثر بر سنتز نانوذرات: در سنتز اولیه نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه، به عنوان عوامل احیاء کننده و پایدارکننده نقش ایفا می کند. شکل شماره ۲ طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی و تغییر رنگ محلول نانوذرات نقره بدون اعمال شرایط بهینه را نشان می دهد. با توجه به شکل شماره ۲، در طول موج ۴۰۵ نانومتر که مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات نقره می باشد، عصاره فاقد پیک می باشد که این خود نشان دهنده آن است که وجود پیک در طول موج مورد نظر، تنها به دلیل سنتز و وجود نانوذرات نقره می باشد و عصاره هیچ گونه تداخل احتمالی در طیف حاصل از نانوذرات نقره ایجاد نخواهد کرد.



شکل شماره ۲. طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی عصاره و نانوذرات نقره سنتز شده

در جذب ملاحظه نشده به طوری که می توان گفت، سنتزی در این pH انجام نگرفته است. اما با افزایش تدریجی میزان pH محلول تا ۸، جذب محلول به صورت چشمگیری افزایش یافته است که مربوط به افزایش در مقدار سنتز نانوذرات نقره است. در $pH=8$ ، طیفی متقارن با بیشترین مقدار جذب نسبت به سایر pH ها، مشاهده شده است اما در pH بالاتر ($pH=8/5$) افت شدیدی در میزان جذب ملاحظه شده است. در نتیجه مقدار $pH=8$ به عنوان pH بهینه انتخاب شد.

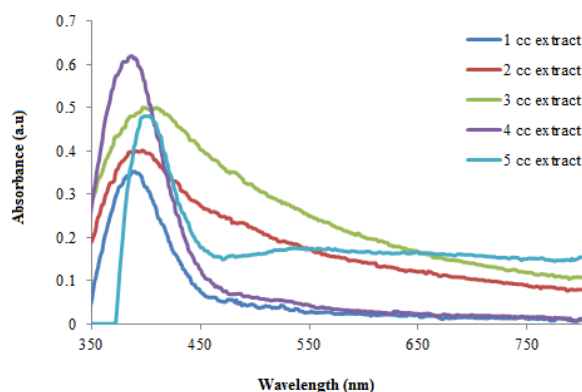
در بررسی تاثیر pH، پس از مخلوط کردن ۲ میلی لیتر عصاره و ۴ میلی لیتر از نمک نیترات نقره با غلظت ۱ میلی مولار، مشاهده شد که رنگ محلول به رنگ قهوه ای متمایل شده است (شکل شماره ۲). که این رنگ دلیلی بر سنتز موفق این نانوذرات می باشد. مقدار pH محلول حاصل توسط دستگاه pH متر، عدد ۵/۲۸ اندازه گیری شد. به منظور مطالعه بر روی تاثیر فاکتور مهم pH بر سنتز نانوذرات، pH های بالاتر و کمتر از مقدار اولیه مورد بررسی قرار گرفت (شکل شماره ۳). شکل شماره ۳ نشان می دهد که در $pH=4$ تغییری



شکل شماره ۳. طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره در pH های متفاوت

(۴). این افزایش تا ۴ میلی لیتر از عصاره ادامه دارد اما در ۵ میلی لیتر از آن، افت شدیدی در میزان جذب مشاهده شده است. در نتیجه میزان ۴ میلی لیتر از عصاره به عنوان حجم بهینه انتخاب شد.

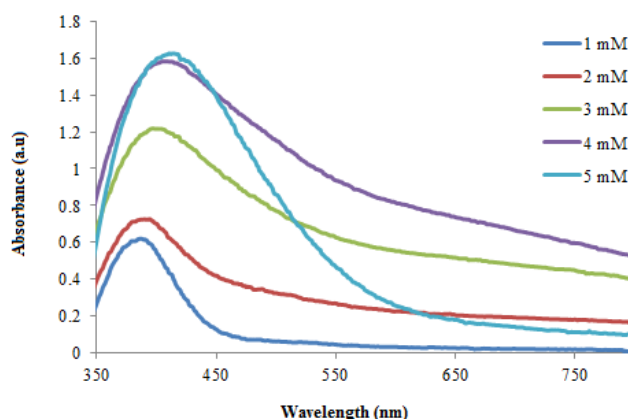
در بررسی تاثیر میزان عصاره بر سنتز نانوذرات نقره، ملاحظه شد که با افزایش میزان عصاره جذب مربوط به نانوذرات نقره افزایش چشمگیری داشته است که این خود نشان دهنده افزایش در میزان سنتز نانوذرات با افزایش میزان عصاره می باشد (شکل شماره



شکل شماره ۴. طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره در حجم های متفاوت از عصاره

مولار ادامه دارد اما در غلظت بیشتر از آن (۵ میلی مولار)، افزایش قابل ملاحظه ای در مقدار جذب مربوط به نانوذرات دیده نشد. در نتیجه مقدار غلظت ۴ میلی مولار از نمک نیترات نقره به عنوان غلظت بهینه انتخاب شد.

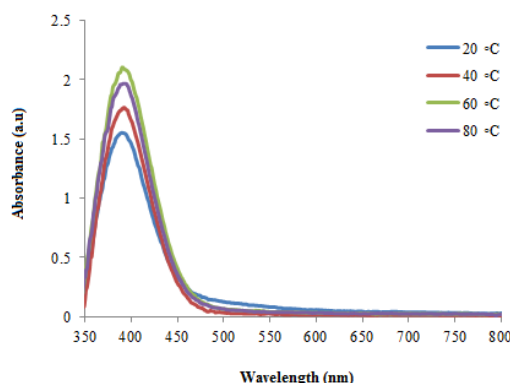
شکل شماره ۵، تاثیر غلظت یون فلزی بر سنتز نانوذرات را نشان می دهد. با توجه به شکل شماره ۵، ملاحظه شد که با افزایش تدریجی در میزان غلظت یون نقره، جذب مربوط به نانوذرات نقره افزایش چشمگیری داشته است. این افزایش تا غلظت ۴ میلی



شکل شماره ۵. طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره در غلظت های متفاوت یون نقره

دیده شده است (شکل شماره ۶). در نتیجه با افزایش بیش از حد دما، سنتز نانوذرات کاهش خواهد یافت. لذا دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به عنوان دمای مطلوب انتخاب شد.

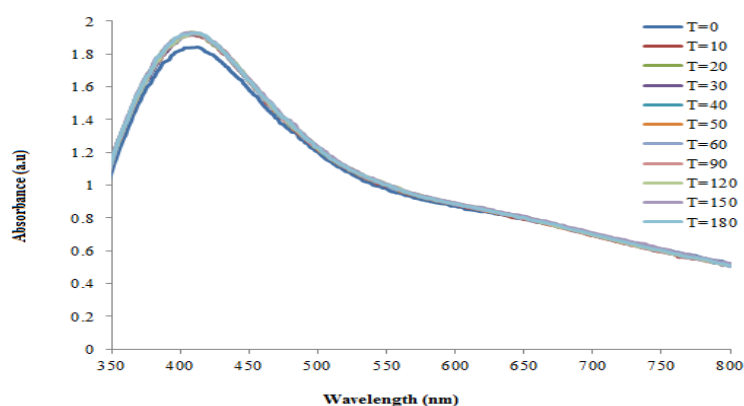
در بررسی تاثیر دما در سنتز نانوذرات نقره، مشاهده شد که با افزایش تدریجی دما، میزان جذب به صورت محسوسی افزایش یافته است. اما این روند افزایش تا دمای ۶۰ درجه سانتی گراد بوده و در دمای بعد از آن (۸۰ درجه سانتی گراد)، کاهش قابل توجهی در جذب



شکل شماره ۶. طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره در دماهای متفاوت

۱۰ دقیقه به بعد، تغییر محسوسی در مقدار این جذب مشاهده نشده است که این مشاهده، پایدار بودن نانوذرات حاصل را ثابت می کند. در نتیجه، زمان ۱۰ دقیقه به عنوان زمان بهینه انتخاب شد (شکل شماره ۷).

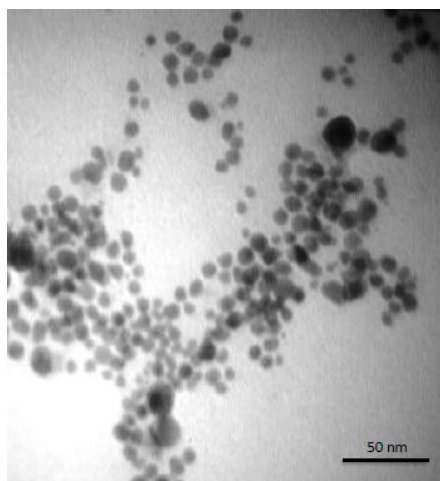
نتایج بررسی تاثیر زمان مجاورت محلول نیترات نقره با عصاره گیاه بر روند واکنش نشان می دهند که با افزایش زمان برهمکنش میان واکنشگرها از لحظه اول، مقدار جذب اندکی افزایش می یابد، اما از زمان



شکل شماره ۷. طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره در زمان های متفاوت

عبوری نانوذرات نقره سنتز شده با اعمال تمامی شرایط بهینه شده را نشان می دهد. تصویر نشان می دهد که نانوذرات به دست آمده همگی تقریباً کروی بوده و اندازه متوسط آن ها بین ۸-۱۲ نانومتر بوده است.

بررسی تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM): توزیع شکل و اندازه نانوذرات نقره سنتز شده توسط تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی شد. شکل شماره ۸ تصویر میکروسکوپ الکترونی



شکل شماره ۸. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات نقره سنتز شده

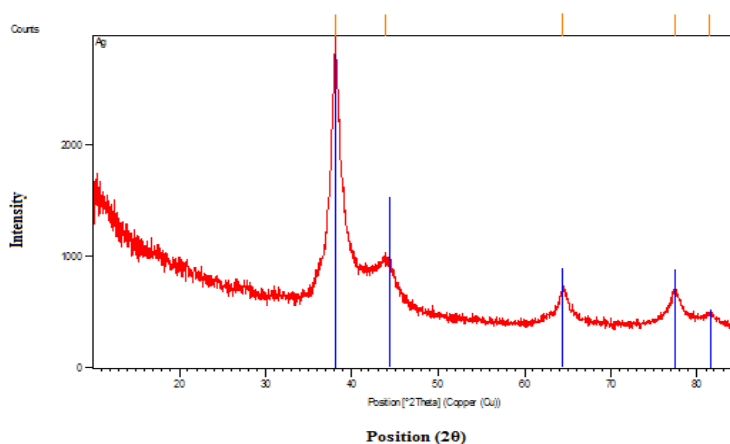
ساختاری نشان می دهد که نانوذرات نقره دارای ساختار بلوری با شاخص های میلر (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱) و در شبکه مکعبی می باشد. وجود قله های تیز در الگوها نشان دهنده درجه بالایی از بلورینگی برای نانوذرات می باشد. پیک (۱۱۱) از سایر پیک ها شدیدتر است در نتیجه صفحات بلوری نانوذرات نقره بیشتر در این جهت تشکیل شده اند. میانگین اندازه دانه های بلوری سنتز شده با محاسبه فرمول دبای-شرر ۱۱/۶۵-۸/۸۷ نانومتر برآورد شدند که با نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری و نتایج به دست آمده از بررسی طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی کاملاً مطابقت دارد.

بررسی طیف پراش پرتو ایکس (XRD): برای بررسی بیشتر و مطالعه ساختار بلوری نانوذرات نقره سنتز شده، از آنالیز پراش پرتو ایکس استفاده شد (شکل شماره ۹). میانگین اندازه دانه های بلوری با محاسبه پهنای پیک های تشکیل شده در نمونه ها با استفاده از فرمول دبای-شرر (فرمول ۱)، برآورد شد:

$$D = 0.9\lambda / \beta \cos \theta$$

فرمول ۱:

که β ، پهنای پیک ها در نصف ارتفاع ماکزیمم، λ طول موج اشعه X برابر با ۱/۵۴ نانومتر، θ زاویه بین پرتو باز تابش و تابش و D اندازه دانه های بلوری می باشد. در نواحی ۳۸/۱۷ و ۴۴/۳۷، ۶۴/۵۶، ۷۷/۵۵ 2θ نانوذرات طلا پیک های شارپ و تیزی را نشان می دهند که دلیلی بر سنتز موفق نانوذرات می باشد. آنالیز



شکل شماره ۹. تصویر پراش پرتو ایکس نانوذرات نقره سنتز شده

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره گیاه: نتایج بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره آبی گیاه آقطی نشان داد، عصاره اثر مهارکنندگی قابل توجهی بر روی همه باکتری ها و قارچ ها دارد که با افزایش غلظت عصاره این اثر بازدارندگی و قطر هاله عدم رشد نیز بیشتر می شود. نتایج حاصل از تاثیر غلظت های مختلف عصاره آبی گیاه آقطی با روش انتشار چاهکی در جدول شماره ۱ نشان داده شده که حساسیت بیشتر باکتری های گرم مثبت نسبت به

باکتری های گرم منفی و نیز قارچ ها مشخص است. جدول شماره ۲ نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره آبی گیاه آقطی علیه میکروب های منتخب به روش رقت لوله ای را نشان می دهد. بیشترین حساسیت را در بین باکتری های مورد آزمایش، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (۱۲/۵ MIC) و در بین قارچ ها، کاندیدا آلیکنس (۶/۲۵ MIC) و کمترین حساسیت به عصاره را باکتری سودوموناس آئروژینوزا (۱۰۰ MIC) دارند.

جدول شماره ۱. قطر هاله عدم رشد میکروبی در غلظت های مختلف عصاره آبی گیاه آقطی با روش انتشار از چاهک (بر حسب میلی متر)

میکروارگانیسم	غلظت های مختلف عصاره آبی (میلی گرم بر میلی لیتر)							
	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	آمی سیلین	جنتامیسین	کلوتریمازول
استافیلوکوکوس اورئوس	۹	۱۰	۱۲	۱۵	۱۸	۲۳	۲۶	—
باسیلوس سرئوس	۸	۱۰	۱۳	۱۶	۱۸	۲۵	۲۵	—
اشرشیا کلی	۷	۸	۱۱	۱۳	۱۵	۲۴	۲۵	—
سودوموناس آئروژینوزا	۰	۷	۹	۱۳	۱۴	۲۳	۲۴	—
آسپرژیلوس نایجر	۹	۱۱	۱۳	۱۶	۱۹	—	—	۲۵
کاندیدا آلیکنس	۹	۱۰	۱۳	۱۵	۱۸	—	—	۲۷

جدول شماره ۲. حداقل غلظت مهار کننده رشد میکروب (MIC) در غلظت های مختلف عصاره آبی گیاه آقطی (بر حسب میلی گرم/میلی لیتر)

میکروارگانیسم ها	غلظت های مختلف عصاره آبی (میلی گرم بر میلی لیتر)						
	۱/۵۶	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	-	-	-	-
باسیلوس سرئوس	+	+	+	+	-	-	-
اشرشیا کلی	+	+	+	+	+	-	-
سودوموناس آئروژینوزا	+	+	+	+	+	+	-
آسپرژیلوس نایجر	+	+	+	-	-	-	-
کاندیدا آلیکنس	+	+	-	-	-	-	-

بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه آقطی: نتایج تست های ضد میکروبی مربوط به نانوذرات نقره سنتز شده با روش های انتشار چاهکی و تعیین MIC به ترتیب در جدول شماره ۳ و ۴ ارائه شده است. نانوذرات سنتز شده اثر میکروب کشی چشمگیری بر روی نمونه های مورد آزمایش نشان دادند، به طوری که در غلظت های بسیار پایین از رشد باکتری ها و قارچ ها جلوگیری کردند و این در حالی است که عصاره آبی گیاه در غلظت های استفاده شده مربوط به نانوذرات، فاقد هر گونه اثر ضد

میکروبی بوده و هم چنین اثر ضد میکروبی نقره نیز در مقایسه با نانوذرات نقره بسیار کمتر می باشد. نتایج نشان می دهد که نانوذرات نقره بیشترین تاثیر را روی باکتری اشرشیا کلی (قطر هاله ۲۲ میلی متر و MIC ۳/۱۲ µg/ml) و قارچ آسپرژیلوس نایجر (قطر هاله ۲۱ میلی متر و MIC ۳/۱۲ µg/ml) داشته و کمترین تاثیر را روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (قطر هاله ۱۷ میلی متر و MIC ۲۵ µg/ml) داشته است.

جدول شماره ۳. قطر هاله عدم رشد میکروبی در غلظت های مختلف نانوذرات نقره با روش انتشار از چاهک (بر حسب میلی متر)

میکروارگانیزم	غلظت های مختلف نانوذرات نقره (میکروگرم بر میلی لیتر)					
	۱۰	۲۰	۴۰	۶۰	۱۰۰	کلوتریمازول (۵۰ µg/ml)
استافیلوکوکوس اورئوس	۰	۷	۱۲	۱۴	۱۷	۲۵
باسیلوس سرئوس	۷	۹	۱۱	۱۴	۱۸	۲۴
اشرشیا کلی	۹	۱۱	۱۴	۱۷	۲۲	۲۳
سودوموناس آئروژینوزا	۸	۱۱	۱۳	۱۷	۲۰	۲۵
آسپرژیلوس نایجر	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱	۲۶
کاندیدا آلبیکنس	۹	۱۱	۱۴	۱۷	۲۰	۲۵

جدول شماره ۴. حداقل غلظت مهار کننده رشد میکروب (MIC) در غلظت های

مختلف نانوذرات نقره (بر حسب میکروگرم/میلی لیتر)

میکرو ارگانیزم ها	غلظت های مختلف نانوذرات نقره (میکروگرم بر میلی لیتر)									
	۰/۷۸	۱/۵۶	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
باسیلوس سرئوس	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
اشرشیا کلی	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
سودوموناس آئروژینوزا	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
آسپرژیلوس نایجر	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
کاندیدا آلبیکنس	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

بحث و نتیجه گیری

نانوذرات، از آن جا که پلی بین حالت حجیم ماده و حالت اتمی یا مولکولی هستند، مورد توجه قرار گرفته اند (۲۸). نانوذرات فلزی به خاطر خصوصیات جالب توجه الکتریکی، اپتیکی، شیمیایی و مغناطیسی که از خود نشان داده اند، مورد بررسی های فراوان قرار گرفته اند (۲۹). گیاه آقطی یکی از گیاهان دارویی، خودرو و بومی در شمال ایران می باشد که به وفور در استان های گلستان، مازندران و گیلان یافت می شود. در بیوسنتز نانوذرات فلزی بر پایه احیای زیستی، عصاره گیاه به عنوان احیاء کننده و پایدارکننده استفاده می شود. پژوهش های متعددی فعالیت آنتی اکسیدانی بالای برگ این گیاه را گزارش کرده اند (۳۰). بنا بر این بررسی پتانسیل عصاره برگ آقطی می تواند راهکاری برای استفاده موثر از آن و روشی ارزان و زیست سازگار برای تولید نانوذرات باشد. بررسی انجام شده در این تحقیق نشان داد که عصاره برگ آقطی پتانسیل بالایی برای تولید نانوذرات نقره دارد. تولید نانوذرات به این روش به صورت یک مرحله ای و مقرون به صرفه بوده

در زمان بسیار کم، فرآیند تکمیل می شود. تغییر در رنگ محلول از شفاف به قهوه ای و هم چنین افزایش میزان جذب محلول به دلیل احیاء یون نقره و تجمع آن ها به صورت نانوذرات نقره می باشد.

در بررسی های فاکتورهای موثر بر سنتز نانوذرات نقره، pH یکی از مهم ترین فاکتورهای موثر بر سنتز نانوذرات نقره می باشد (۳۱). پیش از این گزارش هایی مبنی بر تاثیر pH بر روی چگونگی تشکیل نانوذرات به ثبت رسیده است. گزارش ها حاکی از آن است که pH بر روی شکل نانوذرات تاثیر چشمگیری نداشته و تنها اندازه آن ها را به میزان زیاد تحت تاثیر قرار می دهد (۳۲، ۳۳). در بررسی این عامل، گزارشات نشان می دهد که در pH های خیلی بالا، یون های نقره هیدرولیز شده، به گونه ای که موجب به وجود آمدن گونه های پایدار هیدروکسیدهای یون نقره می شود و در انتها از ورود این یون ها به واکنش احیای زیستی ممانعت می شود (۳۴). پهن شدن طیف های جذبی در pH های بیشتر، بدین علت است که در اسیدیت های بالاتر نانوذراتی با اندازه بزرگ تر (به علت اتصال ذرات

ریز تر به هم) به وجود خواهد آمد که این اتفاق موجب پهن شدن تقریبی طیف ها می شود. پهن شدن طیف ها در اثر افزایش اندازه نانوذرات، پیش از این گزارش شده است (۳۵). بدین دلیل اسیدیت ۸ به عنوان بهینه pH انتخاب شد. همان طوری که قبلاً اشاره شد، در سنتز زیستی نانوذرات توسط گیاهان، گیاه نقش احیاء کردن یون های فلزی و هم چنین تثبیت کردن این نانوذرات را ایفا می کند (۳۶). گیاه آقطی نیز دارای ترکیبات طبیعی فراوانی چون ترکیبات آنتی اکسیدانی، فنل ها، فلاونوئیدها و... می باشد (۳۷)، که تمامی این ترکیبات در احیای یون های فلزی و تبدیل آن ها به اتم های فلزی در ابعاد نانومتریکی و پایدار کردن نانوذرات سنتز شده نقش مهمی دارند. مطالعات نشان می دهند که، در غلظت های کمتر از میزان بهینه عامل احیاء کننده و پایدار کننده، عمل احیاء کنندگی و پایدارسازی نانوذرات به صورت کامل اتفاق نیافتاده و نانوذرات به میزان کمتر و با اندازه درشت تری به دست می آید. هم چنین با افزودن مقدار بیشتر از میزان بهینه، ذرات پایدارکننده به دور خود بیشتر تجمع کرده که این عمل موجب می گردد پایدارسازی به طور کامل انجام نشده و ذرات با اندازه درشت تری به دست آید. با بی ثبات شدن نانوذرات، از جمعیت نانوذرات پایدار در محیط کم شده و جذب کاهش خواهد یافت. پژوهش ها حاکی از آن است که با افزایش در اندازه نانوذرات، میزان جذب کاهش یافته و متقابلاً با افزایش در توزیع ذرات، پهنای طیف ها افزایش می یابد (۳۸، ۳۹). در نتیجه میزان ۴ میلی لیتر از عصاره به عنوان حجم مناسب برای احیای یون های نقره انتخاب شد. پژوهش های متعددی تاثیر غلظت یون فلزی بر سنتز نانوذرات را اثبات کرده اند. مطالعات نشان می دهد با افزایش غلظت یون فلز، جذب مشاهده شده نیز افزایش می یابد که این پدیده بدین علت است که با افزایش مقدار یون فلز، یون های بیشتری احیاء شده و نتیجتاً نانوذرات بیشتری تولید خواهد شد (۴۰). اما کاهش بیش از حد یا افزایش نامحسوس در مقدار جذب مربوط به نانوذرات در اثر افزایش بیش از اندازه غلظت یون نقره، می تواند به دلیل چسبندگی نانوذرات و سنتز نانوذراتی با اندازه بزرگ تر باشد (۴۱). با توجه به دلایل ذکر شده

غلظت ۴ میلی مولاری از یون نقره به عنوان غلظت مناسب انتخاب شد. هم چنین مطالعات حاکی از آن است که دما تاثیر به سزایی بر میزان جذب و اندازه نانوذرات سنتز شده دارد. مشاهدات نشان می دهد که با افزایش دمای محیط واکنش، مقدار جذب خوانده شده افزایش یافته، اما اندازه نانوذرات کاهش خواهد یافت (۴۲). افزایش دما، احتمال و سرعت برخورد مولکول های احیاء کننده و تثبیت کننده با یون های فلزی را افزایش می دهد به صورتی که بلافاصله پس از عمل احیاء و تثبیت، فرصتی برای اتصال نانوذرات سنتز شده به یکدیگر و تولید نانوذرات با اندازه درشت تر وجود نخواهد داشت (۴۳). اما کاهش در میزان جذب به دلیل افزایش بیش از حد دما می تواند به دلیل تجزیه و یا از بین رفتن تمامی و یا بخشی از ترکیبات احیاء کننده و پایدارکننده در عصاره گیاه باشد. مطالعات پیشین، تخریب ترکیبات موجود در گیاه در اثر افزایش بیش از حد دما را به اثبات رسانیده اند (۴۴). در نتیجه مناسب ترین شکل و اندازه نانوذرات نقره در این روش در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به دست خواهد آمد. زمان نیز همانند فاکتورهای مورد بحث، تاثیر به سزایی در سنتز و پایدار بودن نانوذرات دارد (۴۵)، به طوری که در واکنش های این چنینی، اگر سنتز کامل انجام نشده باشد، با گذشت زمان تولید نانوذرات بیشتر خواهد بود. هم چنین عامل زمان، مهم ترین فاکتور برای اثبات پایداری نانوذرات سنتز شده می باشد. به گونه ای که اگر با گذشت زمان، افزایش قابل توجه ای در میزان جذب نانوذرات نقره ملاحظه نشود، می توان این گونه استنباط کرد که نانوذرات حاصل با گذر زمان کاملاً پایدار هستند. با توجه به دلایل عنوان شده، واکنش احیای یون های نقره توسط عصاره آبی برگ آقطی در ۱۰ دقیقه کامل شده است.

در سالیان اخیر مقاومت گسترده باکتری ها به آنتی بیوتیک ها سبب شد تا محققین به دنبال راهکاری مناسب برای کشف مواد جایگزین آنتی بیوتیک ها باشند. در سال ۱۹۶۰ از نیترا نقره ۵ درصد برای درمان سوختگی ها استفاده می شد (۴۶) و با پیشرفت علم در حوضه نانوتکنولوژی در سال ۲۰۰۴ با بررسی اثرات نانوذرات نقره بر روی باکتری E.coli، این

نانوذرات را به عنوان عامل ضد میکروبی جدید معرفی کردند (۴۷). نانوذرات دارای نسبت سطح به حجم بسیار زیادی هستند و در مورد نقره به طور خاص، این افزایش سطح باعث شده که یک گرم نانوذرات نقره برای کشتن باکتری های صد متر مربع از یک سطح کافی باشد. ویژگی نانوذرات نقره از لحاظ شکل و اندازه باعث شده که این نانوذرات بتوانند با تخریب غشاء فعالیت ضد میکروبی بالایی از خود نشان دهند (۴۸) و مجموعه این خصوصیات باعث کاربرد فراوان نانوذرات نقره در پزشکی و بهداشت مانند ضد عفونی کردن آب های آشامیدنی، استفاده در فیلترهای کربنی و از بین بردن میکروب های هوا شده است. هم چنین این نانوذرات امروزه به عنوان پوشش های ضد میکروب در تجهیزات پزشکی و نیز تولید ژل های ضد میکروب در درمان سوختگی ها استفاده می شوند (۴۹،۵۰).

در این پژوهش فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی گیاه آقطی و نیز نانوذرات نقره تهیه شده توسط عصاره این گیاه بر روی ۴ باکتری و ۲ قارچ صورت گرفت و مشخص شد که نانوذرات در غلظت های مربوطه اثرات ضد میکروبی بسیار قوی تری نسبت به خود عصاره و محلول نقره دارا می باشند. البته میزان فعالیت ضد میکروبی هم در عصاره و هم در محلول های نانوذرات وابسته به غلظت بود. الگوهای مقاومت باکتری ها در برابر عصاره، حساسیت بیشتر باکتری های گرم مثبت را نسبت به گرم منفی ها نشان دادند، به طوری که در غلظت های پایین ۲۵ mg/ml، باکتری های گرم منفی برخلاف گرم مثبت رشد کرده و مقاوم بودند. البته با افزایش غلظت (بالای ۵۰ mg/ml)، رشد هر دو گروه مهار شد. هم چنین بررسی اثرات ضد قارچی عصاره حساسیت نسبتاً بالای این گروه را به عصاره نشان داد. در بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره تاثیر چشمگیر این نانوذرات بر علیه همه میکروب های مورد آزمایش نشان داده شد که در این بین و بر خلاف عصاره، نانوذرات اثر مهارکننده قابل ملاحظه ای روی باکتری های گرم منفی نسبت به گرم مثبت ها داشتند. خاصیت ضد میکروبی عصاره گیاه آقطی و نانوذرات نقره در مطالعات زیادی بر علیه انواع مختلفی از میکروب های بیماریزای انسانی بررسی و به اثبات

رسیده است. رودینو و همکاران در سال ۲۰۱۵ بیشترین فعالیت ضد میکروبی عصاره آقطی را بر روی *P. fluorescens* و *E. fecalis* اعلام کردند (۵۱). ساندی و همکاران در سال ۲۰۰۴ فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره را روی *E.coli* وابسته به غلظت نانوذرات اعلام کردند (۵۲). در مطالعه دیگری کیم و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که اثرات نانوذرات نقره بر روی *E.coli* بیشتر از *S.aureus* می باشد (۵۳). در گزارشی دیگر شریواستاوا و همکاران در سال ۲۰۰۷ و گوزمان و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره روی باکتری های مختلف مانند *E.coli*، *P.aeruginosa* و *S.aureus* اعلام داشته اند که هر چند فعالیت نانوذرات وابسته به غلظت است ولی برای باکتری های گرم منفی به نسبت گرم مثبت این اثر چشمگیرتر بوده است (۵۴-۵۶). در واقع تفاوت پاسخ باکتری های گرم مثبت و گرم منفی به نانوذرات نقره، به تفاوت موجود در ساختار دیواره سلولی آن ها مربوط می باشد، به طوری که باکتری های گرم منفی دیواره سلولی نازک تر و با استحکام کمتر داشته و نیز وجود لایه ای از لیپوپلی ساکراید در سطح بیرونی شان که سرشار از بارهای منفی است برهمکنش بین نانوذرات نقره که دارای بار مثبت ضعیف می باشند را با این سلول های باکتریایی تسهیل می کند. اتصال نانوذرات به سطح سلول ابتدا دیواره را سوراخ و سپس با ورود نانوذره به داخل سلول باکتری و ایجاد تداخل در مسیرهای مختلف متابولیکی و تولیدمثل در نهایت منجر به مرگ باکتری می شود (۵۷). به طور کلی نتایج این پژوهش پتانسیل بالای عصاره آبی برگ گیاه آقطی را در احیای یون های فلزی و تبدیل آن ها به اتم های فلزی در ابعاد نانومتریکی را نشان می دهد. وجود فعالیت ضد میکروبی بالای عصاره و نانوذرات نقره سنتز شده از آن، استفاده از آن ها را در زمینه های مختلف به منظور پیشگیری از آلودگی و انتشار عوامل بیماری زایی پیشنهاد می کند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت های مالی دانشگاه سیستان و بلوچستان تقدیر و تشکر می شود.

References

1. Panacek A, Kvitek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, et al. Silver colloid nanoparticles synthesis characterization and their antibacterial activity. *J Phys Chem B* 2006; 110:16248-53.
2. Govindaraju K, Tamilselvan S, Kiruthiga V, Singaravelu G. Biogenic silver nanoparticles by *Solanum torvum* and their promising antimicrobial activity. *J Biopest* 2010; 3:394-9.
3. Nanda A, Saravanam M, Hil MP. Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine* 2009; 5:452-6.
4. Gajbhiye M, Kesharwani J, Ingle A, Gade A, Rai M. Fungus mediated synthesis of silver nanoparticles and their activeity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomed* 2009; 5:382-6.
5. Shahverdi AR, Minaeian S, Shahverdi HR, Jamalifar H, Nohi AA. Rapid synthesis of Silver Nanoparticles using culture supernatants of enter bacteria a novel biological approach. *Proc Biochem* 2007; 42:919-23.
6. Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry M. Rapid synthesis of Au Ag and bimetallic Au core Ag shell Nanoparticles using Neem leaf broth. *J Coll Interface Sci* 2002; 275:496-502.
7. Mohasseli T, Pourseyedi Sh. [Green synthesis and characterization of Silver Nanoparticles using seed aqueous extract of Sesame]. *Biotechnol Tarbiat Modares Uni* 2015; 1:10-20. (Persian)
8. Ahmad N, Sharma S, Alam MK, Singh VN, Shamsi SF, Mehta BR, et al. Rapid synthesis of Silver Nanoparticles using dried medicinal plant of basil. *Coll Surf Bio Interfaces* 2010; 81:81-86.
9. Wang Y, He X, Wang K, Zhang X, Tan W. Barbate Skull cup herb extract mediated biosynthesis of gold nanoparticles and its primary application in electrochemistry. *Coll Surf Bio Interfaces* 2009; 73:75-79.
10. Ashiri S, Safari J. [Synthesis of gold and Silver Nanoparticles in plant substrates and their application]. *Nanotechnology* 2013; 186:12-15. (Persian)
11. Zhanjiang Z, Jinpei L. Synthesis and characterization of Silver Nanoparticles by a Sonochemical method. *Rare Metal Mate Eng* 2012; 10:1700-5.
12. Jianrong C, Yuqing M, Nongyue H, Xiaohua W, Sijiao L. Nanotechnology and biosensors. *Biotech Adv* 2004; 22:505-18.
13. 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 Mol Biomol Spe* 2011; 79:594-98.
14. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of Nanoproduct in biomedical applications. *Trends Biotechnol* 2010; 28:580-8.
15. Cho KH, Park JE, Osaka T, Park S. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochim Acta* 2005; 51:956-960.
16. Cao YWC, Jin RC, Mirkin CA. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science* 2002; 297:1536-40.
17. Christian P, Vonderkammer F, Baalousha M, Hofmann T. Nanoparticles structure properties preparation and behavior in environmental media. *Ecotoxicology* 2008; 5:326-43.
18. Marambiojones C, Hoek EMV. A review of the antibacterial effects of Silver Nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J Nanoparticle Res* 2010; 5:1531-51.
19. Gardeatorresdey JL, Parsons JG, Dokken K, Peraltavidea J, Troiani, HE, Santiago P, et al. Alfalfa sprouts a natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir* 2003; 19:1357-61.
20. Dwivedi AG, Gopol K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extracts. *Coll Surf Phys Eng Asp* 2010; 360:27-33.
21. 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.
22. Ghorbani P, Hamidialamdari D, Namvar F, Yaghmaei P. [Investigating the antioxidant properties of Silver Nanoparticle synthesized by green method]. *J Ilam Uni Med Sci* 2016; 7:181-9. (Persian)

- 23.Iravani S, Zolfaghari B. Green synthesis of Silver Nanoparticles using Pinus eldarica barks extract. Biomed Res Int 2013; 78:1-5.
- 24.Vonwhite G, Kerscher P, Brown RD, Morella J, Mcallister W, Dean D, et al. Green synthesis of robust biocompatible Silver Nanoparticles using Garlic extract. J Nanomate 2012; 26:1-12.
- 25.Chahardooli M, Khodadadi E. [The biosynthesis of Silver Nanoparticles using Oak fruit extract and investigating their anti-microbial activities against nosocomial infection agents]. J Ilam Uni Med Sci 2014; 22: 27-33. (Persian)
- 26.Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically approved standard. 17th.ed.2002; P. 14-6.
- 27.Riesenberg A, Kaspar H, Febler AT, Werckenthin C, Schwarz S. Susceptibility testing of Rhodococcus equi an interlaboratory test. Vet Microbiol 2016;194:30-5
- 28.Kaushikthakkar N, Snehitmhatre S, Raseshparikh Y .Biological synthesis of Metallic Nanoparticles. Nanomedicine 2010; 28:257-62.
- 29.Azizinshermeh O, Valizadeh J, Noroozifar M, Ghasemi A, Valizadeh M. [Optimization, characterization and anti-microbial activity of gold nanoparticles biosynthesized using aqueous extract of Sambucus ebulus. L]. Phytochem J Med Plants 2016; 1:1-18. (Persian)
- 30.Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Bekhradnia AR. Iron chelating activity phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. African J Biol Technol 2008; 18:3188-92.
- 31.Waghmar SS, Deshmukh AM, Sadowski Z. Biosynthesis, optimization, purification and characterization of gold nanoparticles. African J Microbiol Res 2014;2:138-46
- 32.Gardea-Torresdey JL, Tiemann KJ, Gamez G, Dokken K, Tehuacanero S, Jose-Yacamán M. Gold Nanoparticles Obtained by Bio-Precipitation from Gold (III) Solutions. J Nanopart Res 1999; 1:397-402.
- 33.Armendariz V, Herrera I, Peraltavidea JR, Joseyacamán M. Size controlled gold nanoparticle formation by avena sativa biomass use of plants in nanobiotechnology. J Nanopart Res2004; 6:377-85.
- 34.Supraja S, Chakravarthy N, Sagadevan K. Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Cynodon dactylon leaf extract. J Chem Technol Res 2013; 1: 271-277.
- 35.Shenya DS, Mathewa J, Philip D. Phytosynthesis of Au Ag and Au-Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract and dried leaf of Anacardium occidentale. Acta Mole Biomole Spect 2011; 79:254-62.
- 36.Philip D. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using Hibiscus rosasinensis. Physica E 2010; 42:1417-24.
- 37.Shokrzadeh M, Saeedisaravi SS. The chemistry pharmacology and clinical properties of Sambucus ebulus a review. J Med Plants Res2010; 4:95-103.
- 38.Dubeya SHP, Lahtinen M, Sillanpää M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold Nanoparticles. Proce Biochem2010; 45:1065-71.
- 39.Foroghira S, Khatibzadeh M. [Green synthesis of silver nanoparticles used in conductive inks using sonochemical method]. Iranian J Chem Eng 2015; 34:1-9. (Persian)
- 40.Dwivedi AG, Gopoi K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using Chenopodium album leaf extracts. Coll Surf Phys Eng Asp 2010; 360:27-33.
- 41.Mock JJ, Barbic M, Smith DR, Schultz DA, Schultz S. Shape effects in Plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. J Chem Phys 2002; 116:6755-9.
42. Rai A, Singh A, Ahmad A, Sastry M. Role of halide ions and temperature on the morphology of biologically synthesized gold Nano triangles. Langmuir 2006; 2:736–741.
- 43.Kaviya S, Santhanalakshmi J, Viswanathan B. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Polyalthia longifolia Leaf extract along with D-Sorbitol study of antibacterial activity. J Nanotechnol 2010; 2011:1-5.
- 44.Basiri SH. [Investigation of the effect of temperature and air velocity in the dryer on the amount and quality of essential oil of Thymus]. Inn Sci Food Technol J 2011; 4:73-82. (Persian)
- 45.Praveen Kumar k, Paul W, Chandra P SH. Green synthesis of gold nanoparticles with Zingiber officinale extracts

- characterization and blood compatibility. *Proce Biochem* 2011; 46:2007-13.
- 46.Moyer CA, Brentano L, Gravens DL, Margraf HW, Monafo WW. Treatment of large human burns with 0.5% silver nitrate solution. *Arch Surg* 1965; 90:812-7.
- 47.Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for gram negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 2004; 275: 177-82.
- 48.Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005; 16:23-46.
- 49.Kenneth K, Wong Y, Liu X. Silver nanoparticles the real silver bullet in clinical medicine. *Med Chem Commun* 2010; 1:125-31.
- 50.Tran QH, Nguyen VQ, Le AT. Silver nanoparticles: synthesis properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv Nat Sci* 2013; 4: 3871-8.
- 51.Rodinol S, Butu A, Petrache P, Butu M, Dinupirvu C, Cornea CA. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of Sambucus ebulus extract. *Farmacia* 2015; 5:751-4.
- 52.Sondi I, Salopeksondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 2004; 275:177-82.
- 53.Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park JP, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed Nanotechnol* 2007; 3:95-101.
- 54.Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2007; 18:103-18.
- 55.Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine* 2012; 8: 37-45.
- 56.Nabipour Y, Rostamzad A, Ahmadyasbchin S. [The Evaluation of Antimicrobial Properties of Zinc and Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*]. *J Ilam Uni Med Sci* 2015; 5:173-81. (Persian)
- 57.Moadi T, Ghahramanzadeh R, Yosofi M, Mohammadi, F. [Synthesis of silver nanoparticles using four species plant and investigation of their antimicrobial activity]. *Iranian J Chem Eng* 2014, 4: 1-9. (Persian)



Investigating the Antimicrobial Activities of Silver Nanoparticles Biosynthesized by Aqueous Extract of *Sambucus ebulus* L.

Azizanshermeh O^{1*}, Valizadeh J², Noroozifar M¹, Qasemi A²

(Received: April 24, 2016

Accepted: May 9, 2016)

Abstract

Introduction: The use of antimicrobial compounds in plants and nanoparticles for control and treatment of disease agents have been extensively studied. The present study aimed to biosynthesis of silver nanoparticles using leaf aqueous extract of *Sambucus ebulus* L. and study of their antimicrobial activity.

Materials & methods: To biosynthesis of silver nanoparticles, fresh extract was prepared and added to silver nitrate solution with concentration 1 mM. Effective parameters on synthesis of silver nanoparticles such as; pH, the volume of extract, silver ion concentration, temperature and reaction time were optimized and studied to obtain individual shape and size of nanoparticles. Antimicrobial activities of extract and silver nanoparticles were studied with the Disc diffusion and MIC methods against four bacterias such as; *Staphylococcus aureus* (PTTC 1112), *Bacillus cereus* (PTTC 1154), *Escherichia coli* (PTTC 1399), *Pseudomonas aeruginosa* (PTTC 1707) and two Fungus such as; *Aspergillus niger* (PTTC 5012) and *Candida albicans* (PTTC 5027).

Findings: After adding the extract to the silver nitrate solution, the color changed to brown that represents to successful synthesis of silver nanoparticles. Silver nanoparticles showed maximum absorbance at 405 nm and they were spherical shape and the average size of them had been between 8-12 nm. These nanoparticles showed significant antimicrobial activity on samples, so that they were prevented the growth of bacterias and fungus in very low concentration.

Discussion & conclusions: Because of existing the antioxidant properties and many secondary compounds in plant, they have a role in reducing and stabilizing the nanoparticles. In this study, the silver nanoparticles synthesized by leaf aqueous extracts of *S. ebulus*. The silver nanoparticles showed high antimicrobial activity.

Keywords: Antimicrobial activity, Silver nanoparticles, *Sambucus ebulus* L, Biosynthesis

1.Dept of Chemistry, Faculty of Science, Sistan and Baluchestan University, Zahedan, Iran

2.Dept of Biology, Faculty of Science, Sistan and Baluchestan University, Zahedan, Iran

Corresponding author Email: omid_azizian@yahoo.com